RICARDO NUNO MENDES DE JORGE PÁSCOA

Licenciado em Microbiologia

MONITORIZAÇÃO IN-SITU DE PROCESSOS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS COM ESPECTROSCOPIA DE INFRA-VERMELHO PRÓXIMO

Universidade do Porto

Outubro de 2006

RICARDO NUNO MENDES DE JORGE PÁSCOA

Licenciado em Microbiologia

MONITORIZAÇÃO IN-SITU DE PROCESSOS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS COM ESPECTROSCOPIA DE INFRA-VERMELHO PRÓXIMO

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 27 / 12 2006
Reg. 4196
Cota

FFM
PAS
4196

Universidade do Porto

Outubro de 2006

RICARDO NUNO MENDES DE JORGE PÁSCOA

Licenciado em Microbiologia

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre
apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto

Universidade do Porto

Outubro de 2006

Trabalho executado no Serviço de Química-Física da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Resumo

A aplicação de tecnologia baseada na radiação de infra-vermelho próximo (NIR) na monitorização de processos industriais tem vindo a ganhar importância nos últimos vinte anos. A sua expressão máxima de aplicação tem sido na indústria alimentar e mais recentemente na indústria farmacêutica no contexto das tecnologias analíticas de processo (PAT). Existem contudo, áreas de aplicação da espectroscopia NIR ainda muito pouco exploradas. A aplicação a processos ambientais, como os de tratamento de efluentes, continua ainda em grande medida por explorar. Este facto deve-se em parte devido ao tipo de matrizes que caracterizam estes processos (matrizes complexas e com grande variabilidade). Contudo, as características da radiação NIR e a sua potencial aplicabilidade a processos de tratamento de efluentes sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a sua aplicabilidade, limitações e vantagens. Para além disso, a monitorização em tempo real possível com espectroscopia NIR, é muito importante pois permite uma avaliação instantânea do estado do sistema o que possibilita uma capacidade de resposta rápida a possíveis perturbações.

Foi monitorizado um reactor descontínuo sequencial (SBR) para tratamento aeróbio (lamas activadas) de resíduos lácteos, com uma sonda de transflectância NIR *in-situ*. Conjugando os espectros NIR com ferramentas de quimiometria (análise multivariada) estimaram-se modelos para diferentes parâmetros: sólidos totais (TS), sólidos suspensos totais (TSS) e carência química de oxigénio (COD). Foi utilizada modelação por mínimos quadrados parciais (PLS) para desenvolver os modelos para os parâmetros descritos. O erro médio de validação (RMSECV) obtido para a estimativa de cada um dos parâmetros foi: 0.086 g/L para os TS, 0.13 g/L para os TSS e 78.4 mg O_2/L para o COD. Foram monitorizados vários ciclos de operação do SBR com a sonda NIR *in-situ*. Esta informação permitiu o desenvolvimento de modelos para monitorização estatística multivariada da operação do SBR. Os espectros obtidos em-linha permitiram por aplicação de um modelo quimiométrico descrever as várias fases do ciclo de operação e consequente detecção de perturbações.

Estes resultados demonstram viabilidade e sugerem a necessidade de estudos mais detalhados sobre a utilização da espectroscopia NIR como um método alternativo para monitorização e controlo de processos de tratamento de águas residuais por lamas activadas.

Palavras-chave: Tratamento de efluentes, Infra-vermelho próximo, Quimiometria, Lamas activadas, Monitorização em-linha.

Abstract

The application of near infrared (NIR) spectroscopy for industrial process monitoring is achieving increasing importance over the last twenty years. This technology has been mostly applied in the food industry and more recently in the pharmaceutical industry in the context of process analytical technologies (PAT). However, there are some areas where NIR spectroscopy hasn't been applied. The application of NIR spectroscopy in environmental processes (e.g. like wastewater treatment processes), is still to be explored. This fact is in part because of the matrix type that characterise these processes (complex matrices with high variability). The NIR radiation characteristics and its potential application to wastewater treatment processes suggest the need for more investigation about applications, limitations and advantages. Moreover, the real time monitoring by NIR spectroscopy, is very important because it allows a fast evaluation of the process state. A sequential batch reactor (SBR) for aerobic treatment of milk residuals, was monitored *in-situ* with a NIR transflectance probe. Using NIR spectral data and chemometrics tools, models for different parameters were developed: total solids (TS), total suspended solids (TSS) and chemical oxygen demand (COD). After spectrum pre-processing for removing the less relevant information and with application of partial least squares regression (PLS) the described parameters were modelled. The root mean squared error of cross validation (RMSECV) obtained for the estimate of each parameter was: 0.086 g/L for TS, 0.13 g/L for TSS and 78.4 mg O_2/L for COD. The SBR NIR *in-situ* monitoring allowed the real time identification of the state of the process, namely the evaluation of organic carbon removal. The collected NIR spectra allowed the development of models for the multivariate statistical monitoring of the SBR operation. These promising results, suggest the need for more detailed studies on the feasibility of NIR spectroscopy as an alternative method for monitoring and control of wastewater treatment processes.

Keywords: Wastewater treatment, Near Infrared spectroscopy (NIR), Chemometrics, Activated sludge process, On-line monitoring.

Agradecimentos

À Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto a gratidão e em especial ao serviço de Química-Física, pela admissão como aluno no Mestrado Europeu em Química Analítica Ambiental.

Ao Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, um obrigado pelo grande incentivo e formação prestada no decorrer do mestrado.

Ao Departamento de Química da Universidade de Valladolid, em especial ao Professor Douutor Henrique Barrado, pela formação prestada e pela oportunidade que me foi concedida de efectuar um bloco do mestrado na instituição em causa.

Ao Doutor João Lopes, pela magnífica orientação bem como pela formação e incentivo durante todo este trabalho.

Ao Professor Doutor António Rangel pelo estímulo na realização deste mestrado.

À instituição Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica pela disponibilidade do equipamento para a realização de algumas determinações e em especial, ao Engenheiro Amadeu Ricardo pela disponibilidade, ajuda e incentivo prestado.

À empresa Lacticínios de Azeméis Lda, em especial ao Engenheiro Vitor Santos pela disponibilidade e apoio prestado para o início do trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, por todas as oportunidades, pela paciência e apoio incondicional.

A todos os colegas do Departamento de Química-Física pelo óptimo ambiente de trabalho.

A todos que eu não referi e contribuíram de uma forma indirecta para a concretização do mestrado.

Glossário

A	–	Absorvância
AOTF	–	Filtro sintonizável óptico-acústico
BOD	–	Carência biológica de oxigénio
COD	–	Carência química de oxigénio
DOC	–	Carbono orgânico dissolvido
ETAR	–	Estação de tratamento de águas residuais
FT-NIR	–	Infra-vermelho próximo com transformada de Fourier
IR	–	Infra-vermelho
LOO	–	Validação cruzada do tipo "leave-one-out"
MLR	–	Regressão linear múltipla
MSC	–	Correcção multiplicativa de sinal
NIR	–	Infra-vermelho próximo
NK	–	Azoto total pelo método de Kjeldahl
OSC	–	Correcção ortogonal do sinal
PCA	–	Análise de componentes principais
PDA	–	Policromador de grelha
PLS	–	Mínimos quadrados parciais
R	–	Reflectância difusa
RMSE	–	Raiz do erro quadrado médio da calibração
RMSECV	–	Raiz do erro quadrado médio obtido por validação cruzada
SBR	–	Reactor descontínuo sequencial
SNR	–	Razão sinal-ruído
SNV	–	Variação padrão normal
TSS	–	Sólidos suspensos totais
TS	–	Sólidos totais
T	–	Transmitância
TN	–	Azoto total
TOC	–	Carbono orgânico total

As abreviaturas utilizadas na Tese estão de acordo com o termo correspondente em língua Inglesa.

Notação

Adoptou-se para notação matemática nas fórmulas apresentadas as seguintes regras:

- Letras capitais a negrito definem matrizes (sendo as respectivas operações igualmente operações matriciais).
- Numa matriz os índices representam a linha e depois a coluna (e.g., $\mathbf{X}_{ij}$ representa o elemento da matriz **X** na linha **i**, coluna **j**).
- Letras minúsculas a negrito definem vectores (sendo as respectivas operações igualmente operações vectoriais).
- Num vector o índice representa o elemento respectivo .(e.g. $\mathbf{X}_i$ representa o elemento **i** do vector **X**).
- Letras minúsculas ou maiúsculas representam escalares.

As matrizes contêm os dados organizados por linhas e colunas. Cada linha representa uma amostra e cada coluna uma variável. Por exemplo a organização de uma conjunto de espectros NIR (em valores de absorvância) resulta numa matriz onde cada linha é uma amostra distinta e cada coluna representa um comprimento de onda.

Índice

Resumo I
Abstract II
Agradecimentos III
Glossário IV
Notação V
Objectivos 1
Capítulo 1. Introdução 2
1.1. Tratamento de efluentes por lamas activadas 3
1.1.1. Reactor descontínuo sequencial (SBR) 4
1.1.2. Monitorização de processos de lamas activadas 6
1.2. Espectroscopia de Infra-vermelho próximo (NIR) 7
1.2.1. Características da radiação NIR 7
1.2.2. Vibrações moleculares na região NIR 12
1.2.3. Instrumentação 14
1.2.4. Procedimentos de amostragem 17
1.3. Quimiometria 19
1.3.1. Pré-processamento espectral 20
1.3.1.1. Remoção da média ("mean-centering") 20
1.3.1.2. Auto-normalização ("autoscaling") 21
1.3.1.3. Derivação (filtro de Savitzky-Golay) 21
1.3.1.4. Correcção multiplicativa de sinal (MSC) 23
1.3.1.5. Variação padrão normal (SNV) 24
1.3.1.6. Correcção ortogonal de sinal (OSC) 24
1.3.2. Análise de componentes principais (PCA) 25
1.3.3. Mínimos quadrados parciais (PLS) 26
1.3.4. Calibração 28
1.3.5. Validação cruzada 28
1.4. Supervisão multivariada 29
1.4.1 Estatística de Hotelling (T^2) 31
1.4.2. Estatística da soma do quadrado dos erros (Q) 31
1.5. Aplicações NIR em processos de tratamento de águas residuais 32
1.5.1. Tratamento de efluentes da indústria de lacticínios por NIR 32
Capítulo 2. Materiais e Métodos 34
2.1. Aquisição de espectros 34

2.1.1. Aquisição de espectros NIR 34
2.1.2. Aquisição de espectros NIR de onda curta (SW-NIR) 35
2.2. Reactor de lamas activadas (SBR) 36
2.2.1. Descrição do reactor 36
2.2.1.1. Montagem do reactor 37
2.2.1.2. Inoculação do reactor 38
2.2.1.3. Ciclos de operação 39
2.3. Determinação de sólidos suspensos totais (TSS) 39
2.4. Determinação de sólidos totais (TS) 39
2.5. Determinação da carência química de oxigénio (COD) 40
2.6. Medição da densidade óptica (UV/Vis) 40
2.7. Software 41
2.7.1. Aquisição de espectros 41
2.7.2. Tratamento de resultados 41
Capítulo 3. Condições Operatórias 42
3.1. Monitorização do efluente lácteo 42
3.1.1. Monitorização por SW-NIR 42
3.1.2. Monitorização por NIR 45
3.2. Avaliação do desempenho do SBR 47
3.3. Influência de parâmetros operatórios na aquisição de espectros NIR 49
3.3.1. Influência do arejamento 50
3.3.2. Influência da agitação 51
Capítulo 4. Modelação do COD 54
4.1. Modelação por NIR ("at-line") 54
4.2. Modelação por UV/Vis ("off-line") 61
4.3. Comparação entre modelos baseados em UV/Vis e NIR 65
Capítulo 5. Modelação dos TSS e TS 67
5.1. Modelação dos TSS 67
5.2. Modelação dos TS 72
Capítulo 6. Monitorização *in-situ* do SBR 77
6.1. Descrição dos ensaios realizados 77
6.2. Modelação do estado do sistema 78
Capítulo 7. Conclusões 85
7.1. Perspectivas futuras 87
Bibliografia 88

Objectivos

A aplicação da tecnologia baseada na radiação de infra-vermelho próximo (NIR) para monitorização de um reactor de lamas activadas pode constituir um método alternativo de monitorização em-linha com vantagens sobre os métodos actualmente utilizados. Nesta Tese pretende-se monitorizar um reactor descontínuo sequencial (SBR) para processamento de um resíduo lácteo com uma sonda de transflectância NIR *in-situ*. Conjugando os espectros NIR com ferramentas de quimiometria (de análise multivariada) pretende-se estimar modelos para diferentes parâmetros processuais: sólidos totais (TS), sólidos suspensos totais (TSS) e carência química de oxigénio (COD) assim como desenvolver modelos de supervisão multivariada para acompanhamento do estado do processo.

Os objectivos da Tese foram:

- monitorização de um processo ambiental de tratamento de resíduos lácteos por lamas activadas num reactor SBR com a tecnologia NIR através da utilização *in-situ* de uma sonda de transflectância;
- monitorização da carga introduzida no reactor por NIR;
- monitorização da qualidade do efluente tratado com a tecnologia NIR de forma a poder caracterizar o funcionamento do reactor em termos de eficiência de tratamento;
- estimativa de diferentes parâmetros processuais (sólidos totais, sólidos suspensos totais, carência química de oxigénio) com a tecnologia NIR através da construção de modelos quimiométricos (por mínimos quadrados parciais - PLS) e comparação do erro com os métodos de referência;
- caracterização em-linha das diferentes fases do ciclo do SBR e detecção rápida de possíveis perturbações através de modelos de supervisão multivariada.

Capítulo 1. Introdução

As águas residuais são causadoras e são um veículo de propagação da poluição. Dependendo da proveniência das águas residuais, diferentes tipos de tratamento podem ser escolhidos. Qualquer cidadão tem o dever de tentar deixar o ambiente da forma como encontrou quando viveu, à sua descendência. Como tal, torna-se muito importante controlar certos parâmetros ambientais. Daqui surge a necessidade de monitorizar as águas residuais e os vários processos de tratamento para assegurar uma boa qualidade dos efluentes tratados.

A aplicação de tecnologia baseada na radiação de infra-vermelho próximo (NIR) na monitorização de processos industriais tem vindo a ganhar importância desde os últimos vinte anos. A sua expressão máxima de aplicação tem sido a indústria alimentar e mais recentemente a indústria farmacêutica (no contexto das tecnologias analíticas de processo - PAT) (Lopes et al., 2004a). Existem contudo, áreas de aplicação da tecnologia NIR ainda muito pouco exploradas. A aplicação da tecnologia NIR a processos ambientais, como os de tratamento de efluentes, continua ainda em grande medida por explorar. Este facto deve-se em parte devido ao tipo de matrizes que caracterizam estes processos (matrizes complexas e de grande variabilidade). No entanto, as características da radiação NIR e a sua potencial aplicabilidade a processos de tratamento de efluentes sugerem a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a sua aplicabilidade, limitações e vantagens.

A espectroscopia NIR tem sido cada vez mais aceite no controlo de processos industriais (Heikka et al., 1997; Geladi e Forsström, 2002; McGill et al., 2002; Lopes et al., 2004a). Existem inúmeras aplicações tanto na área alimentar, como nas áreas farmacêuticas e petroquímicas (de refinação). As aplicações desta técnica aparecem assim em diferentes áreas. Pode ser aplicada na detecção de possíveis adulterações de óleos (Ozen e Mauer, 2002), humidade (Wählby e Skjöldebrand, 2001), na determinação de fibras dietéticas totais ou solúveis em cereais (Kays et al., 1996; Kays et al., 2002), na determinação de proteínas em farinha de trigo (Ferrão et al., 2004), na análise de diferentes componentes em diversos processos industriais como na indústria de leite (Laporte et al., 1998), de produtos lácteos fermentados (Rodriguez-Otero e Hermida, 1996) e de queijo (Pierce e Wehling, 1994; Lee et al., 1997; Čurda e Kukačková, 2004). É uma técnica muito utilizada na caracterização de óleos (Aske et al., 2001), é considerada um método alternativo para a análise de processos de ácido acético devido à sua rapidez e permitir medidas simultâneas de vários componentes com alguma precisão e exactidão (Cheng-Wen et al., 2001). Pode por exemplo ser usada para a obtenção de informação de minerais no sistema solar (Cooper e

Mustard, 2002). Uma das indústrias onde tem crescido o número de aplicações NIR, é a da biotecnologia, nomeadamente aplicações *in-situ* para monitorização de reactores enzimáticos, fermentativos e de células animais (Arnold et al., 2002, Lopes et al., 2004b).

As vantagens que têm sido conseguidas com a implementação de espectroscopia NIR em vários tipos de processos industriais, nomeadamente em processos farmacêuticos, permitem esperar que semelhantes resultados possam ser obtidos em processos de tratamento de efluentes. As vantagens da espectroscopia NIR, que são essencialmente o baixo custo por análise (virtualmente zero), a não necessidade de amostragem ou processamento (leitura directamente no efluente) e a possibilidade de colocação de sondas *in-situ* para medições instantâneas, são atributos que fazem desta técnica potencialmente utilizável em processos ambientais, no que diz respeito à caracterização química e física dos efluentes em diversos estágios do tratamento.

1.1. Tratamento de efluentes por lamas activadas

Os processos biológicos de tratamento de águas residuais são dos poucos bio-processos que funcionam em modo contínuo na maioria embora não num estado de equilíbrio sendo a sua composição bastante complexa (Metcalf e Eddy, 1991). Entre os diferentes tipos de processos de tratamento biológico, o mais utilizado é o sistema de lamas activadas, que consiste na inoculação de bactérias filamentosas e floculantes numa concentração que seja capaz de oxidar a matéria orgânica num tanque arejado (Amaral, 2003). O tratamento biológico baseado em lamas activadas consegue ser o menos dispendioso para tratar elevadas quantidades de água residual (Pons et al., 2004), embora o reactor biológico de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) por lamas activadas seja um complexo ecossistema (Bitton, 1994). O princípio de funcionamento é simples e está representado na Figura 1. A biomassa floculada é separada num tanque de sedimentação. Parte desta é recirculada para o tanque arejado de forma a manter uma concentração de biomassa constante (Amaral, 2003).

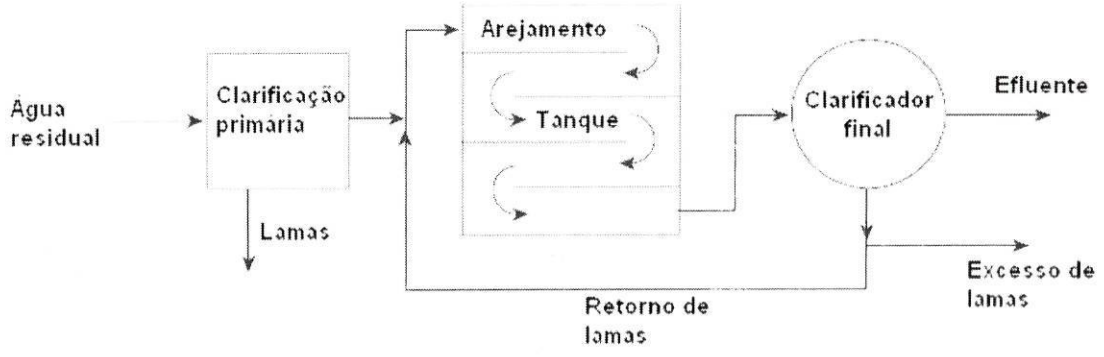


Figura 1. Esquematização sumária de um processo contínuo de tratamento de efluentes por lamas activadas.

1.1.1. Reactor descontínuo sequencial (SBR)

O reactor descontínuo sequencial (SBR) é um tipo de reactor para tratamento usado na remoção de matéria orgânica carbonatada. Existem outras formas de tratamento, como por exemplo as lamas activadas (processo em contínuo), lagoas arejadas e digestão aeróbia. O SBR é um sistema de tratamento de carga/descarga ("fill-and-draw") de lamas activadas, que como nos sistemas convencionais de lamas activadas, utiliza processos de arejamento e sedimentação (clarificação), embora o SBR se distinga por realizar os processos sequencialmente no mesmo tanque. Nos sistemas convencionais em contínuo esses processos são realizados simultaneamente em tanques separados.

O SBR é constituído por cinco etapas típicas: enchimento, reacção, sedimentação, decantação e espera. O processo de enchimento tem como objectivo adicionar substrato (efluentes ou águas residuais) para o reactor e demora cerca de 25% do tempo total do ciclo. O processo de reacção consiste no bio-processamento de todas as reacções iniciadas durante o processo de enchimento, demorando cerca de 35% do tempo total. A sedimentação permite a separação dos sólidos, gerando um sobrenadante livre de sólidos (ou quase) e pronto para ser removido. A qualidade desta separação dependerá da população microbiana, do efluente e da eficiência de remoção da carga orgânica. No SBR, este processo é normalmente mais eficiente do que num sistema de fluxo contínuo. O propósito da decantação é remover o efluente tratado do reactor, podendo demorar entre 5 e 30% do tempo total. O processo de espera num sistema multi-tanque tem como objectivo fornecer tempo para que o reactor complete o ciclo, embora este passo não seja necessário em muitos casos, e como tal é frequentemente omitido.

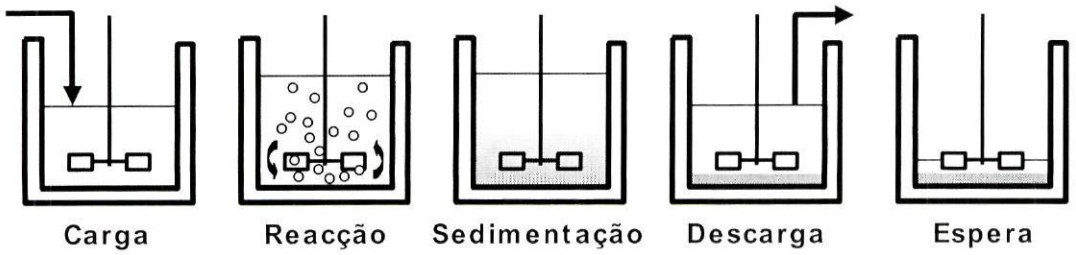


Figura 2. Esquema das diferentes etapas de um reactor do tipo SBR. O último passo (de espera) justifica-se quando existem diferentes tanques e é necessário um período de tempo para mudança de tanque.

A remoção de parte das lamas é outro processo que afecta significativamente o desempenho do reactor, embora não esteja incluído nos cinco passos comuns, pois não existe um tempo determinado para que o mesmo processo ocorra. A quantidade e a frequência da remoção de parte das lamas são determinadas pelo desempenho desejada (tempo hidráulico). No SBR este processo ocorre normalmente durante as fases de sedimentação e espera. Como no SBR todos os processos se realizam no mesmo tanque, não ocorre perda das lamas, logo não é necessário o re-encaminhamento das mesmas.

Nos SBR biológicos com fases aeróbias e anaeróbias, uma grande variedade de contaminantes pode ser removido ou convertido (Gonçalves et al., 2005). Por exemplo a remoção de azoto pode ser conseguida através da introdução de um passo anaeróbio no ciclo do reactor SBR.

Vários problemas operacionais resultam de uma incorrecta composição da biomassa, logo torna-se indispensável o conhecimento da composição da mesma (Eikelboom, 2000). A micro-fauna mista presente nas lamas activadas é composta por 95% de bactérias e 5% de protozoários, metazoários e outros invertebrados (Richard, 1989). A composição dos flocos nas lamas activadas depende de vários factores como: a quantidade de microrganismos vivos, células mortas, fragmentos orgânicos não digeridos, grãos de areia e compostos inorgânicos precipitados. A velocidade de sedimentação dos flocos é reduzida se os flocos possuírem uma forma irregular. Os flocos mais compactos estão mais próximos uns dos outros, logo sedimentam mais rápido e são maioritariamente castanhos. A presença de bactérias filamentosas ajuda ao desenvolvimento de aglomerados. As bactérias formam flocos numa tentativa de as ajudar em ambientes pobres em nutrientes, oferecendo resistência aos protozoários e na fixação das mesmas. Na presença de ambientes ricos em nutrientes não formam flocos. Os flocos de células compactas sedimentam mais rápido quanto maiores forem, logo os flocos pequenos embora quase sempre presentes são descarregados na maioria com o efluente. Os microrganismos filamentosos derivam de células não

divididas de bactérias, fungos ou algas durante a divisão celular. A presença de muitos microrganismos filamentosos é mais grave do que a presença de células livres (Eikelboom, 2000).

Protozoários e frequentemente metazoários estão quase sempre presentes nas lamas activadas podendo estar junto aos flocos ou livres. Removem maioritariamente as células livres que não estão juntas aos flocos. A qualidade das lamas activadas depende de diversos factores que não têm o mesmo grau de importância como, a quantidade da população filamentosa ou a morfologia de floculação (Eikelboom, 2000).

Diversos tipos de microrganismos estão envolvidos na degradação da matéria orgânica. A maior parte dos microrganismos investigados presentes numa estação de tratamento de águas necessitam de oxigénio para o seu crescimento e consumo de nutrientes. Esta degradação pode ser acelerada mantendo uma certa quantidade de biomassa no reactor em condições controladas. Como é de esperar a biomassa aumenta com o aumento da carga do efluente. Os microrganismos são separados do efluente por sedimentação como já foi referido anteriormente. Em processos contínuos a maior parte da biomassa retorna para o tanque de arejamento. A diversidade em termos nutricionais dos diferentes microrganismos permite remover vários e diferentes componentes simultaneamente. A população de lamas activadas está em equilíbrio aparente embora este possa mudar devido à mudança do efluente. Um ambiente pobre em nutrientes provoca competição entre os microrganismos. Nestas condições a taxa de crescimento das bactérias que formam flocos diminui mais do que a das bactérias filamentosas. A divisão celular dos microrganismos depende de diversos factores como a quantidade de nutrientes disponíveis, temperatura, pH e a quantidade de oxigénio dissolvido (Eikelboom, 2000). Estes mesmos factores quando bem conjugados aumentam a actividade e taxa de crescimento dos microrganismos.

Os compostos de carbono formam a mais importante fonte de energia para os microrganismos e a composição da população também depende da qualidade e natureza desses mesmos compostos. A remoção de compostos de azoto e fósforo nas lamas activadas requer uma fase anaeróbia (Eikelboom, 2000).

1.1.2. Monitorização de processos de lamas activadas

A composição das águas residuais é normalmente avaliada em parâmetros como: carência química de oxigénio (COD), carbono orgânico total (TOC), carbono orgânico dissolvido (DOC), carência biológica de oxigénio (BOD), azoto total (TN) e azoto Kjeldahl (NK). Quando o número de componentes a ser quantificados aumenta, os métodos multivariados de detecção simultânea tornam-se rentáveis e são usados primariamente em processos de monitorização e controlo. Isto

inclui a possibilidade de detecção rápida de alguns acidentes como a formação de um produto indesejado no meio reaccional ou uma substância tóxica nas águas residuais (Pons et al., 2004).

Vários procedimentos de calibração foram propostos para monitorizar simultaneamente diversas substâncias conhecidas, embora muitas vezes a complexidade do meio torne a identificação de muitos compostos em simultâneo uma tarefa muito difícil. A amostragem nestes casos exige uma recolha e pré-tratamento em elevadas condições de esterilidade (Pons et al., 2004).

1.2. Espectroscopia de Infra-vermelho próximo (NIR)

1.2.1. Características da radiação NIR

Sir Herschel foi um astrónomo e músico que marcou o seu lugar na história, por realizar uma experiência em que testou a contribuição de cada cor proveniente da luz branca gerada através do aquecimento de várias substâncias. Herschel, inovou por, continuar a medir a temperatura para lá da zona do espectro visível. Observou que o valor da temperatura continuava a subir. Referiu-se a esta região como a região dos raios caloríficos para lá do vermelho. Posteriormente esta região ficou conhecida como a região do infra-vermelho próximo ("Near Infrared") (Herschel, 1800a, Herschel, 1800b).

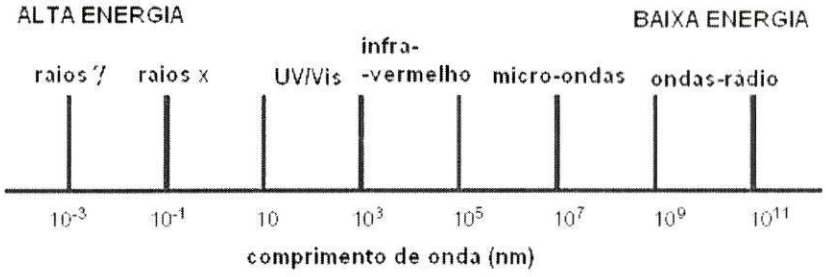


Figura 3. Representação do espectro electromagnético nas suas principais divisões.

A espectroscopia de infra-vermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia vibracional dentro da gama dos 750 a 2500 nm (e 12,800-400 cm^{-1}) em relação ao comprimento e número de onda (Pasquini, 2003; Brennan et al., 2003;Pons et al., 2004).

A radiação de infra-vermelho de baixa energia é absorvida apenas pelas moléculas com ligações covalentes onde as vibrações e as rotações podem mudar o momento dipolar (Pons et al., 2004). Esta gama de energia permite às moléculas passarem para estados excitados de baixa

energia embora não permita a excitação dos electrões para níveis energéticos superiores. A utilização da radiação NIR tem como objectivo extrair informação qualitativa e/ou quantitativa devido à interacção das ondas electromagnéticas do infra-vermelho próximo com os constituintes da amostra em causa (Pasquini, 2003).

Um espectro NIR é o resultado de absorções designadas por sobretons ("overtones") e combinações de absorções de vários grupos funcionais dos quais se destacam os grupos C-H, N-H, O-H. Um espectro é também resultado das condições da amostra; e.g. tipo de instrumento, tamanho das particulas ou gotas, estados polimórficos, índice de refracção. É muito difícil obter um espectro NIR sem dispersão de luz ("diffuse light scattering"). Um espectro NIR é geralmente apresentado em unidades de absorvância: A=log(1/R) ou A=log(1/R) onde R é a reflectância e T a transmitância, os dois modos de aquisição espectral mais importantes. Em unidades de absorvância a relação entre o espectro e certos constituintes é aproximadamente linear. Apenas em soluções muito diluídas, é conveniente utilizar a transformação de Kubelka-Munk (Kubelka e Munk,1931).

O NIR pode ser considerado como a técnica espectroscópica característica da química do átomo de hidrogénio nas suas diversas formas moleculares. É capaz de fornecer informação principalmente dos sobretons e das combinações de vibrações moleculares de baixa energia que incluem pelo menos uma vibração de uma ligação X-H, sendo X um heteroátomo (e.g., N,C,S,O). São absorções geralmente mais fracas comparadas com as da radiação de infra-vermelho médio (4000-400 cm^{-1}). A zona da radiação NIR torna-se muito útil na detecção de compostos que contêm ligações de átomos de hidrogénio a um heteroátomo (Pons et al., 2004). O espectro na zona NIR é caracterizado pela sobreposição de bandas fracas de absorção. As absorções fundamentais na zona do infra-vermelho médio, originadas pelo esqueleto molecular ou por grupos funcionais contendo átomos mais pesados (segundos ou terceiros sobretons acima de 4000 cm^{-1}) são muito fracas na zona NIR.

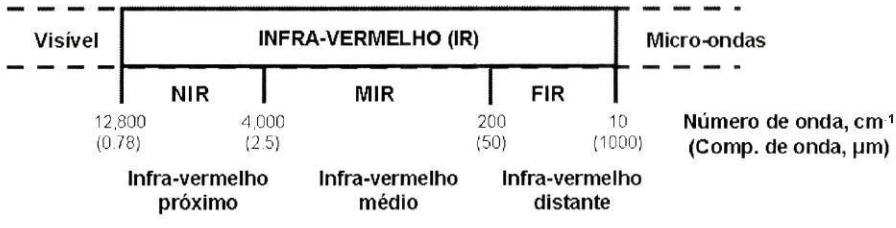


Figura 4. Divisão da região do espectro electromagnético relativo ao infra-vermelho nas componentes infra-vermelho próximo (NIR), médio (MIR) e distante (FIR).

A correspondência entre a energia de radiação e a diferença de energia entre dois estados vibracionais, causa uma resposta selectiva do sistema molecular, o que significa que dentro de uma gama de comprimentos de onda, algumas frequências vão ser absorvidas, outras não e algumas parcialmente (Pasquini, 2003). A intensidade de uma determinada banda está associada com as ligações envolvendo o átomo de hidrogénio e elementos mais pesados como carbono, azoto e enxofre (Pasquini, 2003).

A espectroscopia NIR apresenta diversas vantagens em relação aos métodos químicos tradicionais (Heikka et al., 1997; Tøgersen et al., 1997; Aske et al., 2001; Geladi e Forsström, 2002; McGill et al., 2002; Büning-Pfaue, 2003; Chen et al., 2004; Čurda et al., 2004; Pons et al., 2004; Uddin et al., 2006):

- é uma técnica física não destrutiva;
- com preparação simples e rápida da amostra;
- o tempo de análise é muito baixo;
- a sua precisão pode ser elevada;
- não invasiva;
- não requer reagentes;
- não produz resíduos;
- permite determinação de vários parâmetros em simultâneo utilizando técnicas multivariadas;
- permite medir propriedades físicas e químicas;
- tem baixos custos de manutenção;
- é aplicável a um grande número de situações (grande flexibilidade).

A zona NIR permite registar a resposta das ligações moleculares de certos constituintes químicos à radiação infra-vermelha, o que por sua vez, fornece um espectro característico e específico da amostra em causa ("fingerprint"). É uma técnica onde os fenómenos físicos como químicos têm contribuições diferentes no espectro, tornando as medidas muito ricas em informação (Rodionova et al., 2005). É ainda capaz de fornecer informação contínua sobre diversos parâmetros de interesse (Vaidyanathan et al., 2001). Torna-se por isso uma ferramenta muito eficiente para aplicações de controlo em tempo real das linhas de produção (Laporte et al., 1999). Apresenta como desvantagens (Büning-Pfaue, 2003; Vaidyanathan et al., 2003):

- procedimentos de calibração por vezes muito trabalhosos (método indirecto);
- o tratamento de dados requer procedimentos multivariados (complexos);

- o espectro NIR é afectado por mudanças das propriedades físicas e químicas das propriedades do meio (e.g., temperatura, viscosidade, turbidimetria, força inónica, etc) bem como da biomassa e da sua morfologia;
- falta de robustez, causada por pequenas variações de factores com influência na técnica como: temperatura, a complexidade da composição da amostra e distúrbios instrumentais;
- variações espectrais causadas por fenómenos físicos (e.g., dispersão da luz);
- baixa sensibilidade devido a baixos coeficientes de absorção (elevados limites de detecção).

Apesar de todas estas dificuldades foi demonstrado que o controlo e optimização de bio-processos, nomeadamente em determinados processos de fermentação, é possível com a tecnologia NIR (Gonzalez-Vara et al., 2000).

As aplicações da espectroscopia NIR em processos analíticos podem ser de vários tipos, desde a caracterização da humidade à caracterização completa do conteúdo em hidrocarbonetos de águas provenientes de processos da indústria de refinação. Os objectivos destas aplicações podem ser bastante diferentes. Em alguns casos o critério pretendido pode ser a rapidez de resposta, o baixo custo, a flexibilidade, a sensibilidade ou estabilidade da resposta.

A técnica NIR necessita de ferramentas de quimiometria (métodos de calibração multivariados) para a obtenção de medidas qualitativas e quantitativas. O desenvolvimento de aplicações com base na espectroscopia NIR nas últimas três décadas devem-se essencialmente ao aparecimento de equipamentos (espectrómetros) mais robustos (e.g., nomeadamente devido ao desenvolvimento do interferómetro (FT-NIR)) e ao desenvolvimento da disciplina quimiometria. O desenvolvimento da quimiometria e sua difusão teve como principal motor o desenvolvimento da área da computação (Blanco et al., 2002). Esta nova disciplina permite retirar informação dos dados que não é facilmente perceptível (Pasquini, 2003). Devido à não selectividade das bandas de absorção na região NIR, torna-se muito difícil associar zonas espectrais localizadas à variação de parâmetros físicos e químicos. Por este motivo, a informação necessária a essa associação tem de ser extraída usando uma grande parte do espectro. Apenas deste modo é possível maximizar a extracção de informação química e física contida no espectro. Métodos matemáticos assentes no conceito de modelação multivariada empírica são por isso fundamentais. Dada a complexidade do espectro (sobretons e combinações quase infinitas) não é razoável aplicar modelos de primeiros princípios para analisar os espectros. Por isso, os modelos empíricos são preferencialmente usados por não assentarem em pressupostos ou estruturas definidas. A eficiência dos métodos quantitativos é por isso muito dependente da qualidade das calibrações (Sjöblom et al., 1998). A obtenção de calibrações em análise quantitativa é um passo essencial na aplicação desta técnica

para medidas quantitativas e resulta de uma análise prévia de muitas amostras, que têm de ser representativas da variabilidade física e química esperada das amostras desconhecidas (Franco et al., 2005; Büning-Pfaue, 2003). O objectivo da calibração multivariada é estabelecer regressões multi-lineares entre o espectro NIR e os parâmetros químicos ou físicos da amostra analisada (Büning-Pfaue, 2003). Variações espectrais sistemáticas que não dependem da concentração existem em geral, mesmo após a remoção do ruído e das principais variações da linha de base. Este tipo de interferência afecta e dificulta os modelos de calibração e reduz a qualidade dos resultados no caso de uma análise quantitativa (Blanco et al., 2001).

A tecnologia NIR pode ser usada para estabelecer a natureza das ligações de hidrogénio presentes e é um método fácil para medir certas forças de ligação (Symons, 2000).

A água também se associa fortemente com iões, monómeros e polímeros orgânicos por pontes de hidrogénio, logo as bandas correspondentes à absorção das moléculas de água no espectro NIR são influenciadas pelos efeitos dos solutos na mesma. Verificam-se mudanças de absorção para menores ou maiores comprimentos de onda e estas mudanças parecem estar relacionadas com o potencial de hidratação dos respectivos solutos. Isto comprova o facto de que o espectro NIR é facilmente afectado pelo estado das moléculas em solução aquosa. O espectro NIR da água pode ser utilizado para várias determinações das propriedades físicas e químicas da água (Büning-Pfaue, 2003). Como os iões em fase aquosa não podem absorver directamente a radiação NIR, nenhuma característica espectral associada a esses iões estará presente. Se os iões interagirem com outras espécies e alterarem o espectro, as suas concentrações podem ser indirectamente determinadas usando a variação espectral de outros componentes.

A tecnologia NIR é fortemente dependente da existência de métodos de referência. Os métodos de referência são fundamentais na fase de modelação, devido à necessária correlação entre os valores obtidos através desses métodos de referência com certas zonas do espectro. Sem métodos de referência fiáveis não será possível a construção de um bom modelo baseado em NIR (Pasquini, 2003).

A determinação de parâmetros físicos ou químicos através do espectro NIR é feita através de modelos matemáticos ou quimiométricos. Com efeito uma técnica analítica baseada em NIR é indirecta. Por este motivo, o estabelecimento de relações matemáticas (calibração) entre os espectros NIR e correspondentes parâmetros, requer que estes últimos sejam obtidos por uma técnica estabelecida (método de referência). Por exemplo, a determinação da humidade em formulações farmacêuticas por NIR requer a existência de um método já estabelecido e validado (e.g., titulação com reagente de Karl-Fischer). O erro associado ao método de referência escolhido, define também o erro mínimo aceitável para o erro correspondente ao método baseado em NIR.

1.2.2. Vibrações moleculares na região NIR

Os átomos numa molécula têm sempre múltiplos estados vibracionais, mesmo próximo da temperatura do zero absoluto (embora na escala de 10^{-9}–10^{-2} cm). O movimento dos átomos depende também da energia potencial formada entre os electrões e as forças repulsivas, principalmente electrostáticas, do núcleo (Bakeev, 2005).

À temperatura ambiente a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental de energia. Os átomos ou grupo de átomos envolvidos nas ligações químicas estão dispostos numa determinada frequência, que por sua vez depende da força da ligação e da massa individual dos átomos ou grupo de átomos envolvidos. As amplitudes das vibrações são de poucos nanómetros e aumentam com o aumento de energia transferida para a molécula (Pasquini, 2003).

As vibrações moleculares podem ser descritas por um modelo simplificado supondo um oscilador harmónico. É um modelo que falha pois os sistemas moleculares não podem assumir um perfil contínuo de energia previsto pelo modelo clássico (oscilador harmónico). Outra limitação imposta é o facto de só permitir transições entre níveis energéticos adjacentes, nos quais a diferença de energia é sempre a mesma. O modelo harmónico ajuda a perceber a espectroscopia vibracional embora imponha restrições, impossibilitando a ocorrência de sobretons e bandas de combinação de vibrações (Pasquini, 2003).

As transições em moléculas poli-atómicas para estados excitados (envolvendo dois modos vibracionais em simultâneo) são afectadas e não permitidas pela não harmonicidade do potencial. O papel das bandas de combinação no NIR são significativas. Os principais grupos funcionais que contribuem no espectro do NIR são C-H, N-H e O-H e S-H com contribuições adicionais dos grupos C=O e C=C influenciando a localização e forma das bandas de combinação a baixas frequências (4,000-5,500 cm^{-1}). Com isto não se conclua que a informação recolhida é limitada. Em moléculas poli-atómicas os modos normais de vibração podem envolver múltiplas ligações X-H em ambientes diferentes e as forças das ligações X-H individuais são significativamente afectadas pelo ambiente. Como já foi dito os únicos grupos funcionais capazes de gerar sobretons no espectro do NIR são: C-H, O-H, N-H e S-H (Bakeev, 2005). Em amostras biológicas as ligações C-H estão associadas com o conteúdo de gordura, as ligações N-H com o conteúdo de proteína e as ligações O-H com o conteúdo de água. Na região 800-1100 nm verifica-se uma ligação C-H a 936 nm e uma ligação de O-H a 975 nm (Brennan et al., 2003).

As absorções na região NIR são causadas por três mecanismos diferentes:

- sobretons de vibrações fundamentais da região infravermelha (4000-400 cm^{-1});
- combinações de vibrações fundamentais da região infra-vermelha;
- transições electrónicas (com menor importância).

Os sobretons são múltiplos das vibrações fundamentais. Cada vibração fundamental gera uma série de absorções conhecidas como sobretons (primeiro, segundo, terceiro...). A intensidade típica de um sobretom em relação a uma transição fundamental é de menos 10 a 100 vezes. Uma banda de combinação é gerada por um fotão cuja energia é partilhada por duas ou mais vibrações (que podem ser observadas individualmente na região de infra-vermelho (MIR)) (Naes et al., 2002). As transições electrónicas ocorrem na região entre 780-1100 nm (região do infra-vermelho próximo de onda curta - SW-NIR).

Os principais grupos funcionais de interesse são o metilo, metileno e metino (-CH3, -CH2-,=C- respectivamente). O espectro de misturas de hidrocarbonetos é dominado por dois pares de bandas fortes no primeiro sobretom e região de combinação (5900-5500 cm^{-1} e 4350-4250 cm^{-1}), predominantemente do metileno. Os hidrocarbonetos insaturados têm grupos C-H adjacentes a ligações duplas C=C. As vibrações C=C podem contribuir ligeiramente para as bandas de combinação e deslocar a absorção dos grupos C-H para comprimentos de onda superiores devido ao efeito nucleofílico. O grupo funcional éster (C=O) produz uma ligeira banda no espectro NIR apenas no segundo sobretom perto de 4650 cm^{-1}, que pode estar escondida devido aos efeitos de grupos C-H se estes estiverem presentes. O efeito dos grupos carbonilo na vizinhança da zona de absorção dos grupos C-H é muito significativo e as bandas dos grupos metileno e metilo são deslocadas para comprimentos de ondas superiores (Bakeev, 2005).

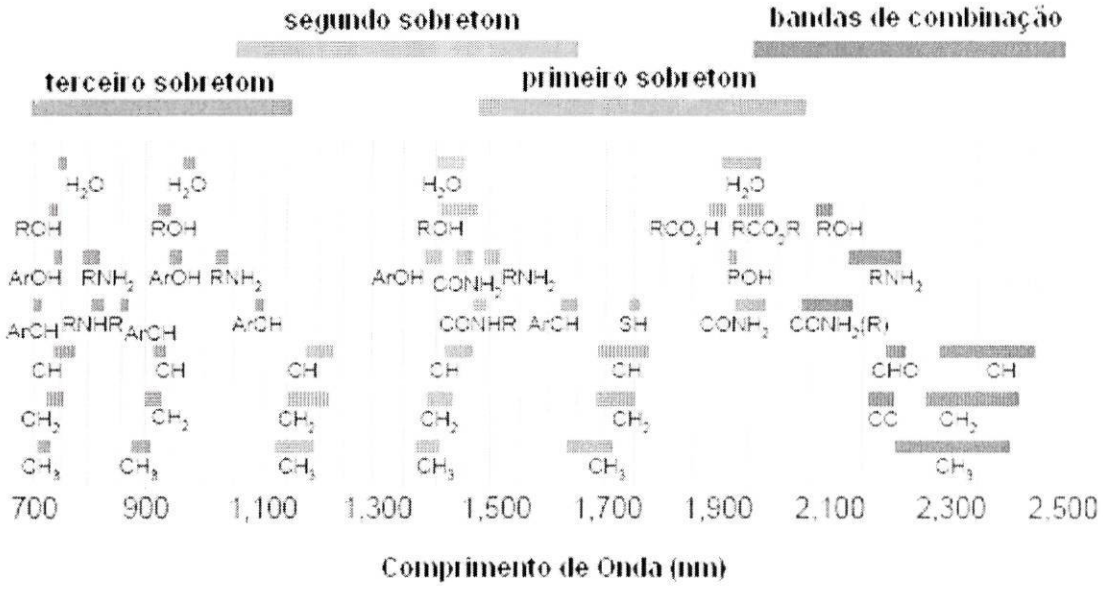


Figura 5. Mapa das principais bandas analíticas e localização no espectro na zona NIR (adaptado de Arnold et al., 2002).

Os álcoois e os ácidos orgânicos contêm o grupo funcional O-H que é o segundo grupo principal depois do C-H no espectro NIR. As contribuições mais significativas são combinações e sobretons dos modos de vibração, que aparecem nas zonas dos 5250-4550 cm^{-1} e 7200-6000 cm^{-1}. Estas bandas são fortemente influenciadas na forma, posição e intensidade pelo efeito das pontes de hidrogénio que dispersam as gamas das frequências de absorção e reduzem a intensidade da absorvância (Bakeev, 2005).

1.2.3. Instrumentação

Os instrumentos convencionais existentes para a obtenção de espectros NIR integrais podem ser agrupados em quatro classes distintas. O tipo mais comum é o monocromador de grelha de difracção(concepção mais antiga) (Bakeev, 2005).

Tabela 1. Características dos principais tipos de espectrómetros de infra-vermelho próximo.

Equipamento	Características
Monocromador de grelha de difracção	Robusto, peças móveis/mecânicas, alta razão sinal-ruído, concepção simples, barato, limitado na utilização de filtros ópticos.
Policromador (PDA)	Detecção do espectro simultâneo, vantagem de multiplexação, tempo de resposta curto, insensível a distorções espectrais (amostras não homogéneas atravessando o percurso óptico), sem peças móveis, custo reduzido.
Filtro sintonizável óptico-acústico (AOTF)	Sem peças móveis, utiliza um filtro acústico para modular a radiação.
Interferométrico (FT-NIR)	Tipicamente usados em IR, baseado no interferómetro (e.g., Michelson), baixa potência de saída (especialmente ajustado para IR), inclui modulador óptico, alta razão sinal-ruído, inclui peças móveis, sensível a vibrações.

O aparelho mais convencional para adquirir um espectro completo é o monocromador de grelha de difracção. É uma peça de equipamento robusta baseada num espelho côncavo controlado mecanicamente. Usando uma simples fonte de radiação de tungsténio-halogéneo é possível garantir uma elevada razão sinal-ruído embora existam algumas limitações: o registo do comprimento de onda é mecanicamente controlado (rede holográfica que pode detectar o espectro

de 2 a 2nm) e necessita de uma de fenda junto à fonte de radiação e outra à saída do sinal antes do detector. Para uma boa passagem dos feixes é necessário uma fenda suficientemente larga e para uma boa resolução óptica as fendas necessitam de ser apertadas. A escolha da largura da banda depende de qual dos parâmetros, resolução óptica ou razão sinal-ruído, é mais adequado.

Uma extensão deste aparelho é a utilização de um dispositivo de foto-díodos (PDA), que permite a obtenção de um varrimento de uma determinada zona do espectro instantaneamente em vez de um varrimento sequencial. O PDA permite um rápido tempo de resposta e manter a razão sinal-ruído elevado também. Devido à obtenção contínua de um espectro completo, as medidas em amostras não homogéneas não são afectadas por distorções espectrais. Não necessita de uma fenda à saída da fonte de radiação.

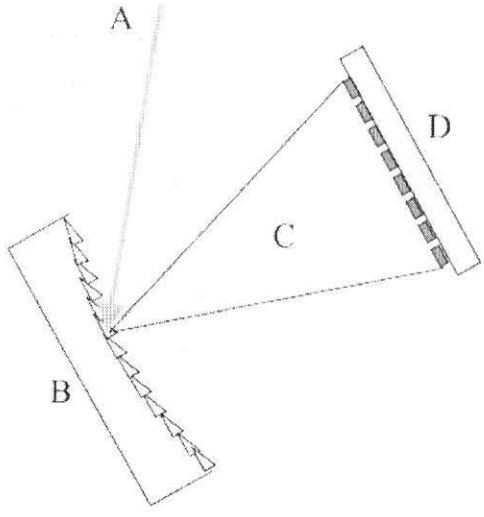


Figura 6. Esquema de um equipamento dispersivo com policromador (detector linear de foto-díodos, PDA).
Legenda: A) feixe incidente, B) grelha de difracção côncava, C) radiação D) detector linear de foto-díodos (adaptado de Pasquini, 2003).

Os primeiros detectores e mais comuns usados em processos NIR baseavam-se em dispositivos foto-condutores, altamente sensíveis e pouco dispendiosos. Apresentam como limitações a linearidade, saturação e velocidade de resposta (Bakeev, 2005).

Existem dois tipos básicos de foto-detectores, detectores térmicos e dispositivos fotónicos. Os dispositivos fotónicos dividem-se em detectores foto-condutores e foto-díodos. Os detectores térmicos têm alta sensibilidade e são mais utilizados em aplicações de infra-vermelho distante. Os

PDA permitem alcançar uma precisão de 0,05 nm no comprimento de onda e um tempo de resposta rápido originando baixos tempos de integração.

Outro tipo de aparelho é o filtro sintonizável óptico-acústico (AOTF), que também permite a obtenção de um espectro completo e não necessita de uma fenda à saída da fonte de radiação. O AOTF permite a obtenção de um espectro completo sem necessidade de fendas de entrada ou de saída. Tem como vantagens, um acesso muito rápido e variado ao comprimento de onda seleccionado. É muito aplicado em análise em aplicações de óleo de sementes e produção de tabletes (Bakeev, 2005).

Finalmente, em termos de aparelhos para obtenção de espectros completos, existe o baseado na transformada de Fourier (FT-NIR) (Bakeev, 2005).

O analisador transformada de Fourier não depende em nenhuma forma de selecção do comprimento de onda, mas sim num método capaz de codificar (modelar) a radiação. Desta maneira é possível medir simultaneamente todos os comprimentos de onda num único detector, desde a zona do infra-vermelho próximo à zona do infra-vermelho médio. É um detector muito utilizado na zona do infravermelho médio devido a não utilizar fendas, nenhum mecanismo de selecção de comprimento de onda e à modulação simultânea de todo o comprimento de onda. Não produz fenómenos que provoquem a dispersão da luz. Tem uma elevada precisão e estabilidade na modelação do comprimento de onda (Bakeev, 2005). A peça central de um aparelho deste tipo é o interferómetro.

Universalmente, são usadas lâmpadas de tungsténio-halogéneo como fontes radiação para espectroscopia NIR. São capazes de emitirem radiação para uma zona do espectro muito alargada, são pouco dispendiosas e possuem grande longevidade se operadas em condições de temperatura do filamento e voltagem da corrente apropriadas (Brennan et al., 2003; Bakeev, 2005). Um aspecto negativo é que a fonte de luz branca gera elevadas quantidades de calor (Brennan et al., 2003).

A introdução das fibras ópticas contribui para a enorme expansão da espectroscopia NIR (Büning-Pfaue, 2003), principalmente em aplicações industriais. Os cabos de fibra óptica permitem a transferência de luz de um ponto para outro sem necessidade dessa transferência ser em linha recta. Têm como princípio de funcionamento a reflexão total interna, o que faz com que feixe vá na direcção de um alto para um baixo índice refractário. A propagação da onda do feixe no interior da fibra óptica depende de diversos factores: diâmetro de entrada da fibra, comprimento da fibra, número de impurezas causando dispersão ou absorção (grupos -OH), absorção na ponta do interior da fibra (material utilizado) e a configuração da própria fibra. Todos estes factores devem ser considerados e relacionados com o custo, robustez e a quantidade de luz disponível na utilização de uma fibra óptica (Bakeev, 2005). O material das fibras ópticas é cuidadosamente

seleccionado para não conter impurezas com grupos –OH embora possam ocorrer absorções significativas devido à presença de um baixo número de impurezas. Estas absorções são sensíveis à temperatura em termos de forma, intensidade e posição. Se as condições não forem controladas pode levar à obtenção de espectros não reprodutíveis devido a distorções do espectro da amostra dificultando depois o processo de tratamento de dados.

1.2.4. Procedimentos de amostragem

As ocorrências espectrais na região NIR estão dominadas por absorções de bandas combinadas e sobretons (Pasquini, 2003; Brennan et al., 2003; Pons et al., 2004). Os grupos funcionais que aparecem na região do NIR são os que incluem o átomo de hidrogénio (e.g. C-H, N-H, O-H). Devido à baixa absortividade das vibrações (sobretons e bandas de combinação), a preparação convencional da amostra em termos de diluição não é necessária, levando à possibilidade de medições directas da amostra (espectroscopia in situ).

A amostragem depende de vários factores e deve ser específica para cada situação. A natureza física (e.g. temperatura, viscosidade) e química (e.g. se está em estado de equilíbrio, se é corrosiva) da amostra tem de ser considerada. O tipo de zona do espectro mais adequado para a amostra em causa, a possibilidade da análise *in-situ* ou a necessidade de transporte da amostra são exemplos de outros factores a considerar (Bakeev, 2005).

Existem diversos sistemas usados na amostragem, desde sistemas que extraem as amostras a sistemas de medição em linha ("in-line"). Os sistemas que extraem as amostras, com ajuda de uma bomba para um compartimento anexo onde a sonda se encontra colocada, permitem um bom controlo da temperatura embora apenas possam ser utilizados em amostras líquidas e em equilíbrio. Um desenvolvimento destes sistemas é a utilização de células de fluxo, que podem ser acopladas tanto nas fibras ópticas como à saída da fonte de radiação. Os sistemas de medição "in-line" utilizam sondas que podem realizar medidas de transmitância difusa, reflectância difusa, transflectância (Bakeev, 2005).

Com a utilização de sondas, não é necessário o transporte das amostras até ao detector. Como nenhum tipo de controlo da temperatura da amostra é realizado, em alguns casos pode ocorrer a deposição de partículas na lente das sondas obrigando a uma limpeza. A resistência da sonda é um parâmetro a ter em consideração, especialmente para utilizações industriais (Bakeev, 2005).

As amostras podem-se encontrar em diferentes estados e para cada um existe um sistema de medição adequado. De um modo geral, nas amostras no estado líquido utiliza-se o modo de transmitância, mas em estado sólido o modo de reflectância difusa é preferível.

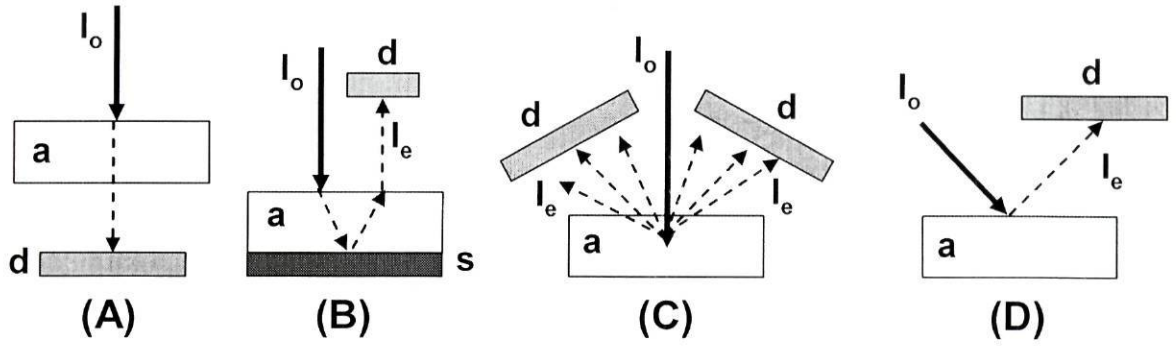


Figura 7. Modos de medição tipicamente utilizados em espectroscopia NIR (Io-feixe incidente, Ie-feixe emergente, a-amostra, s-superfície reflectora, d-detector).
Legenda: A) transmitância, B) transflectância, C) reflectância difusa, D) reflectância especular.

Em estados intermédios (e.g. lamas) são possíveis os modos de transmitância difusa ou reflectância difusa (Bakeev, 2005). A utilização da reflectância difusa como uma medida não destrutiva na região NIR, permite trabalhar com a amostra directamente sem ser necessário nenhum tipo de pré-tratamento. Nas amostras em estado líquido é necessário considerar parâmetros como o percurso óptico, temperatura, viscosidade e pressão da amostra. O percurso óptico escolhido depende da zona do espectro seleccionada para a análise. Em zonas perto de 4000-5000 cm^{-1} utilizam-se percursos ópticos pequenos (perto de 0,5 mm). Nas amostras em estados de pressão, viscosidade e temperatura elevados torna-se necessário a utilização de sistemas de amostragem capazes de controlarem estes parâmetros de forma a garantir um bom funcionamento do equipamento utilizado. Recentemente, várias técnicas NIR para monitorização de amostras líquidas foram propostas. Estas técnicas podem-se dividir em três grupos:

- "off-line" (e.g., medidas de transmitância em cuvetes, no laboratório);
- "at-line" (e.g., medidas de transmitância e transflectância directas com fibras ópticas na linha de produção);
- "on-line" (e.g., medidas de reflectância, transmitância e transflectância directas com fibras ópticas no equipamento de produção).

As medidas "on/in-line" permitem poupar no tempo de determinação, no custo e trabalho laboratorial. Tem como desvantagem a utilização de fibras ópticas que provocam diminuição da precisão (Büning-Pfaue, 2003).

Especialmente em amostras no estado sólido, no modo de reflectância difusa, existem efeitos de dispersão da luz. Nestes casos é recomendado a utilização de um detector mais sensível. A homogeneidade de uma amostra sólida é um parâmetro muito difícil de garantir, ao

contrário de uma amostra líquida. Este tipo de amostragem envolve manipulação e transporte da mesma afectando a reprodutibilidade da recolha (Bakeev, 2005).

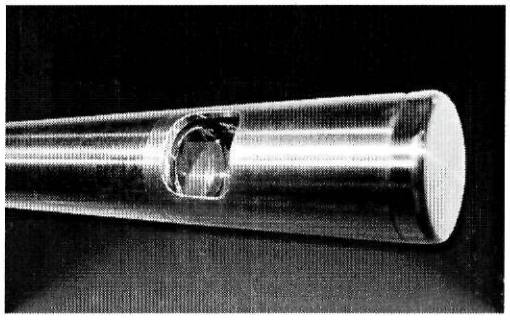


Figura 8. Ampliação da ponta de uma sonda de transflectância (adaptado de www.oceanoptics.com).

1.3. Quimiometria

A necessidade de ferramentas matemáticas que possam por um lado lidar com a natureza multivariada dos dados obtidos espectroscopicamente assim como o estabelecimento de relações que não obedecem a leis de primeiros princípios (relações empíricas) foram causas da fraca utilização da espectroscopia NIR antes dos anos 70. O aparecimento da quimiometria deu um novo impulso à utilização da radiação NIR em aplicações quantitativas e qualitativas. A quimiometria pode ser definida como a "ciência que relaciona medidas de um sistema químico ou processo químico com o estado do sistema através da aplicação de métodos matemáticos ou estatísticos" (definição segundo a International Chemometrics Society). A utilidade das ferramentas de quimiometria reside na possibilidade de extrair a informação presente no espectro de uma forma muito eficiente, permitindo relacionar os padrões espectrais com variações de propriedades químicas e físicas das amostras. A análise espectral requer a aplicação de métodos matemáticos multivariados. Para além disso a dificuldade de interpretação física de um espectro NIR sugere a aplicação de ferramentas matemáticas empíricas. Por este motivo ferramentas como a análise de componentes principais para desvendar padrões espectrais e as redes neuronais e mínimos quadrados parciais para modelos de regressão têm sido profusamente utilizados nos anos recentes.

1.3.1. Pré-processamento espectral

Cada espectro NIR contém uma grande quantidade de informação tanto a nível químico como físico. A extracção dessa informação de forma útil requer a aplicação de técnicas de pré-processamento e de processamento espectral. Define-se aqui pré-processamento à aplicação de métodos correctivos de interferências causadoras de variação na aquisição dos espectros. A maioria dos espectros necessita de pré-processamento para remoção de defeitos (Büning-Pfaue, 2003) e interferências (Chen et al., 2004). As perturbações físicas com especial incidência para o fenómeno de dispersão de luz podem ser indesejadas quando se pretende avaliar a composição química de uma amostra. Nesse caso é necessário aplicar um método correctivo capaz de eliminar essa interferência física. Noutras situações, como por exemplo na determinação de tamanhos de partículas por NIR, esse efeito pode ser vantajoso. Da aplicação concreta deve sair o método de pré-processamento mais ajustado. Os dados recolhidos de instrumentos analíticos diferentes também necessitam de tratamento por uma ou mais operações antes de se obterem os resultados pelos modelos químiométricos (transferência de calibração) (Martens e Naes, 1992).

O pré-tratamento dos dados, na sua grande maioria, melhora o modelo embora seja necessário entender o tipo de tratamento utilizado de foram a usá-lo da melhor maneira. Descrevem-se de seguida os tipos de pré-processamento usualmente utilizados em espectroscopia, nomeadamente na espectroscopia NIR.

1.3.1.1. Remoção da média ("mean-centering")

Esta operação envolve a subtracção da resposta de cada variável sobre a resposta média dessa variável nos dados em todas as amostras. A operação de remoção da média pode ser representada pela equação 1.

$$\mathbf{X}_{MC} = \mathbf{X} - \mathbf{I}_M * \mathbf{x}_M \qquad (1)$$

Na equação 1, $\mathbf{X}$ é a matriz de espectros, $\mathbf{X}_{MC}$ os dados centrados, $\mathbf{x}_M$ é um vector que contém os valores médios de cada coluna de $\mathbf{X}$ e $\mathbf{I}_M$ é a matriz identidade com dimensão M (sendo M o número de colunas de $\mathbf{X}$).

A operação de remoção da média remove a intensidade absoluta da informação de cada variável, tornando possível focar-se nas variações da resposta. O objectivo da remoção da média é eliminar dos dados o valor da intensidade de cada variável revelando apenas as flutuações dos dados em redor do valor médio. Numa regressão linear simples o efeito da remoção da média corresponde ao desaparecimento da ordenada na origem.

Existem algumas aplicações onde a remoção da média não é aconselhável e pode ser vantajoso manter a informação toda dos dados durante a parte de modelação (Bakeev, 2005).

1.3.1.2. Auto-normalização ("autoscaling")

Este procedimento é uma extensão do procedimento de remoção da média. É um pré-tratamento que consiste na operação de remoção da média seguido pela divisão das intensidades resultantes pelo desvio padrão das variáveis e pode ser representado pela equação 2:

$$\mathbf{X}_{as} = (\mathbf{X} - \mathbf{I}_M * \mathbf{x}_M) * \mathbf{S}_M^{-1} \qquad (2)$$

Na equação 2, **X** representa a matriz dos espectros, $\mathbf{X}_{as}$ representa os dados auto-normalizados, $\mathbf{S}_M$ a matriz diagonal quadrada contendo os desvios padrão normalizados de cada variável (M é o número de colunas de **X**).

Os dados normalizados têm a característica única de que cada variável tem uma média zero e um desvio padrão de um. A auto-normalização, como a remoção da média, remove a informação da intensidade absoluta embora também remova a informação da variância total de cada uma das variáveis, colocando cada variável em igualdade de circunstância. Este passo é útil se o objectivo é que cada variável tenha peso semelhante.

A auto-normalização é normalmente necessária em casos onde os dados resultam de diferentes tipos de instrumentos ou quando as unidades das medidas não são iguais para todas as variáveis. Nestes casos, se não se realizar a auto-normalização, as variáveis com a amplitude maior vão tender a dominar o processo de modelação e aquelas com amplitude menor vão tender a ser ignoradas. A auto-normalização também pode ser usada, quando todas as variáveis tiverem as mesmas unidades ou quando resultarem dos mesmos instrumentos embora se a informação da variância total for relevante para a resolução do problema seja de evitar (Bakeev, 2005).

1.3.1.3. Derivação (filtro de Savitzky-Golay)

Em dados em que as variáveis são expressas numa propriedade física contínua (e.g. dados espectroscópios, onde a propriedade é a absorvância ou transmitância), as derivadas podem ser usadas para remover variações da linha de base entre as amostras. Esta operação envolve a derivação matemática de uma função, sendo a função o espectro de uma amostra em vários comprimentos de onda. A derivação é feita usando uma fórmula discreta. No entanto, em aplicações de química analítica onde os dados se encontram de forma digitalizada, algumas formas discretas de filtros denominadas Savitzky-Golay podem ser usados para calcular as derivadas. Estes filtros são essencialmente funções locais que são aplicadas para cada espectro.

O uso destes filtros necessita da especificação de alguns parâmetros, que definem a resolução da função local. A aplicação das derivadas é feita após o filtro.

Em aplicações espectroscópias, a primeira derivada remove as variações aditivas da linha de base do espectro nos perfis espectrais, logo a primeira derivada pode ser utilizada onde as variações offset da linha de base entre as amostras são comuns.

Os filtros exponenciais e de média deslizante consideram aproximações lineares ao sinal. Contudo alguns sinais podem ser melhor modelados com aproximações quadráticas ou cúbicas. Por exemplo sinais que envolvem picos. Uma aproximação cúbica de um sinal **x** no ponto i é dada pela equação 3.

$$\mathbf{x}_i = c_0 + c_1 i + c_2 i^2 + c_3 i^3 \qquad (3)$$

O filtro de Savitzky-Golay é uma versão simplificada porque os coeficientes c_i são tabelados. O filtro consiste na determinação de uma sequência de passos: decidir a ordem do filtro (máximo expoente na equação 3), decidir o tamanho do filtro (dimensão da janela) e obter os coeficientes c_i a partir dos valores tabelados e dividindo-os por uma constante (dependente da ordem e do tamanho da janela do filtro).

A Tabela 2 contém os coeficientes do filtro para tamanhos de janela até 9 pontos e até ordem 5. Notar que os coeficientes para ordem 2 e 3 são idênticos assim como os coeficientes para as ordem 4 e 5. Estes coeficientes divididos pela correspondente constante de normalização devem ser usados na equação 3. Dá-se como exemplo a aplicação a um ponto $\mathbf{x}_i$ de um filtro quadrático/cúbico com um tamanho de janela de 5 pontos.

$$\hat{\mathbf{x}}_i = -3/35\mathbf{x}_{i-2} + 12/35\mathbf{x}_{i-1} + 17/35\mathbf{x}_i + 12/35\mathbf{x}_{i+1} - 3/35\mathbf{x}_{i+2} \qquad (4)$$

Tabela 2. Coeficientes do filtro linear Savitzky-Golay (c_j) para serem usados na equação 3 (adaptado de Brereton, Chemometrics:data analysis for the laboratory and chemical plant, Wiley, New York, USA, 2003)

Tamanho da janela (j)	5	7	9	7	9
	Quadrático/Cúbico			Quarto/Quinto	
-4			-21		15
-3		-2	14	5	-55
-2	-3	3	39	-30	30
-1	12	6	54	75	135
0	17	7	59	131	179
1	12	6	54	75	135
2	-3	3	39	-30	30
3		-2	14	5	-55
4			-21		15
Constante normalização	35	21	231	231	429

No texto, os parâmetros do filtro serão descritos de acordo com a notação (a,b,c) onde a é o tamanho do filtro, b a ordem do polinómio e c a ordem da derivada.

1.3.1.4. Correcção multiplicativa de sinal (MSC)

Este pré-tratamento tem sido usado em muitas aplicações NIR de reflectância difusa e em outras aplicações onde existem variações multiplicativas entre os perfis de resposta das amostras. Em espectroscopia, estas variações podem ser causadas por diferenças no percurso óptico das amostras ou em consequência de processos de dispersão de luz ("light-scattering"). As variações multiplicativas não podem ser removidas apenas pelo processo de derivação, remoção da média ou auto-normalização. A MSC segue a equação 5.

$$\hat{\mathbf{X}}_{ik} = \frac{(\mathbf{X}_{ik} - \mathbf{a}_i)}{\mathbf{b}_i} \qquad (5)$$

Na equação 5, $\mathbf{X}_{ik}$ é o espectro referência, **a** é um factor multiplicativo de correcção, **b** é um factor de correcção aditivo. Os factores **a** e **b** são estimados usando um método de regressão linear. O modelo MSC assume que qualquer espectro da amostra pode ser estimado como um múltiplo de um espectro de referência mais um valor aditivo (Martens e Naes, 1992).

O espectro de referência é muitas vezes considerado como o espectro médio de um conjunto de amostras. Contudo, de forma a não remover informação química relevante é necessário seleccionar as zonas espectrais cuja variação se deve apenas a efeitos instrumentais e fenómenos físicos. Apenas essa região deve ser usada na estimativa dos parâmetros **a** e **b**.

Uma extensão proposta por Harald Martens ao MSC foi designada por EMSC ("extended MSC"). O EMSC consiste na remoção do espectro, de alguns padrões gerados por fenómenos físicos e químicos (e.g. eliminação do componente devido à água num espectro em solução aquosa) (Martens et al., 2003).

1.3.1.5. Variação padrão normal (SNV)

Este método foi descrito por Barnes et al., (1989). O processamento por SNV é descrito pela equação 6.

$$\tilde{X}_{ik} = \frac{(X_{ik} - m_i)}{s_i} \qquad (6)$$

Na equação 6, X_{ik} é o valor da absorvância para o comprimento de onda k relativo à amostra i, m_i é a média de cada espectro i e s_i é o desvio padrão das absorvâncias relativas ao espectro i. Este pré-tratamento é focado em muitas aplicações espectroscópias. A operação SNV tal como MSC realiza um ajusto aditivo e multiplicativo embora os factores de correcção sejam determinados de um modo diferente. Para cada espectro da amostra o desvio ajustado é simplesmente a média de todos os valores sobre todas as variáveis e o ajustamento multiplicativo é o desvio padrão dos valores de todas as variáveis. O método SNV realiza-se num espectro por tempo e não necessita do uso de um espectro de referência. O SNV melhora a precisão de previsão mas não simplifica o modelo e não reduz a influência da água nem as interferências sistemáticas. O efeito do processamento SNV é muito semelhante ao MSC.

1.3.1.6. Correcção ortogonal de sinal (OSC)

A correcção ortogonal do sinal é um método desenvolvido para reduzir os efeitos de dispersão de luz e eliminação de padrões não relevantes para uma determinada utilização do espectro. A ideia é eliminar efeitos que não se correlacionam com uma determinada propriedade com interesse (**Y**). Toda a informação relevante para essa propriedade deve permanecer no espectro. Num primeiro passo são calculados pesos (**W**) de tal forma que o vector dos componentes (**t**= **X*****W**) descreva a máxima variância mas sendo não correlacionado com **y**. Depois

de calculado o **t**, o seu efeito é removido de **X** e o processo é repetido. Em geral apenas um pequeno número de componentes é necessário (Wold et al., 1998).

O pré-processamento de dados OSC tem como objectivo reduzir a variação em **X** não correlacionada com o parâmetro de interesse. Este pré-processamento remove elevadas quantidades de informação sem remover a informação relacionada com a variação do analito em causa (Sjöblom et al., 1998), também corrige os dados com base na concentração do analito e é uma ferramenta de soluções aplicável para este objectivo (Bertran et al., 2001). As variações aleatórias em espectros NIR aquosas têm de ser removidos antes da aplicação do OSC (Chen et al., 2004).

1.3.2. Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta básica muito utilizada na quimiometria, sendo talvez a ferramenta mais utilizada em tratamento dos dados ("data-mining") (Martens e Naes, 1992).

Em espectroscopia, o PCA reduz o espectro original para um número limitados de factores independentes. Estes factores expressam as variações principais dos espectros.

Em processos em que existe redundância ou correlação entre as variáveis é conveniente reduzir o número de variáveis para um conjunto mais restrito que contenha tanta informação ou pelo menos uma quantidade importante de informação daquela contida no conjunto original de variáveis. O processo de classificação pode então ser derivado a partir de um número mais pequeno de variáveis o que aumenta a robustez do processo sem que haja perdas do conteúdo em informação.

As variáveis derivadas das originais são designadas por componentes principais (PC's). O procedimento de PCA faz uma partição da variância nos componentes principais sendo que cada componente principal é calculado por forma a reter a maior quantidade de variância presente nas variáveis originais. O primeiro componente principal é calculado por forma a reter a maior quantidade possível de variância, o segundo é calculado da mesma forma tendo sido retirada dos dados originais a variância já contabilizada pelo primeiro componente e assim sucessivamente até serem obtidos tantos componentes principais quantas as variáveis originais. Os primeiros componentes principais retêm a maior parte da variância e factores como ruído ou correlação são descritos pelos restantes componentes. Matematicamente cada componente principal, é uma combinação linear das variáveis originais (ver equação 7).

$$t=x_1p_1+x_2p_2+\cdots+x_ip_i \quad (7)$$

Geometricamente os componentes principais (**t**) podem ser vistos como projecções dos dados originais sobre eixos ortogonais (pesos ou "loadings", **p**) que cobrem o espaço das variáveis (**x**). Os componentes contêm informação sobre as diferenças que existem ao nível dos objectos (e.g., medidas ou observações experimentais). Deste modo se o objectivo da análise é a classificação de objectos, então os gráficos uni-dimensionais ou bi-dimensionais com os componentes são os mais apropriados. A informação contida nos pesos permite analisar a correlação existente entre as variáveis (neste caso a dimensão do comprimento de onda). Gerando mapas semelhantes aos mapas de componentes principais agora com os pesos, obtêm-se pontos que representam variáveis. O grau de correlação entre as variáveis é proporcional ao cosseno do menor ângulo entre os pesos de quaisquer duas variáveis (considerando apenas os primeiros componentes principais). Assim num mesmo mapa de pesos é possível visualizar em simultâneo a correlação entre todas as variáveis (se for garantido que esse mapa contabiliza uma quantidade de variância suficiente). Pontos que estejam próximos indicam forte correlação positiva enquanto que pontos diagonalmente opostos indicam forte correlação negativa (Lopes, 2001).

Em termos matriciais o modelo PCA pode ser escrito através da equação 8.

$$X=T*P^t+E \quad (8)$$

Se considerarmos um conjunto de dados espectrais, então a matriz **X** contém os espectros (amostra vs comprimento de onda), a matriz **T** os componentes principais (amostra vs nº comprimento de onda), a matriz **P** os pesos (comprimento de onda vs nº comprimento de onda) e a matriz **E** os resíduos (amostra vs comprimento de onda).

1.3.3. Mínimos quadrados parciais (PLS)

O modelo de mínimos quadrados parciais (PLS) é também uma ferramenta básica muito utilizada em quimiometria (Geladi e Kowalsky, 1986; Denham, 1995). Em espectroscopia, o algoritmo PLS é baseado em dois conjunto de dados: espectros e correspondente propriedade química. O objectivo da regressão PLS é estabelecer um modelo que permita a análise de amostras desconhecidas (determinação de um propriedade física ou química a partir do espectro) (Büning-Pfaue, 2003). O número de componentes do PLS é reduzido quando é aplicado o MSC e OSC embora a precisão de previsão não melhore (Chen et al., 2004).

O critério subjacente ao modelo PLS é o de maximização da correlação entre as variáveis independentes (**X**) e a variável dependente ou variáveis dependentes (**Y**) (Geladi e Kowalsky, 1986; MacGregor et al., 1994; Denham, 1995; Trygg e Wold, 1998). O modelo constrói um conjunto de variáveis regressoras escolhidas de modo sequencial cuja condição é a de maximizarem a covariância entre o bloco **X** e o bloco **Y** e serem independentes. Olhando o modelo de uma forma simples pode entender-se como uma regressão entre os componentes principais de ambos os blocos. Os coeficientes do modelo PLS (pesos) são estimados usando um método iterativo (e.g., NIPALS). Isto significa que os componentes são estimados sequencialmente. O modelo PLS pode ser descrito pelas equações 9 e 10.

$$\mathbf{X}=\mathbf{T}^{*}\mathbf{P}^{t}+\mathbf{E}_{X} \quad (9)$$

$$\mathbf{Y}=\mathbf{U}^{*}\mathbf{Q}^{t}+\mathbf{E}_{Y} \quad (10)$$

Os coeficientes **P** e **Q** são determinados de forma a maximizarem a correlação entre os componentes **T** e **U**. As duas matrizes de componentes são relacionadas através de uma regressão linear.

$$\mathbf{U}=\mathbf{T}^{*}\mathbf{b}+\mathbf{e} \quad (11)$$

No PLS a matriz de pesos é gerada através de um processo iterativo. A matriz **W** contém a covariância entre os blocos **X** e **Y** para cada componente. A equação 12 pode ser usada para estimar o vector de regressão para o modelo PLS ($\mathbf{S}_{XX}=\mathbf{X}^{t}\mathbf{X}$ e $\mathbf{S}_{XY}=\mathbf{X}^{t}\mathbf{Y}$) (Lopes, 2001).

$$\mathbf{b}_{PLS}=\mathbf{W}(\mathbf{W}^{t}\mathbf{S}_{XX}\mathbf{W})^{-1}\mathbf{W}^{t}\mathbf{S}_{XY} \quad (12)$$

O vector de regressão pode ser usado para obter estimativas da variável dependente.

$$\mathbf{Y}_{NOVO}=\mathbf{X}^{*}\mathbf{b}_{PLS} \quad (13)$$

A projecção de novos dados espectrais ($\mathbf{X}_{novo}$) no modelo PLS gera novos componentes, resíduos e correspondente previsão ($\mathbf{Y}_{novo}$).

$$\mathbf{T}_{NOVO}=\mathbf{X}_{NOVO}^{*}\mathbf{P} \quad (14)$$

$$\mathbf{E}_{NOVO}=\mathbf{Y}_{NOVO}-\mathbf{X}_{NOVO}^{*}\mathbf{b}_{PLS} \quad (15)$$

Nos modelos PLS os componentes são designados por variáveis latentes.

1.3.4. Calibração

O estabelecimento de uma relação entre um espectro NIR e uma propriedade da amostra é conseguido através do processo de calibração. Devido à necessidade de se utilizarem múltiplos comprimentos de onda o tipo de regressão é multivariada. O procedimento usual de calibração utilizando espectros NIR envolve:

- selecção de amostras representativas;
- análises de referência (obtidas da propriedade a modelar com um método estabelecido – método de referência);
- espectros das amostras (NIR);
- pré-tratamento dos dados, nomeadamente dos espectros;
- modelos estatísticos – quimiométricos;
- validação de metodologias.

1.3.5. Validação cruzada

Dada a natureza multivariada dos modelos baseados em PCA ou PLS é necessário ajustar a dimensão desses modelos (ou seja, o número de componentes principais ou variáveis latentes respectivamente) a cada conjunto de dados em particular. Esta necessidade advém de o número de graus de liberdade nestes modelos ser muito elevado tipicamente (existem mais parâmetros a estimar do que relações independentes), nomeadamente quando se usam espectros. A dimensão desses modelos deverá ser ajustada de modo a que a generalização (aplicação dos modelos a um conjunto de dados não usados na estimativa dos parâmetros - calibração) seja a melhor possível.

Quando o número de ensaios disponíveis é muito elevado, opta-se por dividir esse conjunto em dois sub-conjuntos: o primeiro (tipicamente 70%) usa-se para calibrar o modelo e o segundo (restantes 30%) usa-se para testar o modelo. Quando o número de ensaios é limitado, opta-se por uma estratégia de validação interna (validação cruzada). A operação de validação cruzada envolve um ou mais procedimentos internos de validação. Em cada procedimento, faz-se a remoção de parte dos dados de calibração, utilização os restantes para construção do modelo (calibração) e consequente aplicação dos dados removidos (validação). Como esta operação não utiliza os mesmos dados para a construção e teste do modelo, permite estimar os modelos de uma forma mais próxima da óptima. Existem diferentes tipos de validação cruzada, sendo os mais usados os de remoção de ensaios em blocos contíguos, em blocos aleatórios ou individualmente ("leave-one-out").

O tipo de validação cruzada utilizada nesta Tese foi o "leave-one-out" (LOO) e foi utilizado para estimar o número óptimo de variáveis latentes em modelos PLS. Neste método são realizadas

várias sub-validações. Consideremos um conjunto de dados contendo N amostras. Cada uma das N amostras é removida dos dados de calibração. É gerado um modelo com as restantes N-1 amostras. A amostra que foi retirada é projectada nesse modelo obtendo-se uma previsão. Essa previsão é comparada com o valor experimental correspondente a essa amostra, obtendo-se um erro de previsão. Devido a realizar N procedimentos de validação, este procedimento pode demorar algum tempo, caso N seja demasiado grande (dependendo da velocidade de processamento do computador utilizado). Não existe a preocupação das amostras validadas serem todas representativas pois o método testa modelos que usam todas (N-1) e não apenas uma parcela de amostras para a calibração. É um método simples pois não necessita da introdução de quaisquer parâmetros.

Uma forma de calcular o erro de um modelo PLS com um determinado número de variáveis latentes é o RMSECV ("root mean square error of cross validation"). O cálculo do RMSECV é dado pela equação 16, sendo $\mathbf{y}_i$ o valor experimental da variável dependente relativo a cada amostra i, $\hat{\mathbf{y}}_i$ o valor previsto pelo modelo e N o número total de amostras. Notar que cada $\hat{\mathbf{y}}_i$ é obtido por um modelo distinto (gerado com as restantes N-1 amostras).

$$\text{RMSECV}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N}(\hat{\mathbf{y}}_i-\mathbf{y}_i)^2}{N}} \qquad (16)$$

O RMSEC é calculado de forma semelhante com a diferença de que apenas um modelo é gerado com as N amostras, e testado com essas N amostras. Neste caso, o RMSEC decresce com o aumento do número de variáveis latentes. Isto acontece, uma vez que o melhor modelo corresponde ao modelo contendo o número máximo de variáveis latentes (modelo equivalente ao modelo de regressão linear múltipla). Quanto maior a variância incorporada no modelo, melhor a previsão correspondente. No entanto, este aumento do ajuste é aparente e só acontece especificamente para as amostras utilizadas. O erro de generalização não acompanha geralmente o erro de calibração. A partir de um determinado número de variáveis latentes o RMSECV deixa de ser aproximadamente proporcional ao RMSEC. O RMSEC não pode por isso ser usado para optimizar o número de variáveis latentes em modelos PLS.

1.4. Supervisão multivariada

A ideia básica do controlo estatístico é a de que é possível com base na informação disponível capturar o comportamento do sistema quando este está a operar em condições

nominais. Durante a operação futura do processo esta pode ser comparada com a operação em condições nominais através da projecção no modelo obtido com base na situação nominal (Martin e Morris, 1996a). Existem diversos métodos descritos que possibilitam o acompanhamento em-linha dos processos assegurando um estado designado normal ao longo do tempo (Yabuki e MacGregor, 1997; Grznar e Booth, 1997; Kassidas et al., 1998; Chen et al., 1998). Os mais correntemente utilizados na indústria são métodos gráficos donde se destacam os gráficos de Shewart, EWMA ou CUSUM (Ogunnaike e Ray, 1994). O problema dos métodos univariados é o de não considerarem as relações entre as variáveis.

É conhecida a utilização de modelos bilineares (e.g., PCA) na monitorização de processos descontínuos (Martin e Morris, 1996a; Wise e Gallagher, 1996) e de processos contínuos (Martin e Morris, 1996b, Chen e McAvoy, 1998; Chen et al., 1998, Wachs e Lewin, 1999). O método de PCA é adequado à modelação de processos contínuos devido à estrutura dos dados ser bidimensional (dimensões: variável × tempo). O modelo MPCA (análise de componentes principais multi-dimensional) é uma adaptação da técnica de PCA a processos descontínuos (dimensões tempo × variáveis × ensaios). No caso da monitorização com espectroscopia a dimensão variáveis é substituída pela dimensão comprimento de onda. Matematicamente contudo não existe qualquer diferença.

A função última da monitorização multivariada é a de melhorar o processo de detecção de falhas ou anomalias na operação do processo. Idealmente pretende-se que o processo decorra dentro de limites considerados aceitáveis. Já se referiu que estes limites são baseados na experiência da condução do processo e por isso extraídos tendo como base um conjunto de ensaios considerados para o efeito. Existem na monitorização multivariada dois casos distintos a considerar quando um ensaio ou uma amostra individual difere dos ensaios ou amostras nominais: 1) a variação observada é explicada no modelo e 2) a fonte de erro não é explicada pelo modelo.

O primeiro caso verifica-se quando se comparam os componentes obtidos do conjunto nominal com os componentes do novo ensaio e estes diferem significativamente (o termo significativamente resulta da adopção de um limite estatístico onde se estabelece um nível de significância). Neste primeiro caso a variação verificada no ensaio também existe no conjunto nominal (embora eventualmente em menor extensão). O segundo caso descreve a situação onde se verifica um erro mas este não está a ser identificado pelos componentes principais. O modo de lidar com uma situação deste tipo consiste em comparar os resíduos obtidos para o conjunto nominal com os resíduos do novo ensaio. Em ambas as situações é necessário considerar limites estatísticos de detecção ou seja calcular regiões em que supondo um determinado nível de confiança se assegure que o processo pode ser considerado em estado nominal.

1.4.1 Estatística de Hotelling (T^2)

A estatística de Hotelling é baseada na distância de Mahalanobis. É utilizada para monitorizar os componentes do modelo PCA (T). A equação 17 é usada para obter a estatística para uma amostra i correspondente a um componente $\mathbf{t}_i$.

$$\mathbf{T}_i^2=\mathbf{t}_i\mathbf{S}_{TT}^{-1}\mathbf{t}_i^t \qquad (17)$$

Na equação 17, $\mathbf{S}_{TT}=\mathbf{T}^t\mathbf{T}$ é a matriz da covariância do conjunto de calibração. O limite de confiança para um nível de significância de 100(1-α) é dado pela equação 18.

$$T_\alpha^2=\frac{r\left(n^2-1\right)}{n(n-r)}F_{\alpha,r,n-r} \qquad (18)$$

Na equação 18, n é o número de amostras de calibração, r é o número de componentes principais e F o valor crítico da estatística F de Snedecor para r e n graus de liberdade e apropriada significância.

1.4.2. Estatística da soma do quadrado dos erros (Q)

A estatística da soma do quadrado dos erros (Q) revela a falta de ajuste do modelo para cada amostra. O vector erro de previsão para cada amostra i é dado por $\mathbf{e}_i=\mathbf{y}_i-\mathbf{x}_i\mathbf{b}_{PLS}$. A estatística **Q** para uma amostra i é dada pela equação 19.

$$\mathbf{Q}_i=\mathbf{e}_i\mathbf{e}_i^t \qquad (19)$$

O limite de confiança para esta estatística é estimado através da distribuição do $\chi 2$ se os resíduos forem independentes e normalmente distribuídos ($\mathbf{Q}_i = g\chi_h^2$ sendo $h=2m^2/v$ e $g=v/(2m)$ e m a média dos valores da estatística **Q** para as amostras de calibração e v a correspondente variância) (Nomikos e MacGregor, 1995). O limite de confiança para um nível de significância de 100(1-α) é dado pela equação 20.

$$Q_\alpha=gh\left(1-\frac{2}{9h}+z_\alpha\left(\frac{2}{9h}\right)^{\frac{1}{2}}\right)^3 \qquad (20)$$

1.5. Aplicações NIR em processos de tratamento de águas residuais

Não existem muitas aplicações de espectroscopia NIR em processos ambientais devido essencialmente à enorme complexidade da matriz (presença de muitas espécies químicas, grande parte das quais desconhecidas em termos de concentração) e os problemas inerentes a variações de composição da mesma. Em 2002, Stephens e Walker propõem para um efluente muito bem caracterizado quimicamente a utilização de NIR para estimativa de BOD (Stephens e Walker, 2002), sendo uma das poucas aplicações NIR para estimativa de parâmetros ambientais publicada. Outras aplicações da tecnologia NIR em processos ambientais são: a caracterização do desempenho de SBR através da análise dos microrganismos (Amaral, 2003; Casellas et al., 2004), a caracterização de águas residuais (Pons et al., 2004), o tratamento de resíduos corantes industriais num SBR (Gonçalves et al., 2005), sensores na determinação de BOD (Liu et al., 2000), a medição de BOD, COD, TS, TSS (Holm-Nielsen et al., 2006), a influência da morfologia dos microrganismos no espectro NIR (Vaidyanathan et al., 2003).

O NIR é um método muito útil para a monitorização em tempo real e para o controlo de parâmetros como por exemplo a caracterização de algumas espécies químicas envolvidas numa fermentação (Lopes et al., 2004b, Büning-Pfaue, 2003). Uma outra aproximação é considerar o espectro como uma impressão digital do processo e usar ferramentas de tratamento dados como o PCA para realizarem o diagnóstico do processo de maneira a revelarem mudanças bruscas no processo que podem ser prejudiciais para a qualidade do bio-processo (Vaidyanathan et al., 2001).

1.5.1. Tratamento de efluentes da indústria de lacticínios por NIR

A determinação dos principais constituintes de leite é muito importante em diferentes produtos de indústria láctea. Os métodos de referência para a determinação de gordura, proteína e caseína são dispendiosos, tanto financeiramente como em termos de tempo. Além disso, mesmo utilizando um número muito pequeno de amostras no modelo de calibração, o modo de transmitância da tecnologia NIR apresenta ser um método válido e de confiança na determinação de gordura e constituintes de azoto no leite (Wählby e Skjöldebrand, 2001) bem como na análise de queijo/leite em termos de gorduras, proteínas e açúcares (Laporte e Paquin, 1999; Sasic e Ozaki, 2001) e na gordura total no leite (Brennan et al, 2003). A espectroscopia NIR pode ser usada para estimar a composição de leite crú (Kukačková et al., 2000).

Sasic e Ozaki (2001) desenvolveram um estudo para determinação de gorduras, proteínas e lactose no leite com espectroscopia SW-NIR e mínimos quadrados parciais (ver Figura 9). Os

resultados demonstraram um coeficiente de correlação de 0.996 para a gordura. Os resultados para a proteína total e lactose foram menos bons, em parte porque a contribuição para as bandas SW-NIR destas moléculas é menos intensa do que a das gorduras.

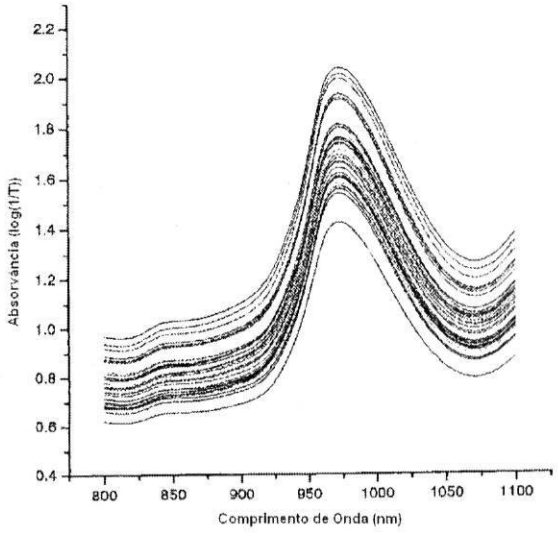


Figura 9. Espectros de infra-vermelho próximo (onda curta) obtidos para amostras de leite (adaptado de Sasic e Ozaki, 2001).

Pode-se concluir através dos vários estudos realizados em especial nas últimas duas décadas que a espectroscopia NIR já desempenha um papel muito útil no controlo de processos industriais (em especial em aplicações "at-line"). A aplicação da tecnologia NIR, dadas as suas características, pode melhorar o controlo da produção, aumentando a qualidade do produto e melhorando o controlo na produção (Čurda e Kukačková, 2004).

Capítulo 2. Materiais e Métodos

Nesta secção descrevem-se os métodos analíticos utilizados assim como os procedimentos envolvidos na operação do reactor SBR e a aquisição de espectros NIR.

2.1. Aquisição de espectros

2.1.1. Aquisição de espectros NIR

O modelo NIR 512 da Ocean Optics é um equipamento de NIR dispersivo contendo um detector arrefecido (InGaAs) tipo PDA com uma gama entre 900-1800 nm. É um equipamento portátil (sem peças móveis). Uma sonda de transflectância (Ocean Optics/T300RT) liga-se por intermédio de fibras ópticas (OceanOptics/QP400-2-VISNIR) a uma fonte de luz (Stellarnet/SL1) e ao espectrómetro NIR. Por sua vez, o espectrofotómetro ligou-se através de um cabo USB 2.0 a computador (PC). Os espectros NIR são adquiridos através de um programa informático do fabricante do equipamento (OOIBase32/Ocean Optics) e posteriormente gravados em formato digital (formato Galactic - .spc). O feixe proveniente da fonte de radiação atravessa a amostra tal como ilustrado na Figura 10.

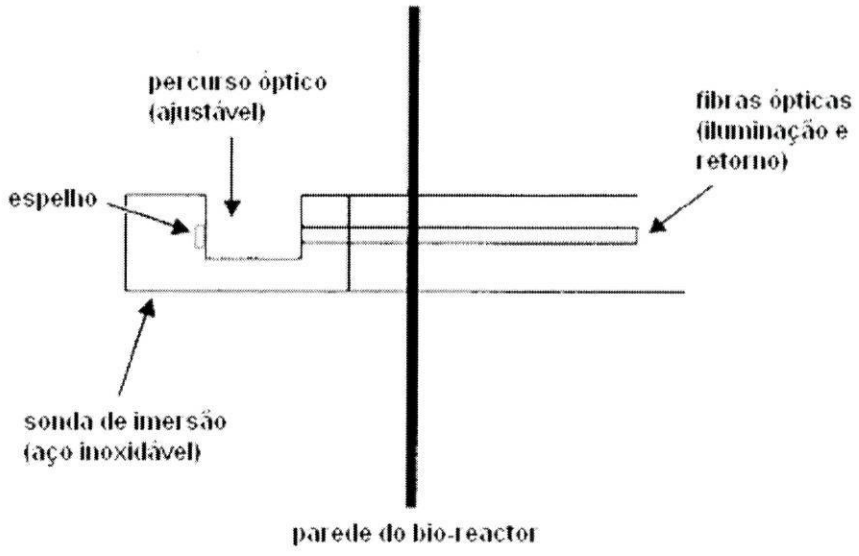


Figura 10. Esquema da sonda de transflectância usada para monitorização *in-situ* do reactor de lamas activadas.

O percurso óptico é duas vezes o valor da abertura mecânica da sonda de transflectância. O feixe de retorno é enviado para o detector do NIR512. O espectrofotómetro NIR512 encontra-se ligado ao computador através de ligação USB sendo a aquisição e monitorização espectral imediatas. O software permite a visualização dos espectros resultantes e o seu armazenamento no computador.

O primeiro passo de configuração do software consiste na calibração do detector, realizando um branco (referência) e um preto (correcção quando não há passagem de luz). Existem outros parâmetros que convém serem fixados de acordo com o objectivo pretendido, como o tempo de integração, a média dos espectros, tipo de filtro e a temperatura do detector. A temperatura do detector foi fixada a -4°C. Todas estas características são específicas para cada experiência e dependem essencialmente do tipo de amostra. O tempo de integração é o tempo que o detector demora a acumular informação: quanto maior o tempo maior a informação recebida e mais intenso o sinal. O filtro aplicado justifica-se por forma a eliminar algum ruído presente nos espectros, especialmente quando o tempo de integração é baixo. Por forma a remover pequenas flutuações de linha de base são armazenados médias de espectros. Quanto maior o número de espectros usados para cálculo da média menor o ruído.

O equipamento usado lista-se a seguir:

- fonte de Luz (Stellarnet/SL1): fonte de radiação visível e infravermelho de tungsténio/halogénio com lente colimadora;
- espectrofotómetro NIR (Ocean Optics/NIR 512): inclui detector linear InGaAs com arrefecimento integrado (até menos 30°C da temperatura ambiente com precisão ±0.1°C; grelha de difracção entre 900-1700 nm; conexão USB2.0);
- sonda de transflectância (Ocean Optics/T300RT): contém duas fibras ópticas de 300 microm (uma para iluminação e outra para leitura) e uma lente planar-convexa acoplada a uma ponta de leitura de 5mm de percurso mecânico fixo (10mm de percurso óptico);
- fibras ópticas (OceanOptics/QP400-2-VISNIR): fibras (premium grade) contendo baixo conteúdo em radicais OH para utilização na região de infra-vermelhos (400 µm de diâmetro óptico);
- software de aquisição: OOIbase32 / Ocean Optics.

2.1.2. Aquisição de espectros NIR de onda curta (SW-NIR)

Os espectros SW-NIR são obtidos com um equipamento da StellarNet (ISA-2000) de fibras ópticas. Este equipamento está montado numa placa ISA que é ligada directamente dentro do PC de aquisição. Este equipamento pode ser ligado a um acessório de cuvetes para leitura de transmitância. Pode também ser usado com a sonda de transflectância descrito anteriormente. Os espectros são adquiridos através de um programa informático do fabricante do equipamento

(SpectraWiz/StellarNet) e posteriormente gravados em formato digital (formato Galactic, .spc). O feixe proveniente da fonte de radiação interage com a solução no interior da cuvete e depois a interacção resultante é enviada para o detector através de fibras ópticas para o detector inserido no computador. O detector (Stellarnet/ISA2000) encontra-se inserido no computador e o software permite a visualização dos espectros resultantes e o seu armazenamento no computador.

O primeiro passo de configuração do software consiste na calibração do detector, realizando um branco (referência) e um preto (correcção quando não há passagem de luz). Existem outros parâmetros que convém serem fixados de acordo com o objectivo pretendido, como o tempo de integração, a média dos espectros e filtro. Todas estas características são específicas para cada experiência e dependem essencialmente do tipo de amostra.

O material usado foi:

- fonte de Luz (Stellarnet/SL1-CUV): fonte de radiação visível e infravermelho de tungsténio/halogénio com lente colimadora e acessório para cuvetes de quartzo (10 mm de percurso óptico);
- espectrofotómetro NIR (Stellarnet/ISA2000): espectrofotómetro de ligação directa a PC através de placa ISA montado num conversor A/D. Inclui detector CCD Sony ILX511 com grelha de difracção optimizada para 500-1200 nm (shortwave NIR);
- software de aquisição: SpectraWiz/Stellarnet;
- suporte para cuvetes (SL1-CUV);
- fibras ópticas (200 µm).

2.2. Reactor de lamas activadas (SBR)

2.2.1. Descrição do reactor

O reactor utilizado para o processo de lamas activadas é de vidro em forma cilíndrica com as seguintes dimensões : 100 mm de diâmetro externo e 185 mm de altura. A espessura da parede é de cerca 3 mm. A tampa possui 6 orifícios, 2 com diâmetro de 10 mm, 3 com diâmetro de 7 e 1 com diâmetro de 15 mm (Figura 11). O volume útil do reactor é de aproximadamente 1 L.

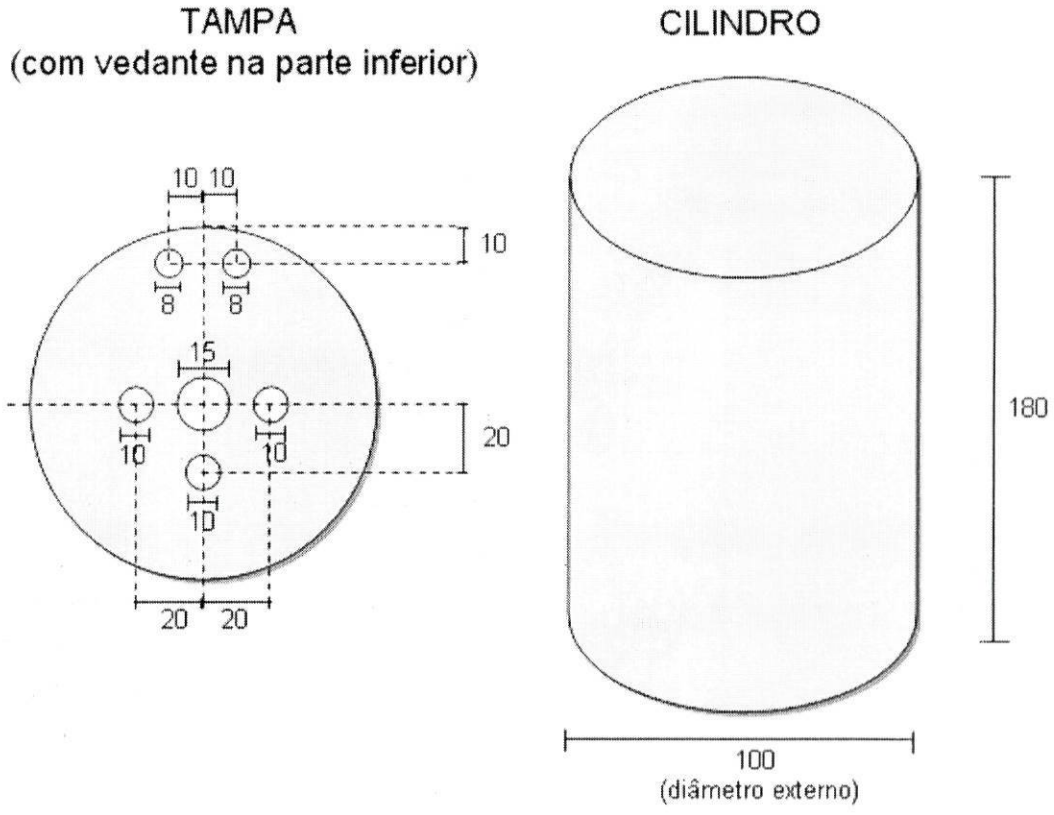


Figura 11. Esquema do reactor de escala laboratorial utilizado para execução dos ensaios de tratamento de resíduos lácteos por lamas activadas.

2.2.1.1. Montagem do reactor

A montagem do reactor para a produção das experiências é constituído, por: 2 bombas peristálticas, 2 recipientes de plástico com capacidade de 5 L, 1 placa de agitação, 1 barra magnética, 1 bomba de ar (Elite 803), 1 sonda de transflectância, 1 fonte de luz, 1 espectrofotómetro (NIR/SW-NIR), fibras ópticas, 1 reactor de vidro e 1 computador.

As bombas peristálticas realizam a carga e a descarga do efluente para os recipientes respectivos (com activação e desactivação controlada com temporizadores previamente programados). A placa de agitação com a barra magnética e a bomba de ar provocam a agitação, bem como a oxigenação do meio no reactor. A sonda encontra-se inserida no reactor com a ponta a uma distância 100 mm do fundo.

O esquema utilizado está descrito na Figura 12.

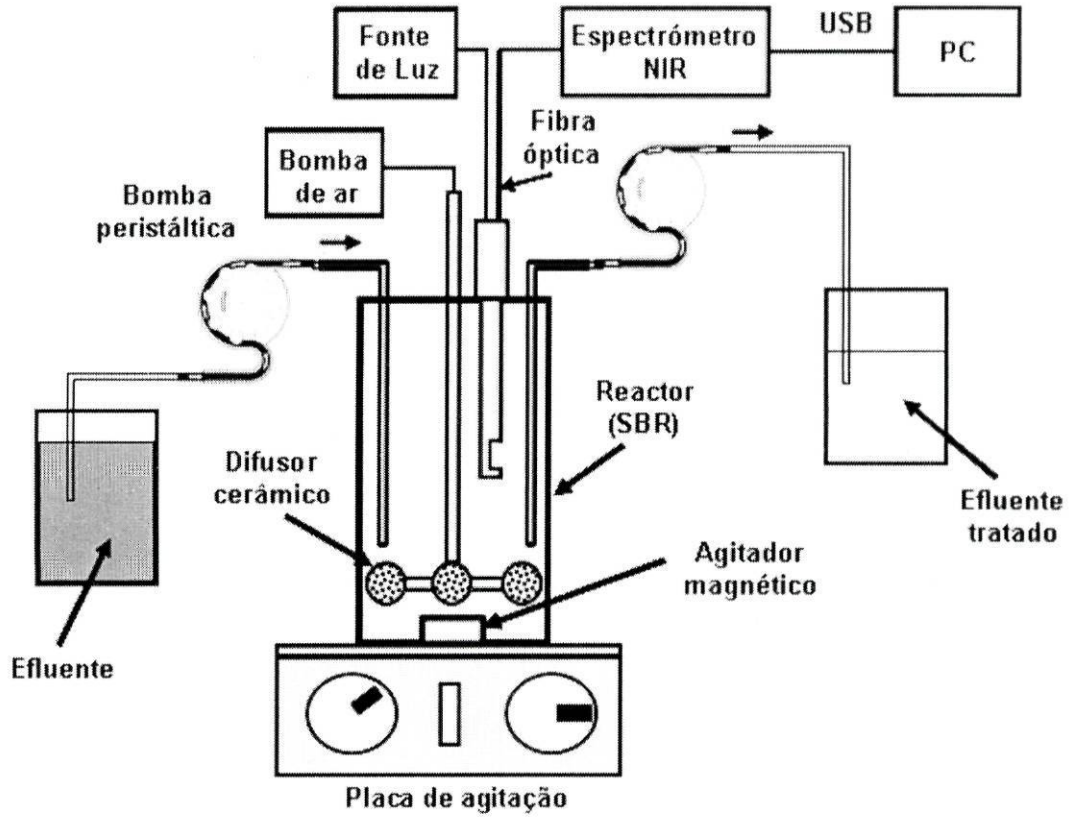


Figura 12. Esquematização do sistema utilizado para tratamento do efluente (reactor SBR).

A bomba de ar utilizada foi uma bomba de ar de aquário (Elite 803) que debita para uma saída única com um caudal aproximadamente de 100 L/h. À saída da bomba ligou-se uma cruzeta com quatro orifícios, à qual se ligaram quatro difusores cerâmicos cilíndricos. Também se utilizou agitação através de uma placa de agitação e barra magnética de 50 mm.

2.2.1.2. Inoculação do reactor

O inóculo utilizado é proveniente da ETAR de uma queijaria em Oliveira de Azeméis (Queijo Universal). A ETAR consiste num reservatório inicial anaeróbio seguido de dois tanques arejados em série (lamas activadas). O inóculo foi retirado directamente de um dos tanques de arejamento. Uma pequena parte do inóculo foi utilizada para inoculação do reactor e o resto foi armazenado no frigorífico a uma temperatura aproximadamente de 4ºC para utilização posterior eventual. Utilizou-se outro inóculo proveniente de um reactor laboratorial de lamas activadas a funcionar em contínuo (Escola Superior de Biotecnologia, Porto) só para o estudo referente à avaliação do desempenho do SBR.

O reactor foi inoculado com 50 ml de inóculo (diluído 5x totalizando 250 ml), isto referente ao inóculo proveniente da queijaria. Quanto ao inóculo proveniente da Escola Superior de Biotecnologia, o reactor foi inoculado com 250 mL de inóculo (sem diluição). A ambos os reactores

perfez-se o volume até 1 L com leite magro "Pingo Doce" (750 mL diluídos 100x). Inicialmente foi introduzido gradualmente metade da carga do leite diluído, seguido do inóculo e passado umas horas foi introduzida a outra metade do leite da carga. No orifício central da tampa do reactor foi introduzido o tubo de arejamento.

2.2.1.3. Ciclos de operação

O reactor funcionou a ciclos de 24h. A Figura 13 esquematiza cada ciclo do reactor. Na primeira fase do ciclo, a sedimentação (a) realizou-se durante 2h. A segunda fase, descarga (b) realizou-se durante 1,5 h e a terceira fase, carga (c) durante 1,5 h. A última fase, reacção (d) durante 19 h. Nas fases (a) e (b) o arejamento e a agitação estão desligados.

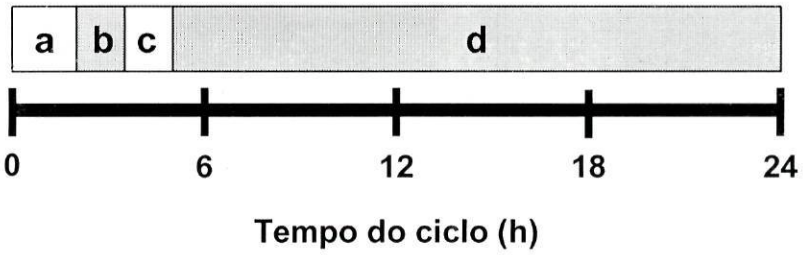


Figura 13. Esquema descritivo das fases do ciclo do reactor SBR.

Legenda: a-sedimentação, b-descarga, c-carga, d-reacção.

2.3. Determinação de sólidos suspensos totais (TSS)

Com o auxílio de uma pinça, pesou-se um cadinho seco e à temperatura ambiente com um papel de filtro e anotou-se o peso (m_i). Filtrou-se 5 mL de solução (V) para o cadinho com ajuda de uma bomba de vácuo e colocou-se o cadinho na estufa a uma temperatura próxima de 103-105 °C. Deixou-se evaporar toda a solução até peso constante (aproximadamente 6 horas) e colocou-se o cadinho no excicador para arrefecer até temperatura ambiente. Repete-se a pesagem do cadinho (m_f). Para o cálculo dos sólidos suspensos totais foi usada a equação 21.

$$TSS\ (g/L) = (m_f - m_i) / V \qquad (21)$$

2.4. Determinação de sólidos totais (TS)

Com o auxílio de uma pinça, pesou-se um cadinho seco e à temperatura ambiente anotou-se o peso (m_i). Pipetou-se 5 mL de solução (V) para o cadinho e colocou-se o cadinho na estufa a uma temperatura próxima de 103-105 °C. Deixou-se evaporar toda a solução do cadinho até peso

constante (aproximadamente 6 horas). Depois da solução ter evaporado colocou-se o cadinho no excicador para arrefecer até temperatura ambiente. Repete-se a pesagem do cadinho (m_f). Para o cálculo dos sólidos totais foi usada a equação 22.

$$TS\ (g/L) = (m_f - m_i) / V \qquad (22)$$

2.5. Determinação da carência química de oxigénio (COD)

Preparou-se soluções padrão de hidrogenoftalato de potássio (KHP) com concentrações equivalentes a 0, 100, 200, 400, 500 e 600 mg O_2/L. Ligou-se previamente o digestor de COD. Para cada tubo de digestão, pipetou-se 2,50 mL de padrão e 1,50 mL de solução de digestão. A solução digestora vai desencadear a oxidação da matéria orgânica e inorgânica oxidável. Depois pipetou-se 3,50 mL de solução catalisadora e colocou-se a tampa nos tubos. Agitou-se um pouco com cuidado e colocou-se os tubos no digestor no programa respectivo (148°C durante 2 h). No final deixou-se os tubos arrefecerem e ligou-se o espectrofotómetro. Mediu-se a absorvância a 620 nm. Realizou-se uma curva de calibração com os padrões de KHP.

A preparação das amostras envolveu 5 min de centrifugação a 2000 rpm e posteriormente adicionou-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado ao sobrenadante e colocou-se no frigorífico.

Para a determinação do COD das amostras realizou-se o mesmo protocolo da preparação das soluções padrão. Através da curva de calibração calculou-se o valor de COD das amostras.

Lista de reagentes utilizados:

- solução de digestão (500 mL H_2O desionizada; 4,913 g $K_2Cr_2O_7$; 167 mL H_2SO_4 concentrado; 33,3 g $HgSO_4$);
- solução catalisadora (4,5 g $AgSO_4$; 1000 mL de H_2SO_4 concentrado);
- ácido sulfúrico concentrado.

2.6. Medição da densidade óptica (UV/Vis)

Utilizou-se um fotómetro Hitachi U-2000 para realizar medições de densidade óptica nas gamas do visível e ultra-violeta de amostras de efluente tratado (sobrenadante obtido após a sedimentação das lamas, no fim do ciclo de operação do reactor). Pipetou-se aproximadamente 5 mL de solução do SBR e leu-se a absorvância a 254, 285 e 510 nm. A mesma solução foi depois centrifugada a 2000 rpm durante 5 min e leu-se a absorvância aos mesmos comprimentos de onda. Utilizou-se água desionizada como branco.

2.7. Software

2.7.1. Aquisição de espectros

O SpectraWiz da StellarNet Inc foi utilizado para aquisição de espectros SW-NIR (equipamento SW-NIR ISA-2000 da StellarNet Inc). O OOIBASE32 da Ocean Optics foi utilizado para aquisição de espectros NIR (equipamento NIR512 da Ocean Optics).

2.7.2. Tratamento de resultados

O MATLAB, versão 6.5 Release 13 (The Mathworks, Inc) foi utilizado para tratamento dos dados, construção e validação dos modelos quimiométricos. As funções de quimiometria incuídas nas ferramentas de PLs para Matlab (Toolbox de PLS, Eigenvector Research, Inc) foram usadas para gerar os modelos PLS e PCA.

Capítulo 3. Condições Operatórias

Esta secção descreve os principais resultados obtidos para os estudos preliminares de monitorização do efluente lácteo com NIR e SW-NIR assim como os estudos de garantia de condições apropriadas para monitorização *in-situ* do reactor por NIR.

3.1. Monitorização do efluente lácteo

Avaliou-se a capacidade de monitorização do efluente por SW-NIR e NIR em termos de concentração de leite. Pretende-se avaliar a possibilidade de utilização da espectroscopia NIR e SW-NIR para inferir a carga orgânica presente nos efluentes a tratar, na gama de concentrações que será utilizada nos ensaios de tratamento com o SBR. A monitorização eficiente do efluente é obviamente um parâmetro muito importante para o controlo e bom funcionamento de uma ETAR.

3.1.1. Monitorização por SW-NIR

Este estudo teve como objectivo a monitorização do efluente simulado (leite magro diluído) a diferentes concentrações utilizando o equipamento SW-NIR (StellarNet/ISA2000) é possível correlação entre as diferentes concentrações e o respectivo espectro. O equipamento utilizado permitiu monitorizar o efluente na gama de comprimento de onda 600 a 1050 nm. A gama de concentração de leite magro estudada foi 0, 1, 2, 3 e 4% (v/v). Como tal utilizaram-se os resultados obtidos em 4 dias (dia 19, 20, 21 e 26/04/06). Este estudo teve como principal objectivo avaliar a capacidade de monitorização de amostras de leite diluído (com aproximação a um efluente de indústria de lacticínios) através de SW-NIR. O procedimento foi descrito na secção de materiais e métodos para o equipamento SW-NIR (secção 2.1.2).

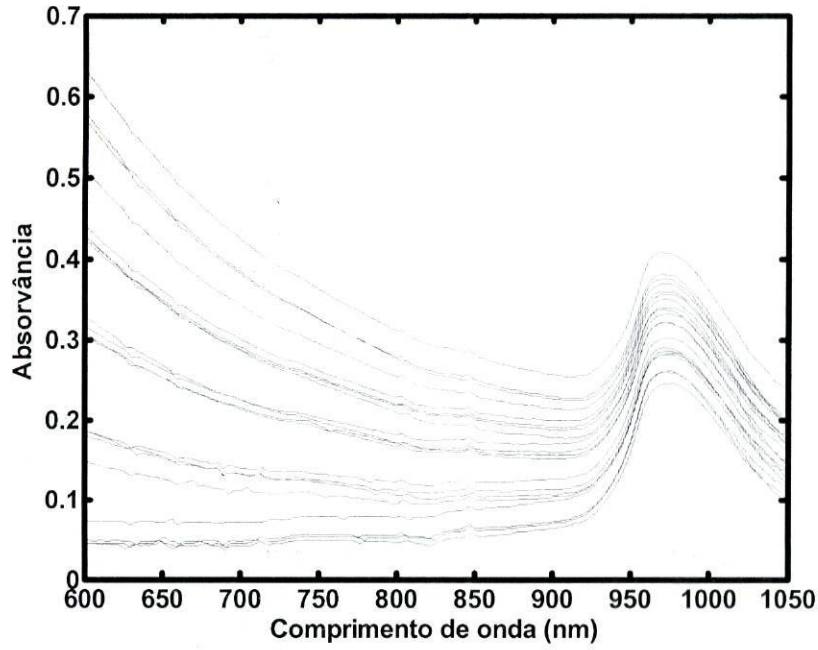


Figura 14. Espectros normais obtidos do efluente a diferentes concentrações em 4 dias.

É possível visualizar os espectros obtidos das amostras sem nenhum pré-processamento a diferentes concentrações na Figura 14. Verifica-se um aumento da linha de base dos espectros com o aumento da concentração do efluente. Este aumento poderá ter a ver com o aumento de partículas na amostra, nomeadamente partículas de matéria gorda cujo efeito é um aumento na dispersão de luz.

Os espectros foram adquiridos pelo método anteriormente explicado. Utilizou-se o PLS com o objectivo de correlacionar o espectro ou certas zonas do espectro com os valores de concentração do efluente. Os espectros e os valores de concentração do efluente foram centrados na média. O número de variáveis latentes foi estimado através de validação cruzada LOO.

A Figura 15 ilustra o resultado obtido com validação cruzada para diferentes números de variáveis latentes. Através da realização da validação cruzada, como demonstra a Figura 15, foram escolhidas seis variáveis latentes para o modelo (mínimo do erro). O RMSECV obtido foi de 0.0019 para seis variáveis latentes. Verifica-se, neste caso a existência de um mínimo evidente na curva de validação cruzada.

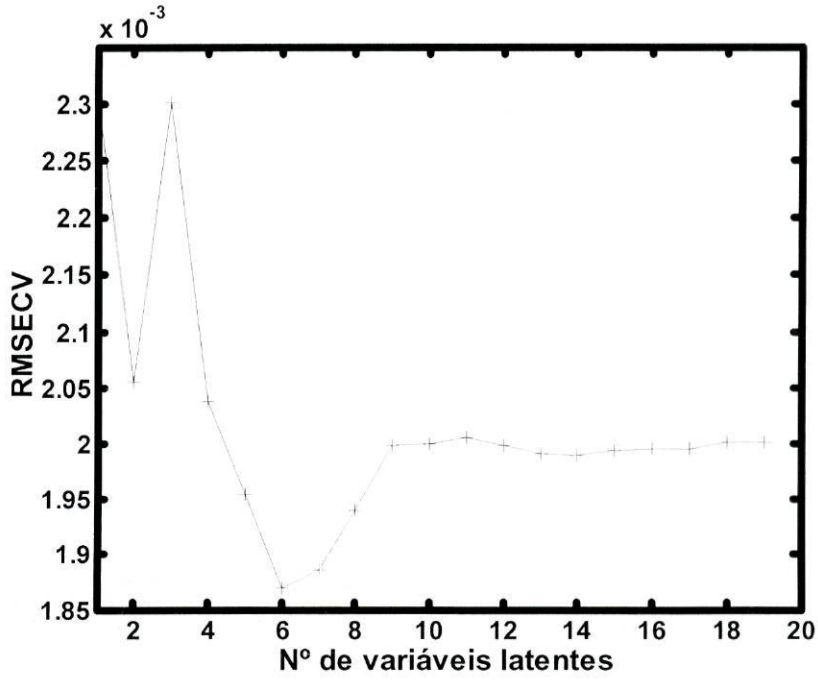


Figura 15. Erro da validação cruzada em função do número de variáveis latentes

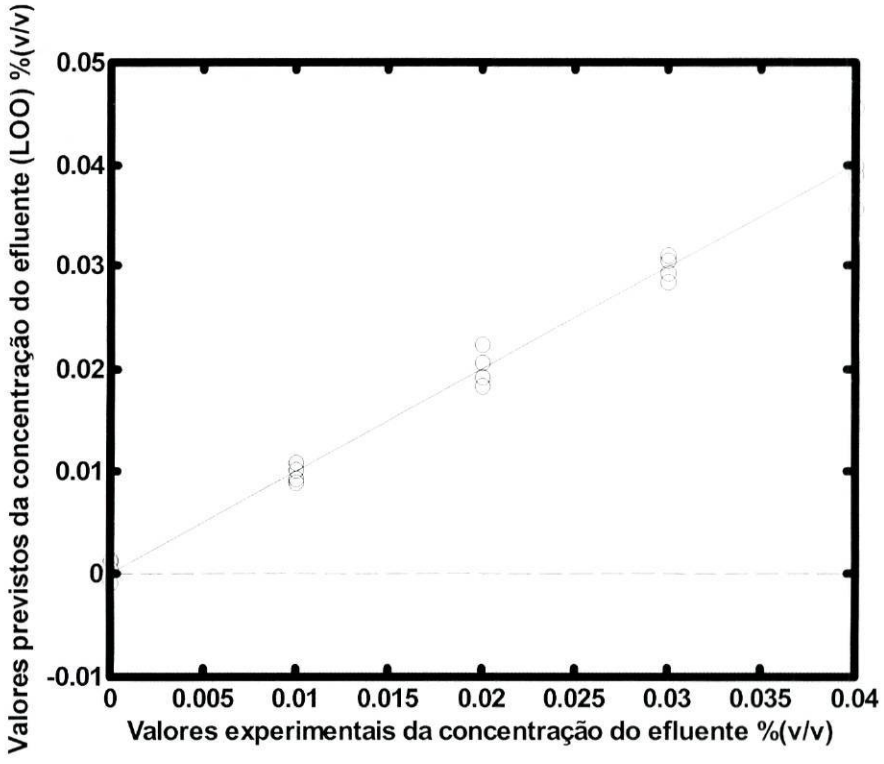


Figura 16. Valores de concentração do efluente em % (v/v) medidos em função valores de concentração do efluente previstos pelo modelo PLS (valores da validação cruzada)

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 16 em função dos valores previstos pelo modelo PLS com 6 variáveis latentes. É de realçar o erro obtido pelo modelo que é muito baixo (RMSECV=0.0019). É possível concluir que o equipamento utilizado é capaz de monitorizar as concentrações de efluente utilizado mesmo considerando uma gama de variação de concentrações relativamente curta.

3.1.2. Monitorização por NIR

O objectivo deste estudo foi a monitorização do efluente (leite magro diluído) a diferentes concentrações utilizando o equipamento NIR. Pretende-se avaliar a existência de uma possível correlação entre as diferentes concentrações de leite diluído e o espectro NIR. O equipamento utilizado permitiu monitorizar o efluente numa gama ampla de comprimentos de onda (900 a 1700 nm). A gama de concentração de leite magro estudada foi 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% (v/v).

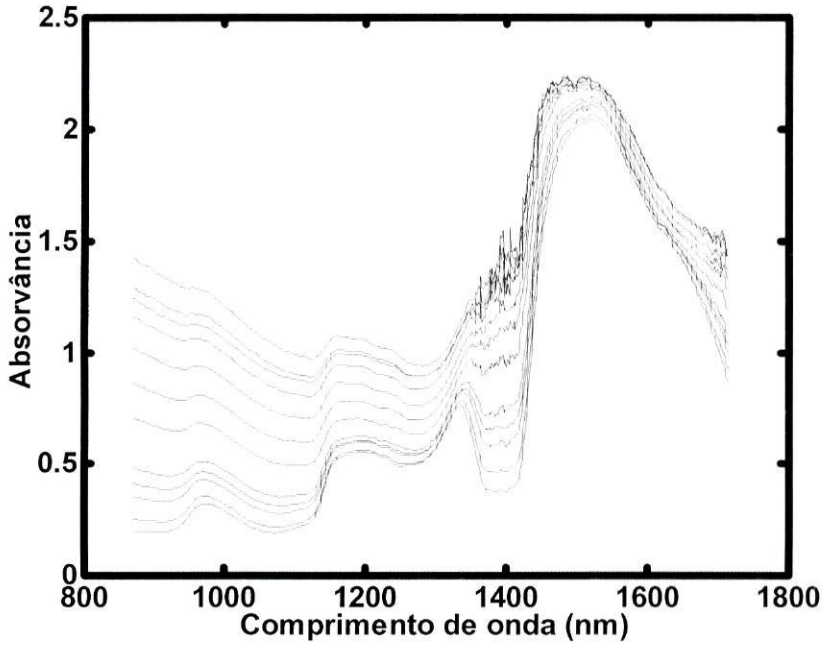


Figura 17. Espectros normais obtidos do efluente a diferentes concentrações

É possível visualizar os espectros obtidos sem nenhum pré-processamento das amostras de leite diluído a diferentes concentrações na Figura 17. Verifica-se um aumento em termos de absorvância da linha de base dos espectros com o aumento da concentração do efluente, tal como anteriormente observado para o SW-NIR.

Os espectros foram adquiridos pelo método anteriormente detalhado (secção 2.1.1). Utilizou-se o PLS com o objectivo de correlacionar o espectro ou certas zonas do espectro com os

valores de concentração do efluente. Os espectros foram pré-processados utilizando um filtro de Savitzky-Golay (23,2,0) e correcção multiplicativa de sinal (MSC).Os valores de concentração do efluente foram centrados na média. O número de variáveis latentes foi estimado através de validação cruzada LOO.

A Figura 18 ilustra o erro obtido com validação cruzada para diferentes números de variáveis latentes.

Através da realização da validação cruzada, como demonstra a Figura 18, escolheu-se sete variáveis latentes para o modelo. O RMSECV obtido foi de 0.0017 para sete variáveis latentes. Como é possível verificar o erro não é muito inferior se aumentarmos o número de variáveis latentes. Embora o valor mínimo do erro se obtenha com mais do que sete variáveis, considerou-se este número uma vez que o decréscimo do erro não é significativo a partir daí. Considerar mais variáveis latentes traria um aumento da complexidade do modelo sem grande benefício em termos de previsão.

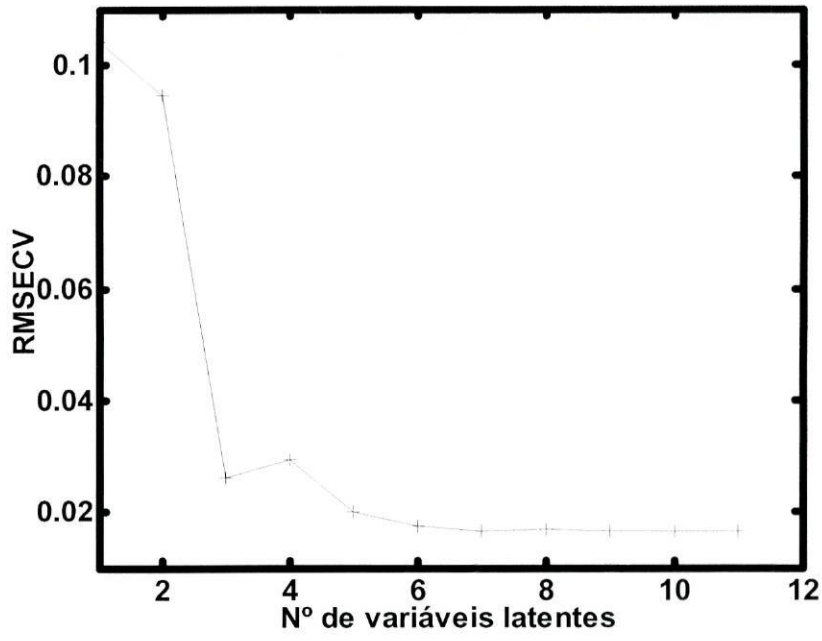


Figura 18. Erro da validação cruzada em função do número de variáveis latentes

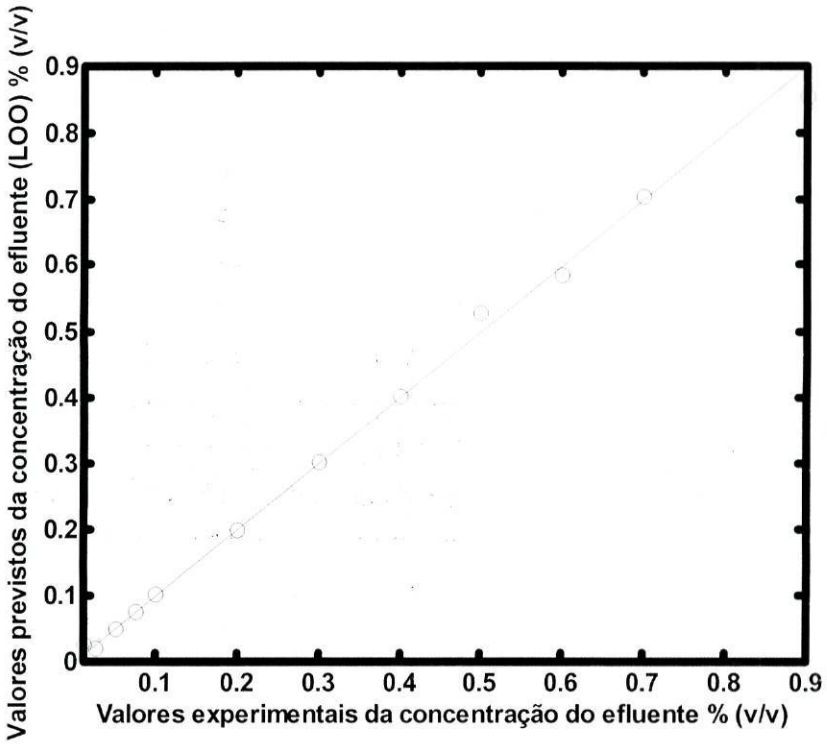


Figura 19. Valores de concentração do efluente em % (v/v) medidos em função valores de concentração do efluente previstos pela validação cruzada

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 19 em função dos valores previstos pelo modelo. É de realçar o erro obtido pelo modelo que é muito baixo numa gama de concentrações ampla. O erro obtido do modelo é ligeiramente inferior ao erro obtido pelo outro equipamento (SW-NIR). É possível concluir que o equipamento utilizado é capaz de monitorizar as concentrações de efluente utilizado dentro da gama de variação testada, com alguma vantagem relativamente ao SW-NIR.

3.2. Avaliação do desempenho do SBR

O tempo necessário até se atingir o estado estacionário (após inoculação do SBR) foi analisado através de medições por UV/Vis do efluente tratado. Foi medida a absorvância a comprimentos de onda definidos (254, 285 e 510 nm) por um período de 12 dias. O inóculo proveio de um reactor de lamas activadas a funcionar em contínuo (Escola Superior de Biotecnologia, Porto), isto é, a biomassa possuía uma composição e características já adaptadas ao funcionamento em contínuo. Os comprimentos de onda foram escolhidos tal como sugerido num trabalho anterior (Casellas et al., 2004). As amostras foram retiradas do recipiente de descarga no fim do ciclo. Foram efectuadas leituras do efluente tratado antes e após centrifugação (a 2000 rpm durante 5 min).

Tabela 3. Resultados obtidos das leituras de absorvância a diferentes comprimentos de onda de amostras do efluente

Data	254 nm		285 nm		510 nm	
	A	B	A	B	A	B
26-07-2006	1.760	1.671	1.582	1.471	1.426	0.732
27-07-2006	1.682	1.296	1.533	1.104	0.796	0.371
28-07-2006	0.863	0.541	0.735	0.444	0.246	0.112
29-07-2006	0.493	0.320	0.409	0.258	0.109	0.043
30-07-2006	0.475	0.303	0.386	0.238	0.110	0.050
31-07-2006	0.325	0.213	0.264	0.164	0.075	0.029
01-08-2006	0.450	0.278	0.365	0.218	0.110	0.050
02-08-2006	0.380	0.218	0.312	0.171	0.101	0.036
03-08-2006	0.345	0.292	0.212	0.134	0.059	0.030
04-08-2006	0.230	0.148	0.187	0.117	0.055	0.025
05-08-2006	0.200	0.152	0.158	0.117	0.044	0.027
06-08-2006	0.221	0.148	0.173	0.115	0.050	0.025

Legenda: A – Amostras sem centrifugação
B – Amostras com centrifugação

Através da Tabela 3 é possível verificar que as características e composição da biomassa foram-se alterando nos primeiros três dias. O funcionamento do SBR privilegiou microrganismos com melhor capacidade de sedimentação, daí nos primeiros dias o valor de absorvância ser bastante elevado. Foi possível verificar uma alteração da cor da biomassa. A biomassa inicialmente tinha uma cor negra e passou para uns tons de castanho claro no final dos primeiros quatro dias. A biomassa como já foi dito, proveio de um reactor a funcionar em modo contínuo. Quando inoculada num SBR veio encontrar situações de stress. Os diferentes ciclos funcionam no mesmo tanque provocando stress aos microrganismos. Estes mesmos microrganismos vão ter de se adaptar a situações de excesso de nutrientes, agitação e arejamento e posteriormente falta de nutrientes, agitação e arejamento. Isto provoca uma alteração das características da biomassa.

A Figura 20 também demonstra a alteração sofrida nas características e composição da biomassa. Ao quarto dia já se nota uma estabilização das características e composição da biomassa.

Durante esta etapa experimental tentou-se provocar algumas alterações ao efluente com a adição de uma carga adicional de leite em alguns dias. Em todos os dias procedeu-se a uma carga de leite magro de aproximadamente 600 mL diluído 100 vezes. Nos dias 6, 9 e 11 (31/07, 03/08 e 05/08/06 respectivamente) adicionou-se mais 2 mL de leite magro ao SBR. A primeira adição (dia 6) de leite provocou um aumento da absorvância do efluente descarregado, o que significa que

estas adições provocam uma alteração das características da biomassa. O aumento da carga aumenta a competição entre os microrganismos, beneficiando uns e prejudicando outros. Este efeito provocado pelo aumento de carga do reactor já foi reportado em artigos anteriores (Casellas et al., 2004).

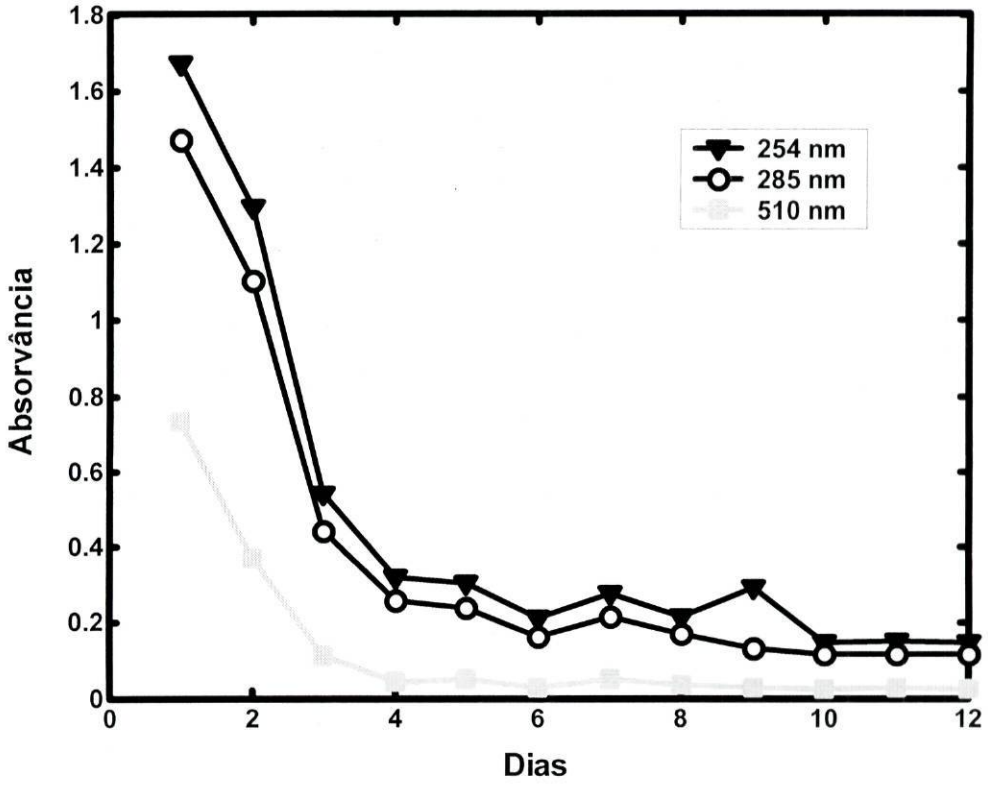


Figura 20. Valores de absorvâncias a 3 comprimentos de onda das amostras recolhidas do efluente tratado no final do ciclo do SBR (depois de centrifugadas).

Este estudo experimental permitiu concluir que as características e composição da biomassa das lamas activadas é diferente para cada caso, e as mesmas adaptam-se às situações novas. As lamas activadas têm na sua composição uma verdadeira cadeia alimentar embora a nível microscópio. Foi possível observar alterações morfológicas das colónias existentes nas lamas activadas com o tempo, através de observação ao microscópio (ampliação até 100 x).

3.3. Influência de parâmetros operatórios na aquisição de espectros NIR

Os dois parâmetros operatórios mais importantes no que toca à geração de possíveis interferências na aquisição dos espectros NIR do meio reaccional são o arejamento e a velocidade

de agitação. No primeiro caso, a formação de bolhas e sua dispersão no meio reaccional poderá originar interferências nos espectros caso se verifique a captura de alguma dessas bolhas dentro do percurso óptico da sonda NIR. No caso da agitação, esta deverá garantir que toda a mistura está homogénea de modo a evitar variações na obtenção dos espectros. Para isso testou-se a evolução em termos de espectros NIR adquiridos no período imediatamente posterior à paragem da agitação. Deste modo simulou-se o efeito provocado por uma paragem da agitação. Verificou-se ainda quanto tempo após a paragem seria possível até que se comece a observar distorção nos espectros devido à deposição de lamas dentro da própria sonda. Estes estudos foram realizados com a sonda de transflectância ligada ao espectrómetro NIR durante vários ciclos de operação do SBR.

3.3.1. Influência do arejamento

A influência do arejamento no reactor foi um parâmetro estudado na aquisição dos espectros. Os espectros foram adquiridos utilizando a sonda de transflectância. A zona de contacto entre a solução e o feixe NIR pode capturar bolhas de ar dependendo das condições de arejamento. A dimensão da abertura da sonda pode também condicionar a aquisição. Demasiadamente pequena pode impedir que haja renovação de solução e demasiado grande pode permitir a captura de bolhas de ar.

A Figura 21 demonstra a diferença entre espectros normais e espectros com perturbações devido à existência de bolhas de ar no percurso óptico. Os espectros normais são os que se encontram sobrepostos, os outros são exemplos de espectros com interferências devido ao arejamento. Como se pode ver, as interferências causadas ao espectro não são uniformes (estas dependem do tamanho da bolha formada e de fenómenos de dispersão da luz).

Quando a sonda está completamente mergulhada, nas condições de arejamento/agitação usadas, não se verificam a presença de bolhas (no decurso deste trabalho, raramente se observou a interferência das bolhas). As interferências verificadas resultam da carga do reactor uma vez que a sonda se encontrava mergulhada até um terço do reactor, isto é, a sonda só estava mergulhada quando o volume do reactor estava próximo ou superior a 600 mL. Após a descarga, a sonda deixa de se encontrar mergulhada na solução. Depois de iniciada a carga (durante aproximadamente 1 h) é iniciado arejamento, o reactor começa a formar espuma e o nível de solução sobe à medida que a carga procede. As bolhas de espuma formadas devido ao arejamento e à carga do reactor vão introduzir-se no compartimento da sonda causando interferências no espectro quando o nível de solução se encontra próximo da sonda. Estas interferências continuam até a sonda voltar a estar totalmente mergulhada na solução, ou seja, por um período de aproximadamente 30 min. A agitação do reactor é então suficiente para remover as bolhas que se introduziram no compartimento da sonda.

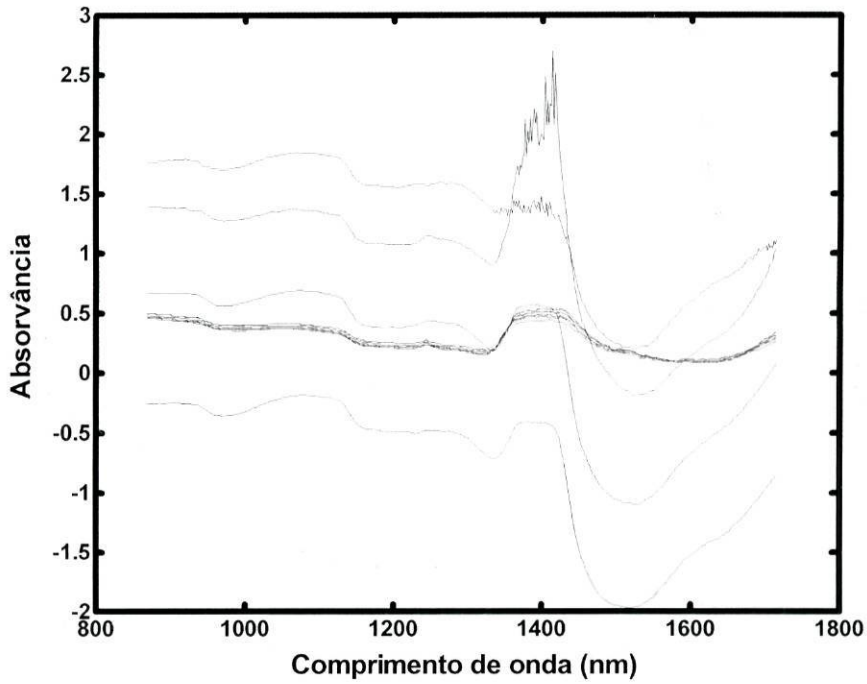


Figura 21. Influência da presença de bolhas de ar no percurso óptico da sonda devidas ao sistema de arejamento no reactor com inóculo (aproximadamente 3 g/L de TS).

Para evitar estas interferências, uma solução possível seria colocar a sonda no fundo do reactor sem prejudicar o arejamento e agitação. Outros problemas iriam aparecer pois na fase de sedimentação das lamas, estas iriam acumular-se no compartimento da sonda e assim interferir com o espectro. O tamanho da sonda não permitiu testar esta solução.

Deste modo, sempre que se observou nas experiências realizadas com NIR *in-situ* a presença de bolhas nos espectros, estes foram removidos (essencialmente nas fases de descarga).

3.3.2. Influência da agitação

A agitação foi outro parâmetro estudado na aquisição dos espectros. O reactor foi testado com uma quantidade próxima de 3 g/L de TS.

Por forma a verificar a influência da agitação na captura dos espectros NIR foi feito um teste onde uma amostra do reactor perfeitamente agitada foi monitorizada com a sonda NIR durante um período de tempo sem qualquer agitação. A experiência realizou-se com a introdução da sonda num tubo de centrífuga contendo uma amostra de solução do reactor (6 mL). Após a introdução da sonda começou-se a recolher os espectros NIR a períodos de tempo definidos. Inicialmente a amostra pode considerar-se perfeitamente homogénea uma vez ter sido recolhida do reactor perfeitamente agitado. A Figura 22 demonstra os espectros recolhidos pela sonda ao

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

longo do tempo. Na falta de agitação a biomassa vai começar a sedimentar influenciando o espectro.

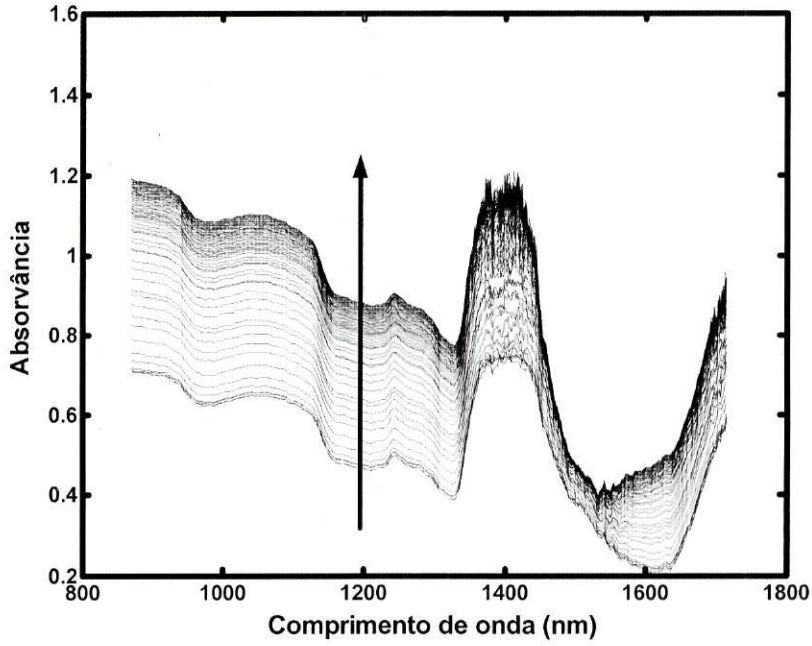


Figura 22. Influência da agitação na aquisição dos espectros NIR no reactor com inóculo (aproximadamente 3 g/L)

A Figura 22 demonstra o perfil dos espectros obtidos da amostra do SBR no tubo de centrífuga, com concentração de 3 g/L de TS, sem agitação e arejamento. Foram adquiridos espectros durante 10 min com intervalos de 5 segundos entre aquisições. A seta no mapa indica a evolução das alterações do espectro com o aumento do tempo. Como se pode visualizar, os espectros à medida que a biomassa vai sedimentando vão caminhando para valores superiores de absorvância embora mantendo sensivelmente o mesmo perfil. À medida que a biomassa vai sedimentando no fundo do tubo, o sobrenadante (maioritariamente água) vai ficando límpido. O espectro na região NIR é bastante influenciado pelas bandas resultantes da interacção do feixe com a água.

Este procedimento experimental serviu também para determinar o período de tempo dentro do qual é possível realizar análises concordantes sem agitação. Na Figura 22, é possível visualizar a sobreposição de algumas bandas no início da experiência. Ampliando a figura (Figura 23) vê-se uma sobreposição inicial de cinco bandas. Essa sobreposição verificada permite determinar o período de tempo em que é possível realizar uma análise. Como se encontram cinco bandas, e como cada análise foi de 5 em 5 s, é possível concluir que se pode realizar uma análise concordante sem agitação durante aproximadamente 20 s. Isto é, é possível retirar uma amostra

do reactor e realizar uma análise concordante se todo este procedimento não demorar mais de 20 s, permitindo assim uma determinação "at-line" (sem que seja necessário assegurar agitação).

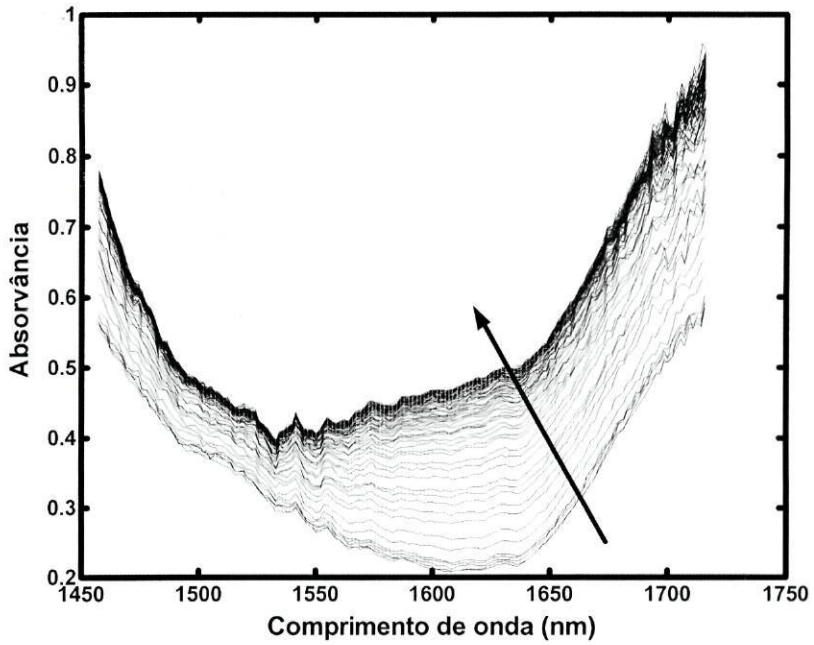


Figura 23. Ampliação da zona entre 1450 nm e 1750 nm mostrando o deslocamento do mínimo de uma banda espectral.

Analisando a Figura 23 é possível igualmente observar uma alteração das bandas entre 1500-1600 nm com a sedimentação bem como um desvio no mínimo da banda devido à acumulação de biomassa no fundo do tubo de centrífuga. Esta alteração no espectro faz com que mesmo uma correcção de linha de base não seja suficiente para eliminar o efeito da deposição.

Capítulo 4. Modelação do COD

A monitorização do COD é muito importante para o controlo uma ETAR, permitindo controlar a qualidade do efluente. O COD refere-se à quantidade de oxigénio necessária para oxidar a matéria orgânica (bio-degradável e refractária) e inorgânica oxidável de uma amostra, utilizando um oxidante químico forte. Existem dois métodos de referência para a determinação do COD: por titulação ou espectroscopia. Utilizou-se o método espectroscópio anteriormente descrito, como método analítico de referência.

4.1. Modelação por NIR ("at-line")

O espectrofotómetro NIR foi utilizado para monitorizar *in-situ* (com sonda de transflectância) o reactor SBR. A carga utilizada foi ~600 mL de leite magro diluído 100 vezes e a duração dos ciclos como referida na secção de materiais e métodos. Foram recolhidas amostras do reactor (continuamente agitado) em períodos de 30 min (para os dois primeiros ciclos monitorizados), essencialmente no início do ciclo, onde existe maior variação de COD.

Os resultados ilustrados na Tabela 4 reportam os resultados obtidos na monitorização de COD para 4 ciclos de operação. As amostras foram recolhidas a tempos diferentes e com o objectivo de se monitorizar a fase da carga do reactor pois é quando o parâmetro em causa mais varia. A Tabela 4 reporta os resultados obtidos para todos os ciclos monitorizados (10 amostras nos primeiros dois ciclos e 13 amostras nos segundos dois ciclos monitorizados).

Tabela 4. Amostras recolhidas e correspondentes resultados da análise de COD pelo método de referência.

Amostras	Tempo do ciclo	Absorvância		Média	COD (mg O_2/L)
A1	15 mim	0.036	0.034	0.035	88.8
A2	45 mim	0.047	0.048	0.048	113.8
A3	1 h 15 mim	0.180	0.184	0.182	382.8
A4	1 h 45 min	0.085	0.088	0.087	191.8
A5	2 h 15 min	0.060	0.055	0.058	133.8
A6	2 h 45 min	0.050	0.050	0.050	118.8
A7	3 h 15 min	0.030	0.029	0.030	77.8
A8	3 h 45 min	0.018	0.016	0.017	52.8
A9	4 h 15 min	0.019	0.021	0.020	58.8
A10	fim do ciclo	0.020	0.020	0.020	58.8
B1	15 mim	0.029	0.027	0.028	74.8
B2	45 mim	0.037	0.041	0.039	96.8
B3	1 h 15 mim	0.149	0.152	0.151	319.8
B4	1 h 45 min	0.053	0.051	0.052	122.8
B5	2 h 15 min	0.040	0.039	0.040	97.8
B6	2 h 45 min	0.028	0.027	0.028	73.8
B7	3 h 15 min	0.023	0.025	0.024	66.8
B8	3 h 45 min	0.025	0.026	0.026	69.8
B9	4 h 15 min	0.026	0.027	0.027	71.8
B10	fim do ciclo	0.022	0.022	0.022	62.8
C1	30 min	0.184	0.187	0.186	390.8
C2	40 min	0.266	0.266	0.266	551.8
C3	50 min	0.348	0.349	0.349	716.8
C4	1 h	0.400	0.407	0.404	826.8
C5	1 h 10 min	0.136	0.142	0.139	297.8
C6	1 h 20 min	0.099	0.097	0.098	215.8
C7	1 h 30 min	0.087	0.090	0.089	196.8
C8	1 h 40 min	0.079	0.076	0.078	174.8
C9	1 h 50 min	0.075	0.074	0.075	168.8
C10	2 h	0.067	0.069	0.068	155.8
C11	2 h 10 min	0.070	0.071	0.071	160.8
C12	2 h 20 min	0.065	0.064	0.065	148.8

Tabela 4 (Continuação).. Amostras recolhidas e correspondentes resultados da análise de COD pelo método de referência.

C13	2 h 30 min	0.066	0.064	0.065	149.8
D1	30 min	0.225	0.231	0.228	475.8
D2	40 min	0.308	0.305	0.307	632.8
D3	50 min	0.383	0.390	0.387	792.8
D4	1 h	0.440	0.446	0.443	905.8
D5	1 h 10 min	0.158	0.161	0.160	338.8
D6	1 h 20 min	0.120	0.123	0.122	262.8
D7	1 h 30 min	0.109	0.102	0.106	230.8
D8	1 h 40 min	0.094	0.090	0.092	203.8
D9	1 h 50 min	0.081	0.080	0.081	180.8
D10	2 h	0.076	0.074	0.075	169.8
D11	2 h 10 min	0.069	0.072	0.071	160.8
D12	2 h 20 min	0.066	0.070	0.068	155.8
D13	2 h 30 min	0.070	0.072	0.071	161.8

Legenda: A- dia 7/06/06; B- dia 8/06/06; C- dia 29/06/06; D- dia 30/06/06;

A segunda coluna da Tabela 4 (tempo do ciclo) refere-se ao tempo desde o início do ciclo. No procedimento experimental dos dois primeiros ciclos, procedeu-se a uma amostragem de 30 em 30 min durante as primeiras quatro horas do ciclo. Procedeu-se a uma determinação das amostras em duplicado (amostras de ~6mL). Não foi possível a determinação de um maior número de amostras para cada tempo devido à necessidade de manter o reactor em boas condições operatórias, para não se retirar mais de 10% do volume total do reactor (± 1 L), neste caso, 100 mL. Para a determinação do COD nos primeiros dois ciclos, utilizou-se a seguinte equação proveniente da curva de calibração realizada com os padrões de COD ($y = 0{,}0005\ x - 0{,}0094$). No procedimento experimental dos dois últimos ciclos monitorizados, procedeu-se a uma amostragem de 10 em 10 min durante as primeiras duas horas de ciclo. O plano de amostragem foi alterado com o intuito de se obter um maior número de pontos na zona de maior variação do COD. Procedeu-se a uma determinação das amostras em duplicado (amostras de ~6 mL). Para a determinação do COD dos dois últimos ciclos, utilizou-se a seguinte equação proveniente da curva de calibração realizada com os padrões de COD ($y = 0{,}0005\ x - 0{,}0099$).

O erro ou incerteza da determinação do COD foi calculado com base em seis medidas obtidas da mesma amostra. A Tabela 5 mostra o valor obtido do erro da medida (~95%). O erro foi calculado com base na Equação 23.

$$x = \hat{x} \pm \frac{t_{0.05/2,n-1} s}{\sqrt{n}} \quad (23)$$

Na equação 23, x é o verdadeiro valor da medida, $\hat{x}$ é o valor estimado (média amostral dos ensaios), s é o desvio padrão amostral, $t_{0.05/2,n-1}$ é o valor crítico da distribuição t-student para 95% e n-1 graus de liberdade e n o número de amostras.

Tabela 5. Determinação do erro das determinações de COD para uma amostra.

Leituras	Média	Desvio padrão	Erro
433.8	438.5	7.7	± 6.3
431.8			
429.8			
445.8			
441.8			
447.8			

Assumiu-se este erro, como uma aproximação do erro médio de todas as amostras. Os espectros NIR foram obtidos por medição do meio reaccional após recolha de amostra e centrifugação. Foram por isso medidas efectuadas "at-line". Os espectros recolhidos foram centrados na média como pré-processamento. Utilizou-se o PLS com o objectivo de correlacionar o espectro NIR obtido com os valores de COD obtidos pelo método de referência. Os valores de COD também foram centrados na média. O número de variáveis latentes foi estimado através de validação cruzada LOO. A Figura 24 ilustra o erro obtido pela validação cruzada para diferentes números de variáveis latentes.

Através da realização da validação cruzada, como demonstra a Figura 24, escolheu-se quatro variáveis latentes para o modelo (mínimo da curva). O RMSECV obtido foi de 78.4 mg O_2/L para quatro variáveis latentes.

A Figura 25 mostra a variância capturada dos espectros NIR em função do número de variáveis latentes. É possível verificar que com quatro variáveis latentes no modelo conseguimos capturar perto de 98% da variância dos espectros NIR.

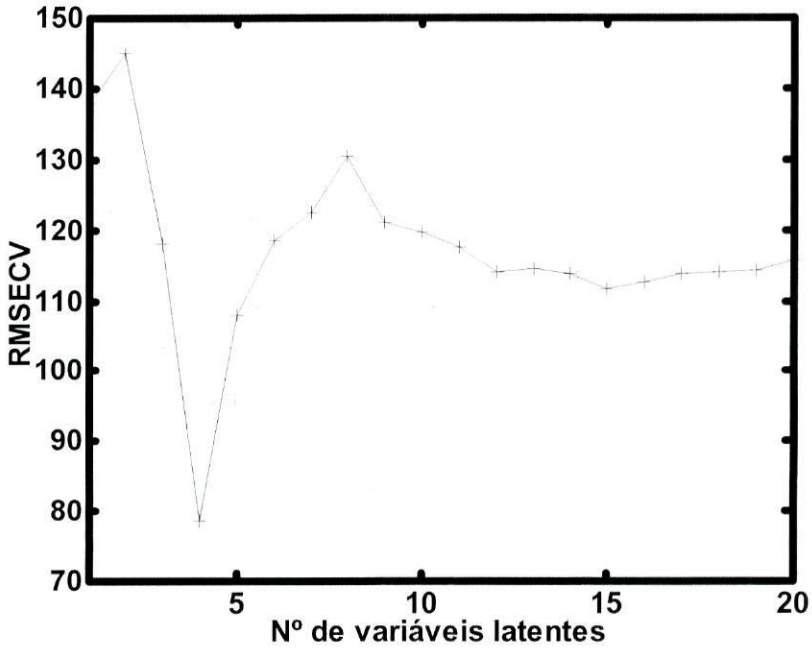


Figura 24. Gráfico do erro da validação cruzada para o modelo PLS de previsão do COD.

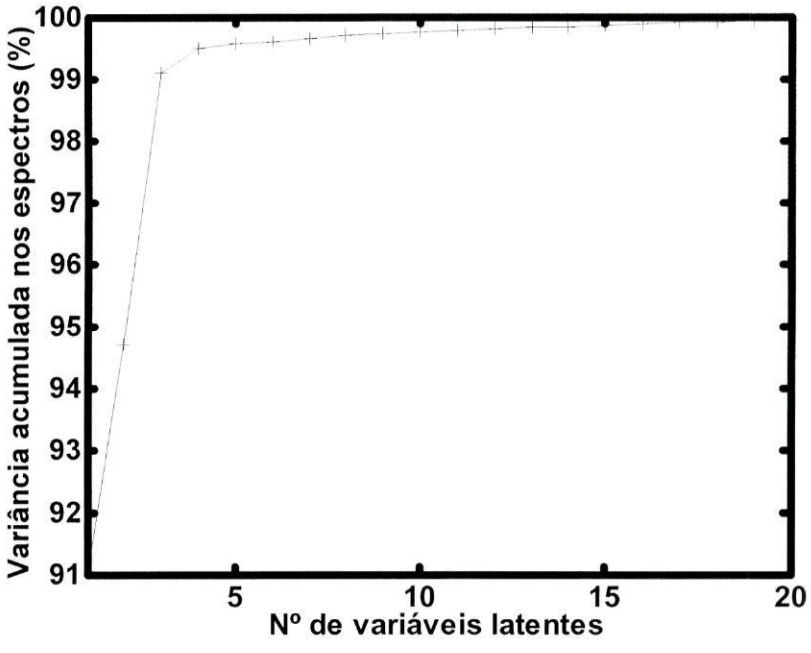


Figura 25. Percentagem de variância cumulativa capturada dos espectros NIR em função do número de variáveis latentes.

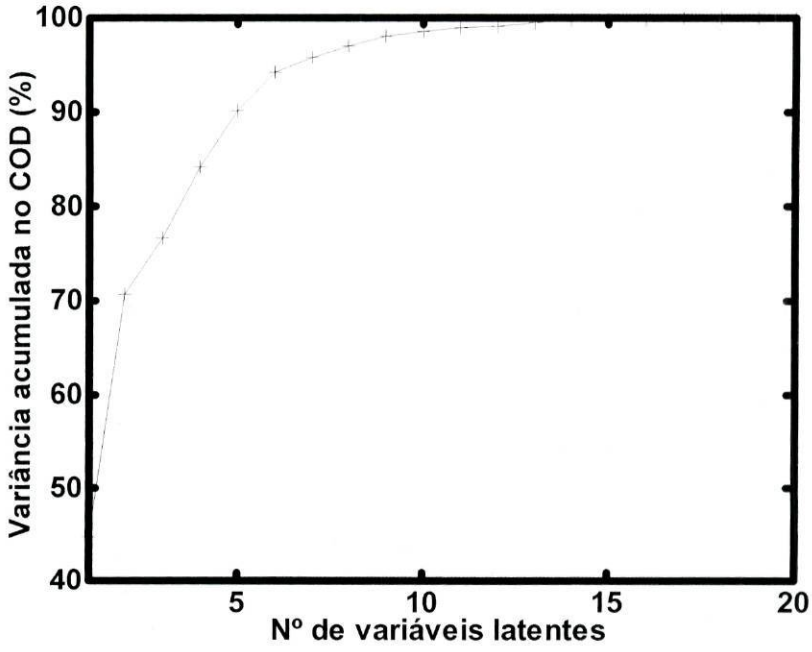


Figura 26. Percentagem da variância cumulativa capturada de COD em função do número de variáveis latentes.

A Figura 26 mostra a variância capturada do COD em função do número de variáveis latentes. É possível verificar que com quatro variáveis latentes do modelo conseguimos capturar perto de 80% da variância do COD.

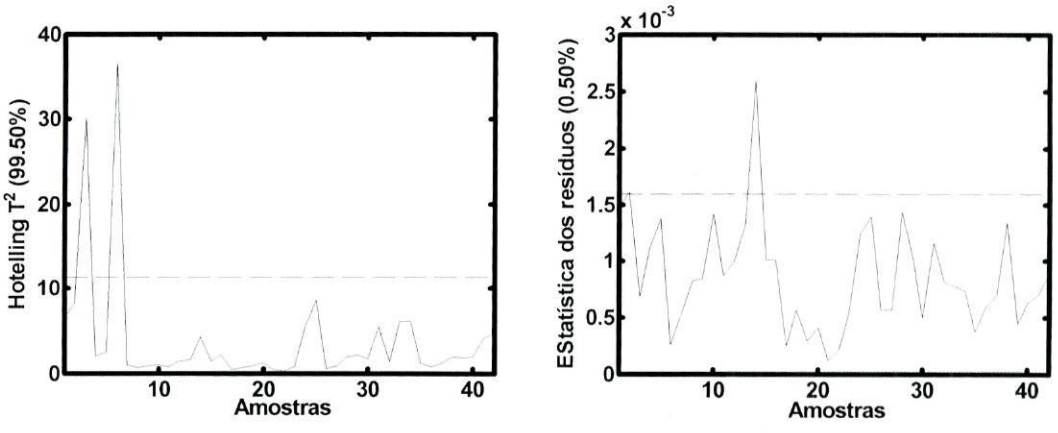


Figura 27. Valor da estatística de Hotelling e resíduos obtido em função das amostras.

Os valores das estatísticas de Hotteling e resíduos permitem para este caso validar o modelo PLS. Na Figura 27 nas estatísticas de Hotelling verifica-se a presença de um valor atípico. Na Figura 27 nas estatísticas de resíduos verifica-se a presença de dois valores atípicos.

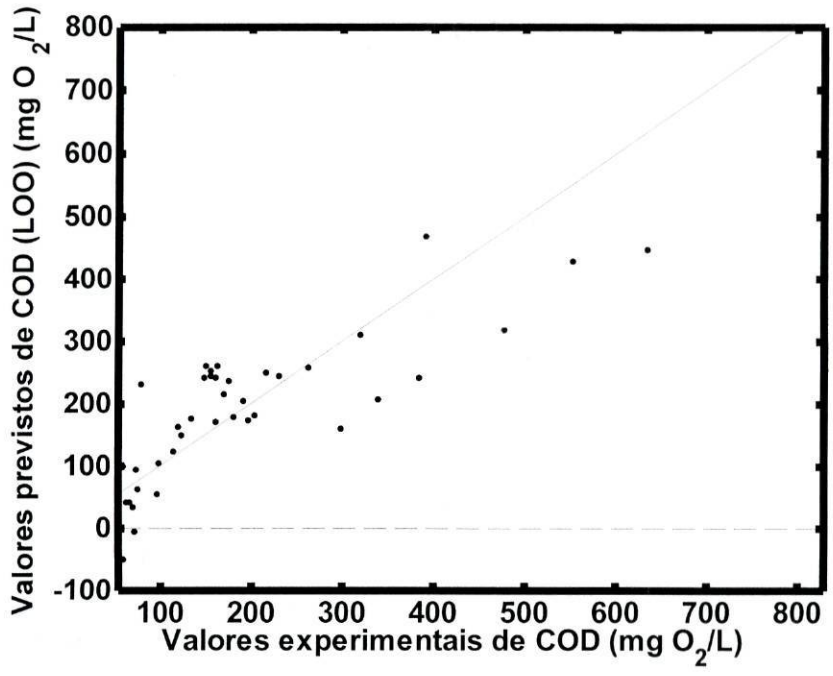


Figura 28. Valores de COD medidos em função dos valores de COD previstos pelo modelo PLS com três componentes resultado da validação (LOO).

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 28 em função dos valores previstos pelo modelo. Como se pode visualizar a gama de valores estudados é ampla e é possível verificar a resposta da técnica para o parâmetro em causa. Os valores obtidos pelo modelo têm um erro de 78.4 mg O_2/L o que corresponde a um erro elevado para as gamas de concentração mais baixas. Apesar de tudo o erro obtido não é muito elevado se tivermos em consideração os valores de COD esperados para uma estação de tratamento de águas residuais, na ordem dos milhares de mg O_2/L.

Este procedimento experimental tentou detectar respostas mais acentuadas e parecidas com o funcionamento real das estações de tratamento de águas residuais. Comparando o erro obtido com a possibilidade de se obter resultados em tempos reais, o erro torna-se aceitável.

Assim sendo, a tecnologia NIR pode vir a ser uma ferramenta muito importante na monitorização e possível controlo nos processos das estações de tratamento de águas residuais.

O método de referência utilizado para a determinação de COD possui um erro baixo quando comparado com o obtido pela tecnologia NIR mas possui diversas desvantagens como: gerar muitos resíduos perigosos para o meio ambiente, utilização de reagentes perigosos para o operador, um tempo de determinação elevado e destruição da amostra.

A técnica NIR é mais complexa e necessita de ferramentas de quimiometria capazes de relacionar o espectro com o que se pretende. Isto é, a construção de um modelo necessita de pessoal especializado embora depois do modelo estar implementado no sistema já não seja

necessário pessoal especializado. A técnica possui um baixo tempo de determinação, não é destrutiva.

4.2. Modelação por UV/Vis ("off-line")

Um dos métodos descritos para monitorizar o COD consiste na utilização de espectroscopia UV/Vis e na determinação de correlação com o parâmetro COD. Com vista à comparação deste método com o método baseado em NIR, foram feitas amostragens ao SBR seguidas de uma determinação da absorvância a 254, 285 e 510 nm e análise do COD pelo método de referência.

O objectivo foi o de correlacionar certas zonas do espectro UV/Vis, denominadamente 254, 285 e 510 nm, com o parâmetro COD. As amostras foram recolhidas a tempos diferentes e com o objectivo de monitorização da fase de carga do reactor (pois é quando o parâmetro em causa mais varia). Foram monitorizados dois ciclos tendo-se recolhido um total de 28 amostras.

No procedimento experimental do primeiro ciclo (dia 13/07/06) procedeu-se a uma amostragem de 10 em 10 min durante os primeiros minutos do ciclo e depois procedeu-se a uma amostragem mais rápida com o intuito de se obter um maior número de pontos na zona de maior variabilidade do COD. No procedimento experimental do segundo ciclo (dia 14) procedeu-se a uma amostragem de 10 em 10 min durante a primeira hora do ciclo, de 15 em 15 min durante a segunda hora e de 30 em 30 min na terceira hora. Procedeu-se a uma determinação das amostras em duplicado. Para a determinação do COD utilizou-se a seguinte equação proveniente da curva de calibração realizada com os padrões de COD ($y = 0.0004\ x - 0.0107$). O erro ou incerteza da determinação do COD é o mesmo calculado anteriormente. Foram obtidos valores de absorvância de amostras recolhidas do reactor depois de centrifugação (a 2000 rpm durante 5 min)

Por forma a identificar a melhor calibração entre os comprimentos de onda analisados e o respectivo valor de COD foram gerados modelos de regressão linear múltipla (MLR) fazendo todas as combinações possíveis para o bloco de dados independente. O número máximo de combinações dos comprimentos de onda testados foi 7. Os modelos foram gerados por MLR e o erro (RMSECV) foi determinado através da estratégia de validação cruzado do tipo LOO. Os resultados estão descritos na Tabela 7. A Tabela 7 mostra que considerando isoladamente cada um dos comprimentos de onda para determinação do COD, a medida a 285 nm permite um modelo com um erro menor (59.8 mg O_2/L), ainda que muito semelhante ao modelo utilizando as medidas a 254 nm (62.7 mg O_2/L).

Tabela 6. Amostras recolhidas e correspondente resultados da análise de COD pelo método de referência.

Soluções	Tempo do ciclo	Absorvância		Média	COD (mg O_2/L)
A1	30 min	0.067	0.064	0.066	190.5
A2	40 min	0.085	0.089	0.087	244.3
A3	50 min	0.137	0.140	0.139	373.0
A4	56 min	0.144	0.148	0.146	391.8
A5	1 h 1 min	0.190	0.198	0.194	511.8
A6	1 h 7 min	0.096	0.094	0.095	264.3
A7	1 h 13 min	0.083	0.084	0.084	235.5
A8	1 h 23 min	0.067	0.065	0.066	191.8
A9	1 h 33 min	0.060	0.061	0.061	178.0
A10	1 h 45 min	0.052	0.053	0.053	158.0
A11	2 h	0.031	0.035	0.033	109.3
A12	2 h 15 min	0.038	0.045	0.042	130.5
A13	2 h 30 min	0.036	0.035	0.036	115.5
A14	3 h	0.020	0.018	0.019	74.3
A15	3 h 30 min	0.009	0.010	0.010	50.5
B1	30 min	0.115	0.118	0.117	318.0
B2	40 min	0.164	0.172	0.168	446.8
B3	50 min	0.245	0.240	0.243	633.0
B4	1 h	0.270	0.273	0.272	705.5
B5	1 h 10 min	0.123	0.125	0.124	336.8
B6	1h 20 min	0.089	0.092	0.091	253.0
B7	1 h 30 min	0.075	0.076	0.076	215.5
B8	1 h 45 min	0.050	0.052	0.051	154.3
B9	2 h	0.044	0.048	0.046	141.8
B10	2h 15 min	0.037	0.038	0.038	120.5
B11	2 h 30 min	0.032	0.034	0.033	109.3
B12	3 h	0.020	0.018	0.019	74.3
B13	3 h 30 min	0.010	0.009	0.010	50.5

Legenda: A- dia 13/07/06; B- dia 14/07/06

Isoladamente a medida de densidade óptica obtida a 510 nm não permite obter um modelo com semelhante desempenho em termos de previsão. Verifica-se que o melhor modelo em termos de erro de validação cruzada é o que combina as medições a 285 e 510 nm (56.3 mg O_2/L). Quando usadas as densidades ópticas aos três comprimentos de onda verifica-se que apenas os coeficientes para 285 e 510 nm são estatisticamente válidos a 99% (valor-p < 0.01). O valor-p correspondente a 256 nm neste modelo é superior a 0.3 pelo que se considera que não é estatisticamente significativo.

Tabela 7. Erros de estimativa de valores de COD (mg O_2/L) por regressão linear usando leituras de densidade óptica a diferentes comprimentos de onda (A=254 nm, B=285 nm, C=510 nm).

Erros (mg O_2/L)	A	B	C	A+B (*)	A+C (*)	B+C (*)	A+B+C (*)(**)
RMSEC	56.6	54.7	70.2	54.7	56.0	49.0	47.9
RMSECV (LOO)	62.7	59.8	75.7	63.1	66.5	**56.3**	58.4

(*) Modelos obtidos por regressão linear múltipla.

(**) O modelo de regressão linear múltipla com base nos três comprimentos de onda (A+B+C) equivale a um modelo PLS com três variáveis latentes.

Testou-se ainda a possibilidade de aplicação de um modelo PLS quando o bloco independente é composto pelos três comprimentos de onda. A Figura 29 mostra o resultado da validação cruzada para este modelo em termos de erro de validação para as três variáveis latentes possíveis. Verifica-se que o melhor modelo é que o usa três variáveis latentes pelo que a indicação neste caso seria utilizar um modelo com esse número de variáveis latentes. O RMSECV obtido foi de 52.2 mg O_2/L para três variáveis latentes. Como corresponde ao número máximo (3 neste caso) isso equivale a um modelo MLR (ver última coluna da Tabela 7). Não traz por isso qualquer benefício aos modelos já encontrados por MLR. Verifica-se para o modelo de PLS com 3 variáveis latentes que a variância capturada para o COD é de aproximadamente 93% como indica a Figura 30.

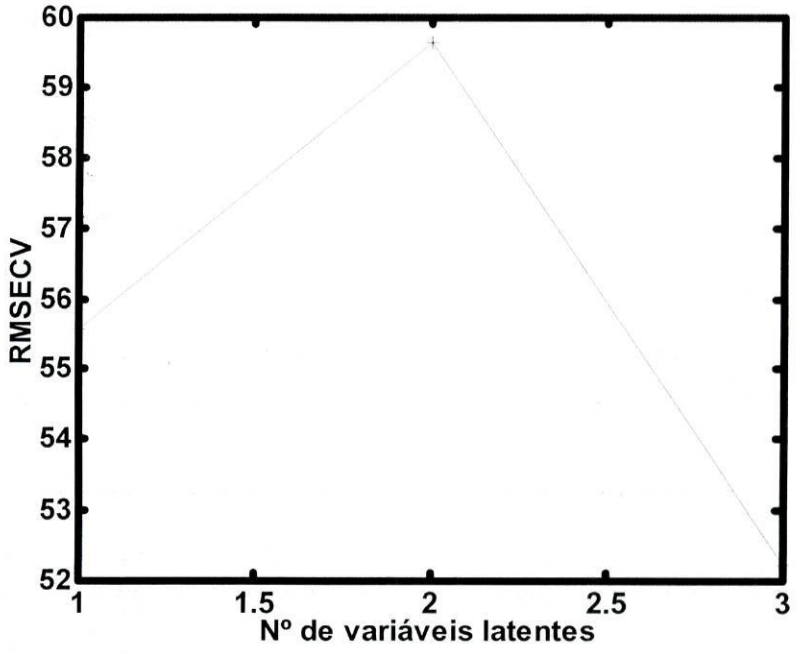


Figura 29. Gráfico do erro da validação cruzada para o modelo PLS de previsão do COD.

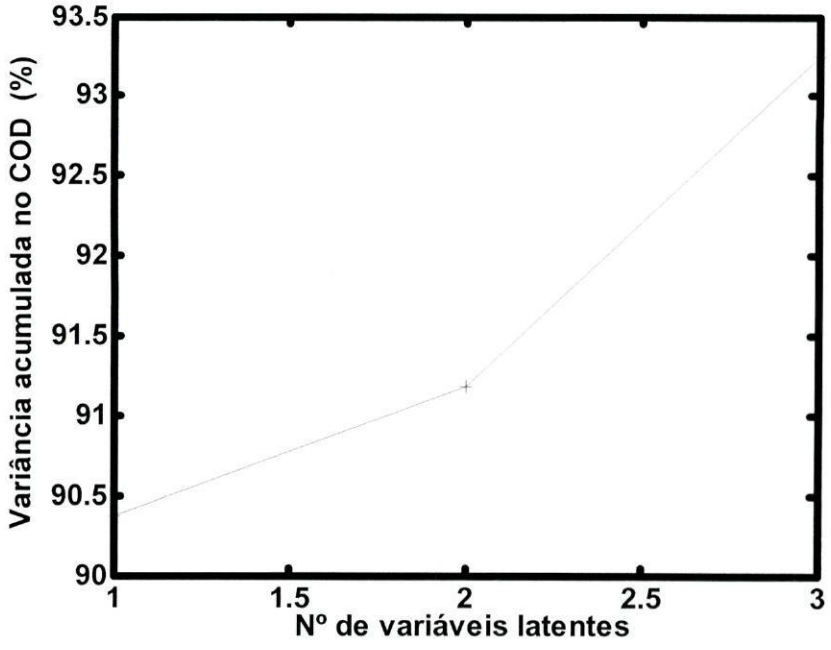


Figura 30. Percentagem de variância cumulativa capturada do COD em função do número de variáveis latentes para um modelo PLS.

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 31 em função dos valores previstos pelo melhor modelo (modelo MLR com utilização de comprimentos de onda de 285 e 510 nm). Como se pode visualizar a gama de valores estudados é relativamente ampla. Os valores obtidos pelo modelo têm um erro de 56.3 mg O_2/L. Verifica-se que o afastamento entre os valores experimentais e previstos é de magnitude semelhante para valores de COD baixos e altos, o que indica um bom ajuste do modelo para várias gamas de COD. O erro obtido é aceitável se tivermos em consideração os valores esperados para uma estação de tratamento de águas residuais (na ordem dos milhares de mg O_2/L no efluente primário).

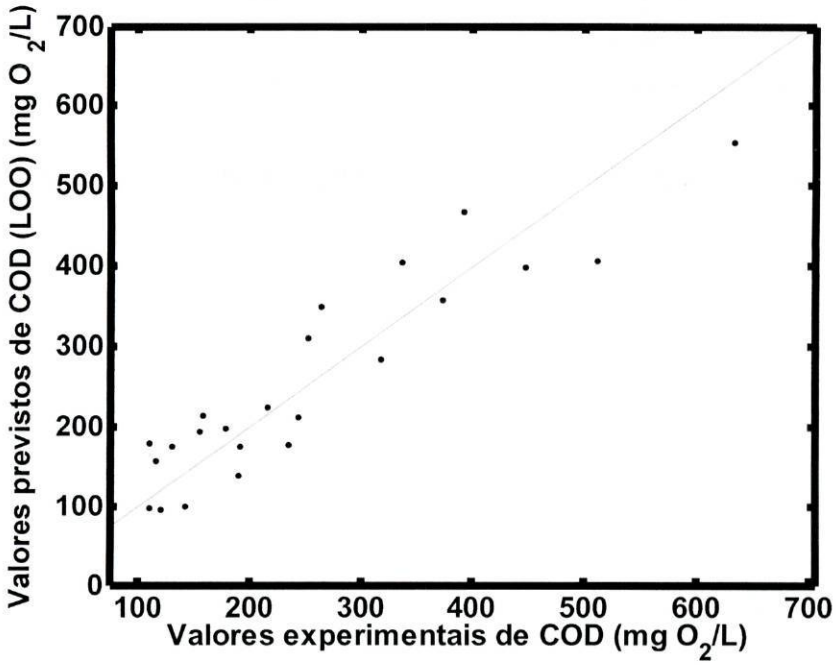


Figura 31. Valores de COD medidos em função dos valores de COD previstos pelo modelo MLR com utilização dos comprimentos de onda de 285 e 510 nm (resultado de validação LOO).

4.3. Comparação entre modelos baseados em UV/Vis e NIR

Os erros obtidos para os três modelos resultantes das análises por UV/Vis são inferiores ao erro resultante utilizando a tecnologia NIR. No entanto, a espectroscopia por UV/Vis tal como utilizada nestes ensaios não corresponde a uma monitorização em-linha do sistema, embora o método utilizado para a monitorização do COD com a tecnologia NIR também tenha envolvido um passo de centrifugação (por este facto foi designada por "at-line"). O erro obtido pelo método de UV/Vis foi de 56.3 mg O_2/L e pelo método NIR de 78.4 mg O_2/L. O erro obtido por UV/Vis é inferior embora no método NIR e particularmente nesta experiência o espectrómetro não conseguiu

estabilizar bem a temperatura do detector. Esta dificuldade deveu-se à elevada temperatura no interior do laboratório (impossibilitou a estabilização térmica do detector). Este controlo menos eficiente pode ter levado a um possível aumento do erro. O método NIR possui algumas vantagens em relação ao método UV/Vis:

- sensibilidade a compostos que não absorvem na zona UV/Vis;
- colocação de diversos tipos de sonda *in-situ* (medição em-linha), nomeadamente sondas de reflectância difusa;
- menor interferência se existirem determinados interferentes como por exemplo analitos corados (onde a absorção em visível é mais importante).

Capítulo 5. Modelação dos TSS e TS

A concentração de sólidos totais e em suspensão são dois parâmetros que se utilizam para controlar e manter um sistema de tratamento de resíduos por lamas activadas. A sua determinação laboratorial envolve em geral uma medida gravimétrica. Essa medida é obtida em diferido e não está por isso disponível após o momento da amostragem. Requer algum tempo, que pode ser de 24 horas em determinadas situações e caso se pretenda um elevado grau de precisão na medida. Outro factor que influencia este tipo de medida gravimétrica é o momento, volume e o local da colheita. Pode haver variações grandes caso estes parâmetros variem na altura de proceder à amostragem. Nesta secção avaliou-se a possibilidade de estimativa em-linha destes parâmetros num reactor SBR (efluente lácteo) recorrendo à tecnologia NIR e a uma sonda de transflectância imersa no reactor.

5.1. Modelação dos TSS

A determinação dos TSS pelo método de referência possui um elevado erro, na maioria dos casos cerca de 15%. Realizaram-se diversas determinações e verificou-se a existência de uma elevado erro em amostras em triplicado. As determinações TSS com o objectivo de se correlacionar com os espectros obtidos realizaram-se em 4 dias. Os espectros foram obtidos através da sonda de transflectância mergulhada no SBR e guardados no computador ao mesmo tempo da amostragem para a determinação dos TSS. O objectivo foi monitorizar o reactor em termos de sólidos suspensos totais durante o ciclo e correlacionar com os espectros obtidos.

A incerteza na determinação dos sólidos totais foi calculado com base numa medida em triplicado. A Tabela 8 mostra o valor obtido do erro da medida.

Tabela 8. Estimativa do erro experimental para as determinações dos TSS

Leituras	Média	Desvio padrão	Erro
2.84	2.50	0.31	± 0.36
2.42			
2.24			

A Tabela 9 contém os valores obtidos de TSS pelo método de referência.

Tabela 9. Valores obtidos dos valores de TSS pelo método de referência.

Amostra	Data	TSS (g/L)	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
1	05-05-2006	2.48	2.12	2.84
2	05-05-2006	2.50	2.14	2.86
3	05-05-2006	2.92	2.56	3.28
4	05-05-2006	3.12	2.76	3.48
5	08-05-2006	2.36	2.00	2.72
6	08-05-2006	2.38	2.02	2.74
7	08-05-2006	3.06	2.70	3.42
8	09-05-2006	2.90	2.54	3.26
9	09-05-2006	2.46	2.10	2.82
10	09-05-2006	2.38	2.02	2.74
11	11-05-2006	2.84	2.48	3.20
12	11-05-2006	2.98	2.62	3.34
13	11-05-2006	2.64	2.28	3.00
14	11-05-2006	2.48	2.12	2.84

As determinações dos TSS realizaram-se a diferentes tempos do ensaio e com apenas uma amostra a cada tempo devido à inexistência de material disponível e à necessidade de se monitorizar o ciclo a tempos diferentes.

Os espectros foram adquiridos pelo método anteriormente explicado. Utilizou-se o PLS com o objectivo de correlacionar o espectro obtido ou certas zonas do espectro com os valores de TSS. Os espectros foram pré-processados utilizando um filtro de Savitzky-Golay (15,2,2), centrados na média e correcção ortogonal de sinal (OSC). Os valores para os TSS foram centrados na média. O número de variáveis latentes foi estimado através de validação cruzada LOO.

A Figura 32 ilustra o erro obtido com validação cruzada para diferentes números de variáveis latentes. Através da realização da validação cruzada, como demonstra a Figura 32, escolheu-se duas variáveis latentes para o modelo. O RMSECV obtido foi de 0.13 g/L para duas variáveis latentes. Como é possível verificar o erro não é muito inferior se aumentarmos o número de variáveis latentes. Embora o valor mínimo do erro se obtenha com mais do que duas variáveis, considerou-se este número uma vez que o decréscimo do erro não é significativo partir daí.

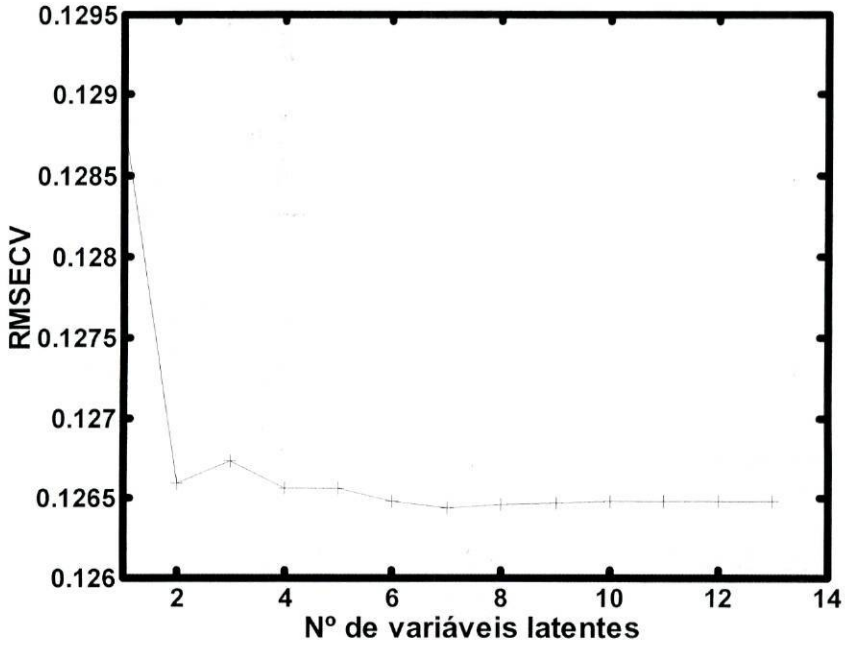


Figura 32. Erro da validação cruzada em função do número de variáveis latentes

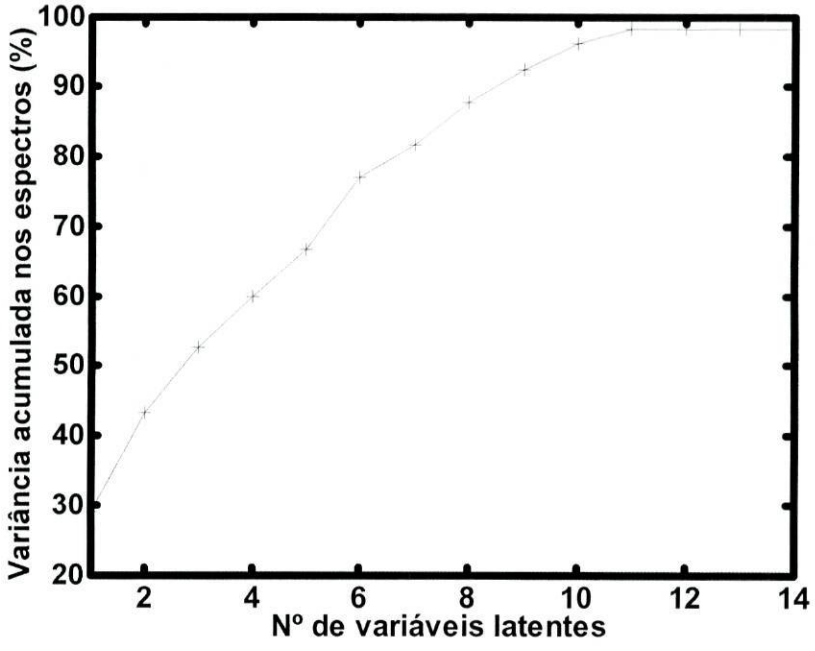


Figura 33. Percentagem da variância cumulativa capturada nos espectros em função do número de variáveis latentes.

A Figura 33 mostra a variância capturada em função do número de variáveis latentes para os espectros. Como é possível verificar só com perto de oito variáveis latentes do modelo é que conseguimos capturar perto de 90% da variância nos espectros. Isto demonstra que a informação presente nos espectros para modelar os TSS é apenas uma fracção da informação total existente.

A Figura 34 demonstra a variância capturada em função do número de variáveis latentes nos TSS e neste caso só com apenas duas variáveis latentes conseguimos capturar perto de 100% da variância nos TSS. Este resultado demonstra que apenas duas variáveis latentes são suficientes para modelar quase 100% da variância dos TSS.

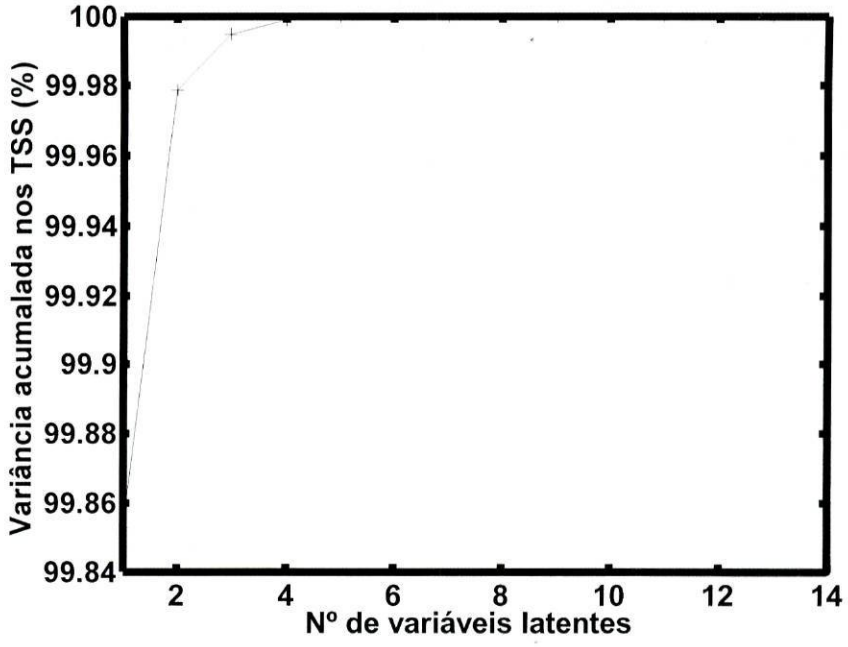


Figura 34. Percentagem da variância cumulativa capturada nos TSS em função do número de variáveis latentes.

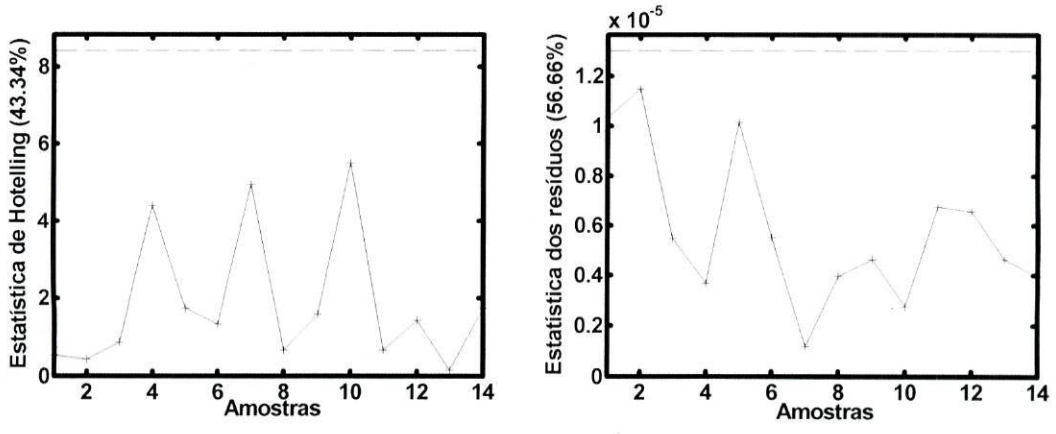


Figura 35. Valores das estatísticas de Hotelling e resíduos em função das amostras.

Os valores das estatísticas de Hotteling e dos resíduos permitem para este caso validar o modelo PLS. Em nenhum dos casos é possível identificar a presença de valores atípicos.

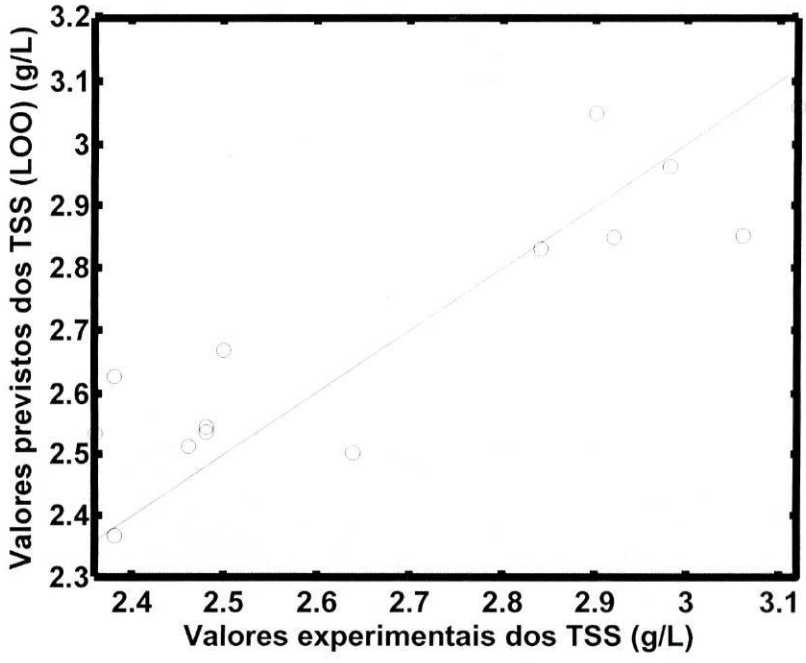


Figura 36. Valores de TSS medidos em função valores de TSS previstos pela validação cruzada.

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 36 em função dos valores previstos pelo modelo. Como se pode visualizar a gama de valores estudados não é muito ampla mas contempla diferenças e é possível verificar a resposta do modelo a estas gamas de concentrações dos TSS. Os valores obtidos pelo modelo têm um erro de 0.13 g/L o que corresponde a um erro próximo de 5% para as gamas de concentração mais baixas.

É de realçar o baixo erro obtido pelo modelo construído visto este estar baseado nos resultados obtidos pelo método de referência. O método de referência para a determinação de TSS possui um elevado erro inerente à técnica além do tempo de determinação ser elevado e a amostra é destruída. Tem como vantagem ser um método simples e não ter necessidade de mão-de-obra especializada.

A técnica NIR é mais complexa e necessita de ferramentas de quimiometria capazes de relacionar o espectro com o que se pretende. Isto é, a construção de um modelo necessita de pessoal especializado embora depois do modelo estar implementado no sistema já não seja necessário pessoal especializado.

Actualmente, as empresas necessitam de técnicas de monitorização capazes de detectar e responder rapidamente, isto é, necessitam de uma técnica com um tempo de determinação rápido

mas fiável. O resultado obtido demonstra o potencial da tecnologia NIR em concreto para este caso e constitui uma alternativa ao método de referência.

5.2. Modelação dos TS

A monitorização dos sólidos totais é também um parâmetro muito importante de se controlar em ETAR's, permitindo controlar a concentração da biomassa. O conhecimento da concentração da biomassa permite aumentar ou diminuir o volume ou caudal do efluente a ser tratado.

A determinação dos sólido totais pelo método de referência possui um erro inferior quando comparado com a determinação de sólidos suspensos totais. Realizaram-se diversas determinações de sólidos totais e através de uma amostragem em triplicado foi possível calcular o erro. As determinações de sólidos totais com o objectivo de se correlacionar com os espectros obtidos realizaram-se em 5 dias. Os espectros foram obtidos através da sonda de transflectância (por NIR) mergulhada no SBR e guardados no computador aos mesmo tempos das amostragens para a determinação dos TS. O objectivo foi monitorizar o reactor em termos de sólidos totais durante o ciclo e correlacionar com os espectros obtidos.

A incerteza na determinação dos TS foi calculada com base numa medida em triplicado. A Tabela 10 mostra o valor obtido do erro para a medida.

Tabela 10. Determinação do erro experimental para as determinações dos TS.

Leituras	Média	Desvio padrão	Erro
2.80	2.87	0.058	± 0.067
2.90			
2.90			

A Tabela 11 contém os valores de TS obtidos pelo método de referência.

Tabela 11. Valores dos TS obtidos pelo método de referência.

Amostra	Data	TS (g/L)	Limite inferior (95%)	Limite superior (95%)
1	04-05-2006	3.44	3.37	3.51
2	04-05-2006	3.72	3.65	3.79
3	04-05-2006	3.64	3.57	3.71
4	04-05-2006	3.48	3.41	3.55
5	05-05-2006	3.80	3.73	3.87
6	05-05-2006	3.68	3.61	3.75
7	05-05-2006	3.60	3.53	3.67
8	08-05-2006	3.24	3.17	3.31
9	08-05-2006	3.32	3.25	3.39
10	08-05-2006	3.34	3.27	3.41
11	09-05-2006	3.32	3.25	3.39
12	09-05-2006	3.38	3.31	3.45
13	11-05-2006	3.16	3.09	3.23
14	11-05-2006	3.42	3.35	3.49

As determinações dos TS realizaram-se a diferentes tempos do ensaio e com apenas uma amostra a cada tempo devido à inexistência de material disponível e à necessidade de se monitorizar o ciclo a tempos diferentes.

Os espectros foram adquiridos pelo método anteriormente explicado. Utilizou-se o PLS com o objectivo de correlacionar o espectro obtido ou certas zonas do espectro com os valores de TS. Os espectros foram pré-processados utilizando um filtro de Savitzky-Golay (15,2,2), correcção ortogonal de sinal (OSC) e SNV. Os valores para os TS foram centrados na média. O número de variáveis latentes foi estimado através de validação cruzada LOO.

A Figura 37 ilustra o erro obtido com validação cruzada para diferentes números de variáveis latentes. Através da realização da validação cruzada, como demonstra a Figura 37, escolheu-se duas variáveis latentes para o modelo. O RMSECV obtido foi de 0.086 g/L para duas variáveis latentes. Neste caso é clara a decisão quanto ao número de variáveis latentes que o modelo deve conter.

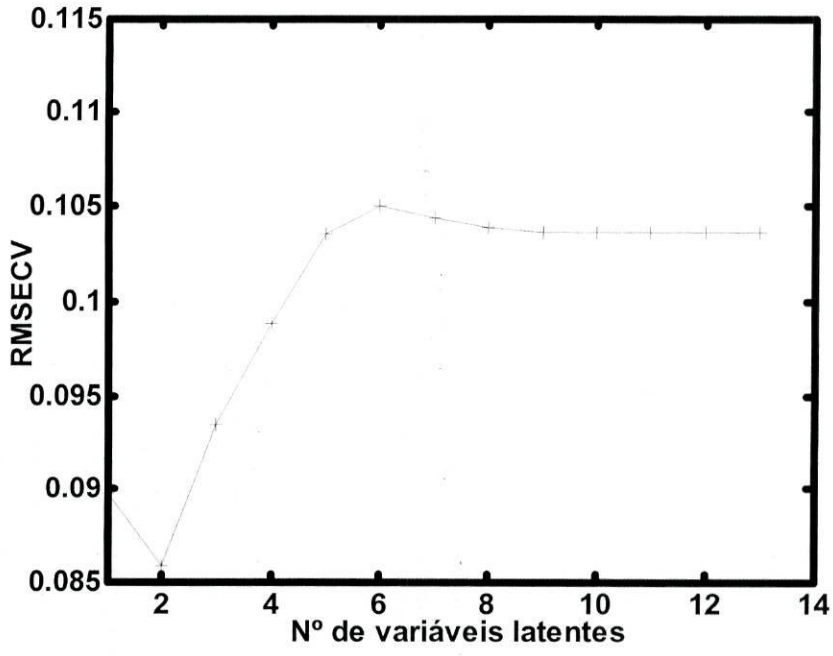


Figura 37. Erro da validação cruzada em função do número de variáveis latentes.

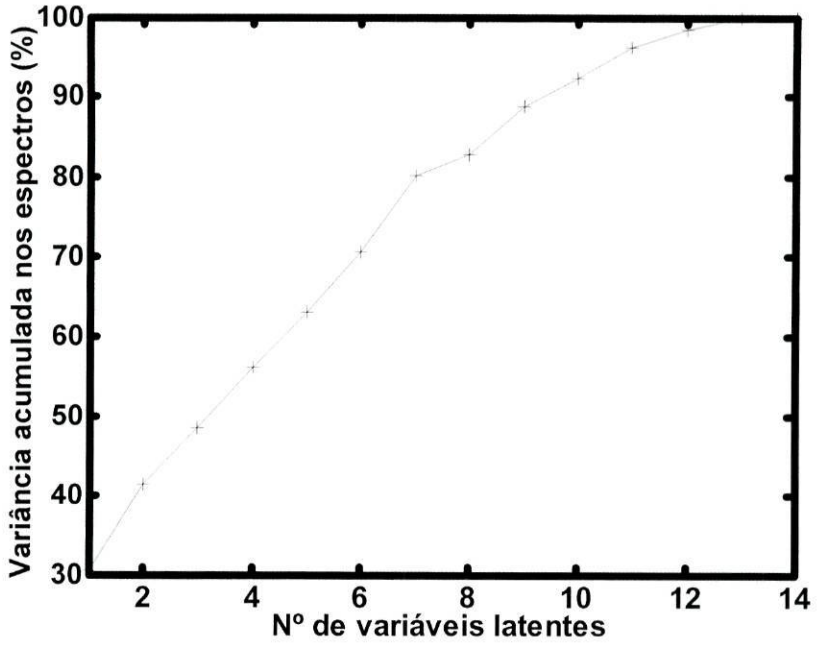


Figura 38. Percentagem da variância cumulativa capturada nos espectros em função do número de variáveis latentes.

A Figura 38 demonstra o número de variáveis latentes em função da variância capturada para os espectros e como é possível verificar só com perto de nove variáveis latentes do modelo é que conseguimos capturar perto de 90% da variância nos espectros. Isto demonstra que a informação presente nos espectros para modelar os TS é apenas uma fracção da informação total existente. A Figura 39 demonstra o número de variáveis latentes em função da variância capturada nos TS e neste caso só com apenas duas variáveis latentes conseguimos capturar perto de 96% da variância dos TS.

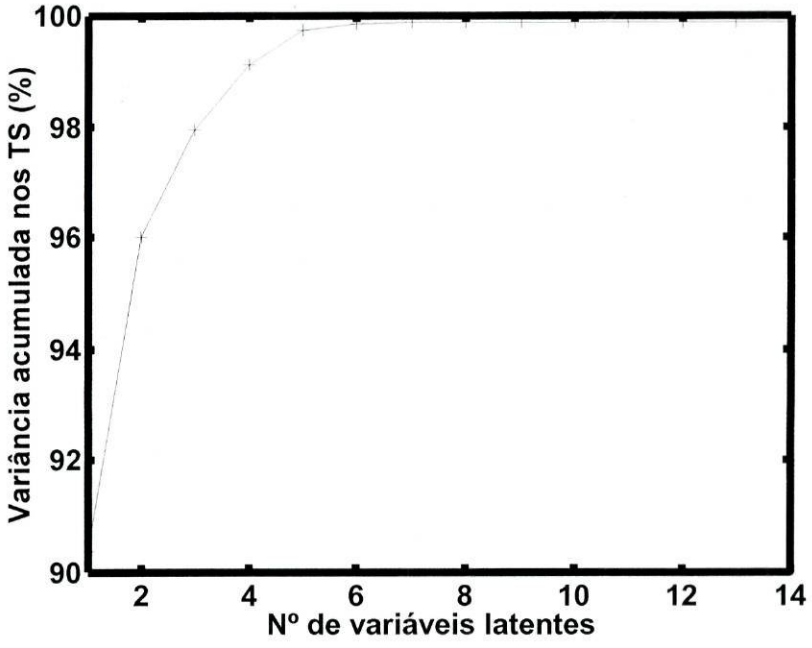


Figura 39. Percentagem da variância cumulativa capturada nos TS em função do número de variáveis latentes.

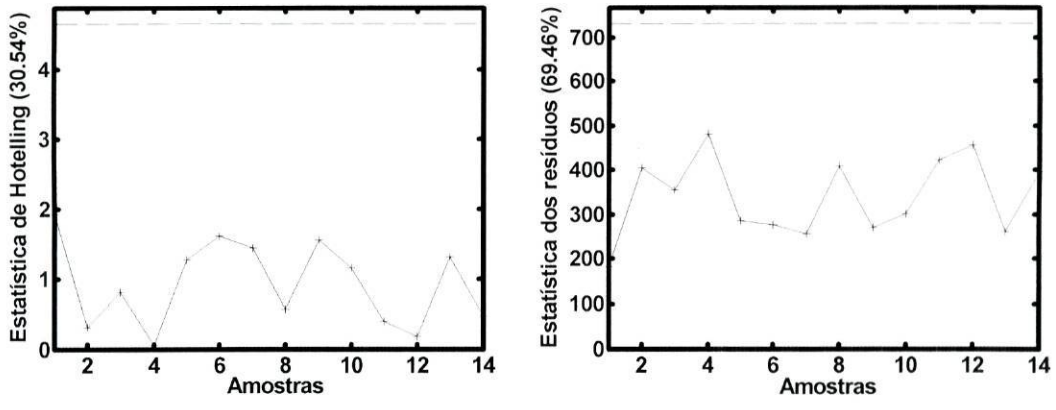


Figura 40. Valores das estatísticas de Hotelling e resíduos em função das amostras.

Os valores das estatísticas de Hotteling e dos resíduos permitem para este caso validar o modelo PLS. Em nenhum dos casos é possível identificar a presença de valores atípicos.

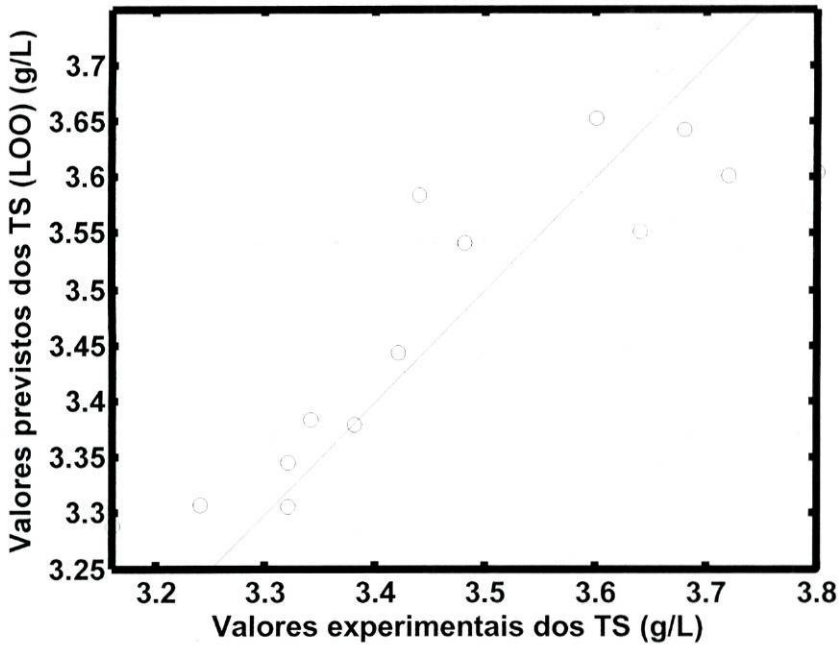


Figura 41. Valores de TS experimentais em função valores de TS previstos pela validação cruzada.

Os valores obtidos pelo método de referência estão expressos na Figura 41 em função dos valores previstos pelo modelo. Como se pode visualizar a gama de valores estudados não é muito ampla novamente mas contempla diferenças e é possível verificar a resposta do modelo a estas gamas de concentrações dos TS. Os valores obtidos pelo modelo têm um erro de 0.086 g/L o que corresponde a um erro próximo de 2% para as gamas de concentração mais baixas.

É de realçar o baixo erro obtido pelo modelo construído visto este estar baseado nos resultados obtidos pelo método de referência. O método de referência para a determinação de TS possui um erro de 2% também para as gamas de concentrações mais baixas. O método de referência além do tempo de determinação ser elevada, a amostra é destruída. Tem como vantagem ser um método simples e não ter necessidade de mão-de-obra especializada.

Capítulo 6. Monitorização *in-situ* do SBR

O objectivo deste secção experimental foi o de monitorizar o SBR com a sonda de transflectância e se possível através da sonda observar a evolução dos ciclos, de modo a poder detectar as diferentes fases do processo assim como identificar falhas no processo. A identificação de falhas pode ser observada e controlada através das estatísticas de Hotteling e dos resíduos.

6.1. Descrição dos ensaios realizados

Foram efectuados 8 ensaios com aquisição de espectros NIR *in-situ* de ciclos de operação. Destes foram seleccionados 6 ensaios para calibrar um modelo PCA. Dois ensaios (um normal e um atípico) foram seleccionados para validar o modelo PCA. Os espectros foram monitorizados em geral de 30 em 30 minutos (contudo em alguns ciclos não existem espectros para toda a duração).

Tabela 12. Sumário dos ensaios monitorizados com sonda NIR introduzida no reactor.

Nº	Data	Nº de espectros adquiridos	Observações
1	03.05.06	24	Ensaio nominal
2	04.05.06	25	Ensaio nominal
3	08.05.06	26	Ensaio nominal
4	09.05.06	47	Ensaio nominal
5	10.05.06	47	Ensaio nominal
6	12.05.06	30	Ensaio nominal
Total		**209**	
A1	11.05.06	43	Ensaio nominal
A2	05.05.06	33	Ensaio atípico*

* A medida de sólidos totais foi para este ensaio superior à registada em todos os outros ensaios. Esta alteração foi pela primeira vez detectada às 10 horas. No mesmo ensaio foi detectada a existência de uma pequena bolha de ar que influenciou o espectro nas primeiras horas do ciclo.

A Figura 42 representa um espectro típico de absorvância com a banda típica da água a aparecer na região dos 1450 nm. Outra banda característica aparece na região dos 1250 nm.

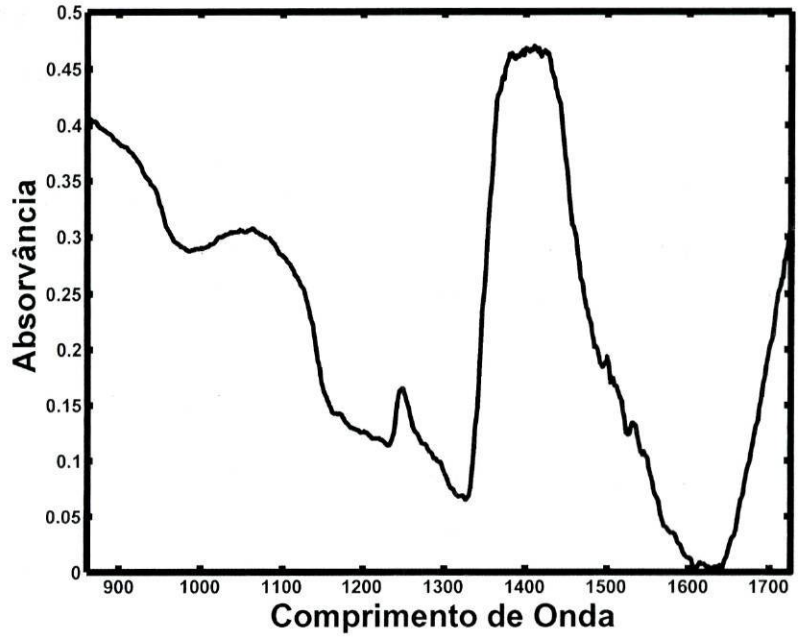


Figura 42. Espectro NIR de transflectância obtido para o ensaio 1 às 0:00 horas (final da fase de reacção/início da fase de sedimentação).

6.2. Modelação do estado do sistema

A Figura 43 representa os espectros sobrepostos utilizados para a construção do modelo de PCA e os ensaios sobrepostos utilizados na validação do mesmo. Todos os espectros foram pré-processados através de um filtro Savitzky-Golay (27,2,1) e centrados na média. No ensaio atípico na zona entre 1450 e 1600 nm nota-se uma ligeira diferença da sobreposição das bandas. Esta diferença pode ser amplificada para uma melhor separação através da análise de componentes principais, base da estratégia de supervisão adoptada.

A Tabela 13 representa a variância capturada e acumulada para cada componente principal. Com apenas 3 componentes principais consegue-se capturar aproximadamente 93% da variância total.

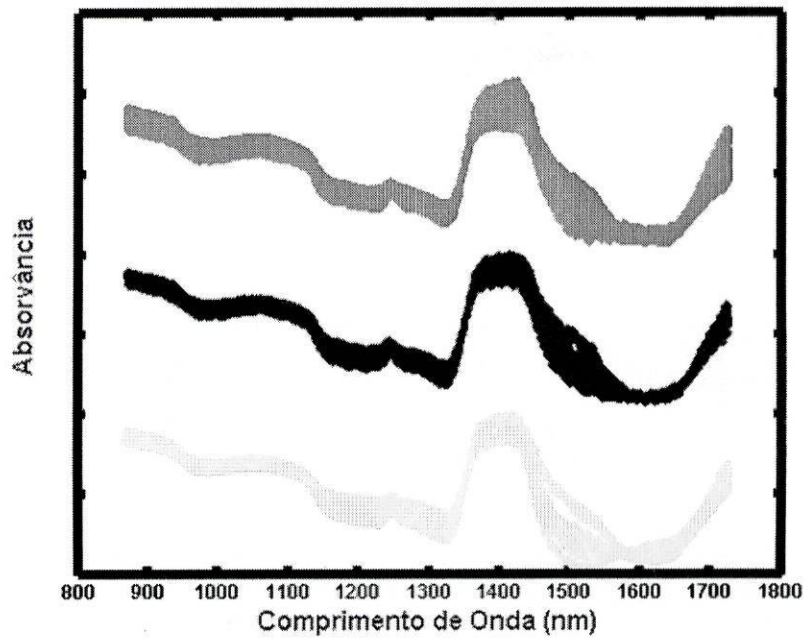


Figura 43. Representação dos espectros sobrepostos correspondentes aos ensaios de calibração (topo), ensaio A1 (meio) e ensaio atípico A2 (baixo).

Tabela 13. Variância capturada pelo modelo PCA utilizando os 209 espectros correspondentes aos 6 ensaios de calibração.

Componente principal	Valor próprio ($x10^{-3}$)	% Variância capturada	% Variância capturada acumulada
1	0.1477	67.14	67.14
2	0.0492	22.36	89.50
3	0.0082	3.72	93.22
4	0.0041	1.88	95.10
5	0.0030	1.35	96.45
6	0.0015	0.68	97.13
7	0.0014	0.64	97.77
8	0.0010	0.44	98.21
9	0.0007	0.33	98.54
10	0.0006	0.25	98.79

A Figura 44 representa a evolução em termos do valor do componente principal 1 com as diferentes fases dos ensaios ilustrados. Todos os ensaios têm a mesma evolução no primeiro componente. É possível verificar uma diminuição do valor do primeiro componente principal nas fases de sedimentação e descarga. Na fase da carga visualiza-se um aumento do valor, talvez devido à adição de matéria orgânica. Quando é iniciado a fase de agitação/arejamento o valor do primeiro componente principal aumenta (máximo valor) e posteriormente esse valor vai baixando com o tempo até alcançar um período de estabilização do valor (a partir das 10 h). Este decréscimo do valor está ligado talvez à decomposição da matéria orgânica do meio por parte da biomassa. Com os resultados obtidos na monitorização do COD, em que se conclui que a matéria orgânica da carga é degradada em aproximadamente 4.5 horas, pode-se dizer que este decréscimo do valor resulta da degradação da matéria orgânica.

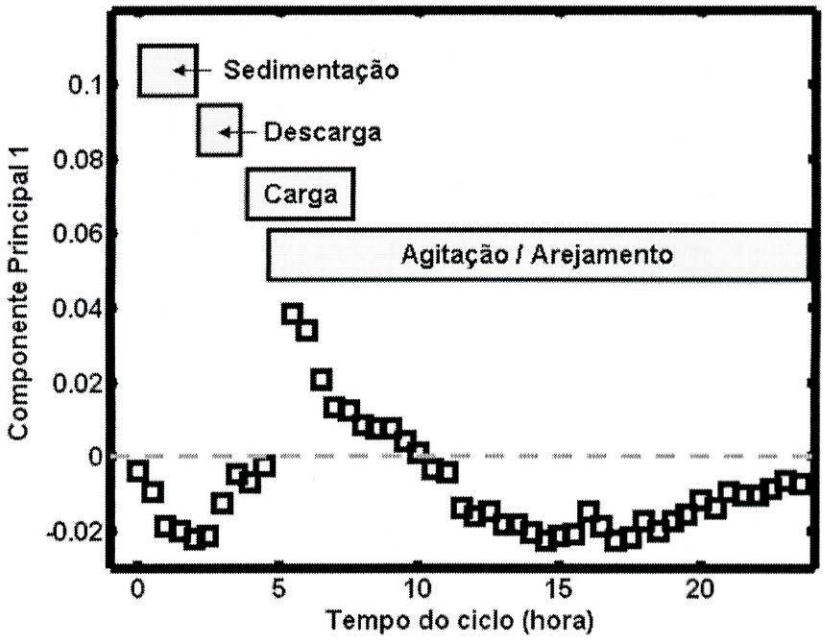


Figura 44. Primeiro componente principal relativo ao ensaio de 10.05.06. Os espectros foram pré-processados com um filtro de Savitzsky-Golay (27,2,1) e centrados na média. As barras no topo do gráfico indicam as fases do ciclo.

A Figura 45 ilustra um mapa de componentes principais (1º e 2º) obtidos para o ensaio 6. A aglomeração dos pontos foi realçada através da identificação de 3 grupos. Estes podem ser avaliados como 3 estados distintos do processo ao longo do ciclo. O primeiro grupo engloba as fases de sedimentação, descarga e uma parte da carga. Quando é iniciada a fase de agitação/arejamento o valores variam até estabilizarem um pouco (grupo II). O grupo II engloba o resto da fase da carga e uma parte da fase de reacção. Posteriormente os valores caminham para

um terceiro grupo onde o processo parece estabilizar. Isto também é visível na Figura 44 e a explicação também é a mesma.

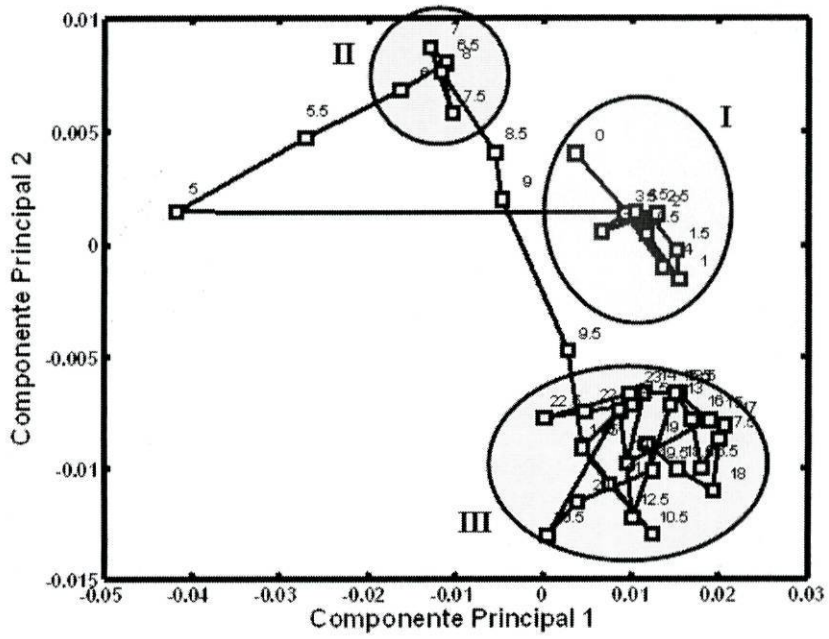


Figura 45. Segundo componente principal em função do primeiro componente do ensaio 6.

A Figura 46 demonstra o perfil seguido pelos ensaios nominais usados na construção do modelo e os outros dois ensaios (A1 e A2) usados na validação do mesmo em função dos três primeiros componentes principais (95.1% de variância). Visualiza-se que os valores obtidos para o ensaio A1 (nominal) estão dentro da zona dos valores obtidos para a construção do modelo. Por outro lado visualiza-se que alguns valores obtidos para o ensaio A2 (atípico) encontram-se afastados da zona dos valores usados para a construção do modelo.

Pode por isso verificar-se neste caso que o modelo foi capaz de identificar o ciclo atípico como sendo não-nominal em termos dos primeiros componentes principais. Esta informação deverá ser possível obter para as estatísticas de Hotelling e resíduos.

A Figura 47 demonstra o valor do primeiro componente em função do tempo do ciclo. Como na Figura 46, é possível verificar a consistência dos valores obtidos na construção do modelo com os valores do ensaio A1. Também se visualiza que nas primeiras 10 h no ensaio A2 existe alguma anomalia embora já se observe o começo dessa anomalia no fim do ensaio anterior.

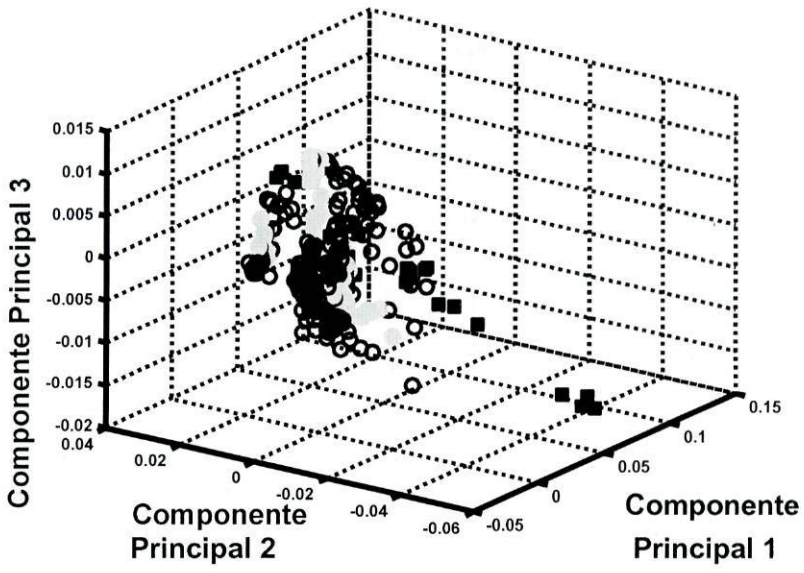


Figura 46. Mapa de componentes principais para os ensaios monitorizados com a sonda NIR *in-situ*. Os ensaios de calibração (1-6) foram usados para geração do modelo (pré-processamento com Savitzky-Golay (27,2,1) e centro na média). A variância capturada nos três componentes principais é de 95.6%. Projectam-se os ensaios A1 e A2.

Legenda: O Ensaios nominais, ● Ensaio A1 (nominal), ■ Ensaio A2 (atípico).

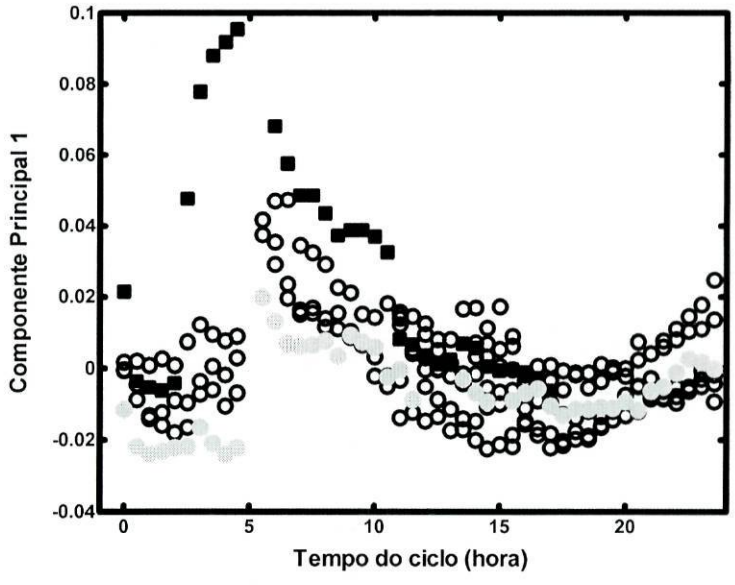
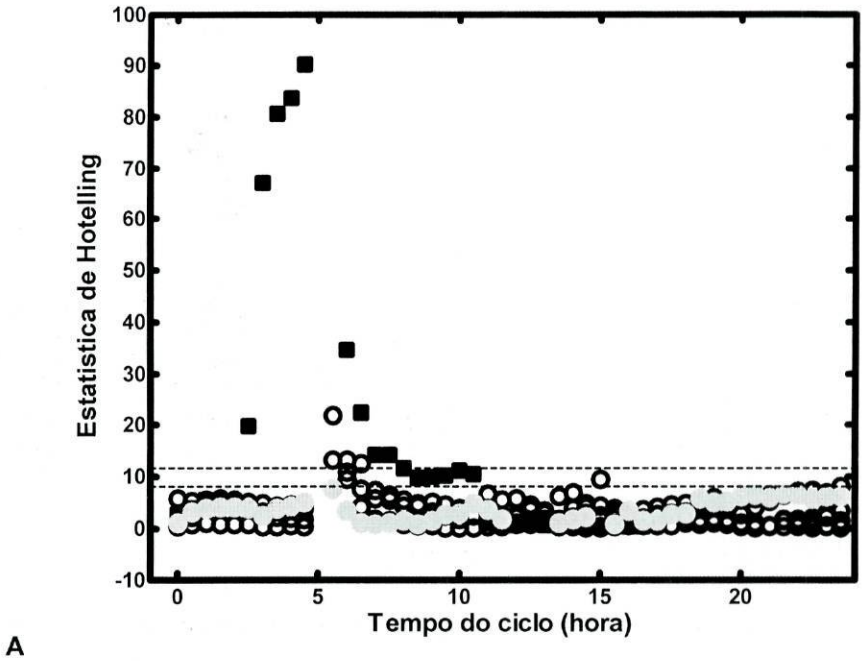
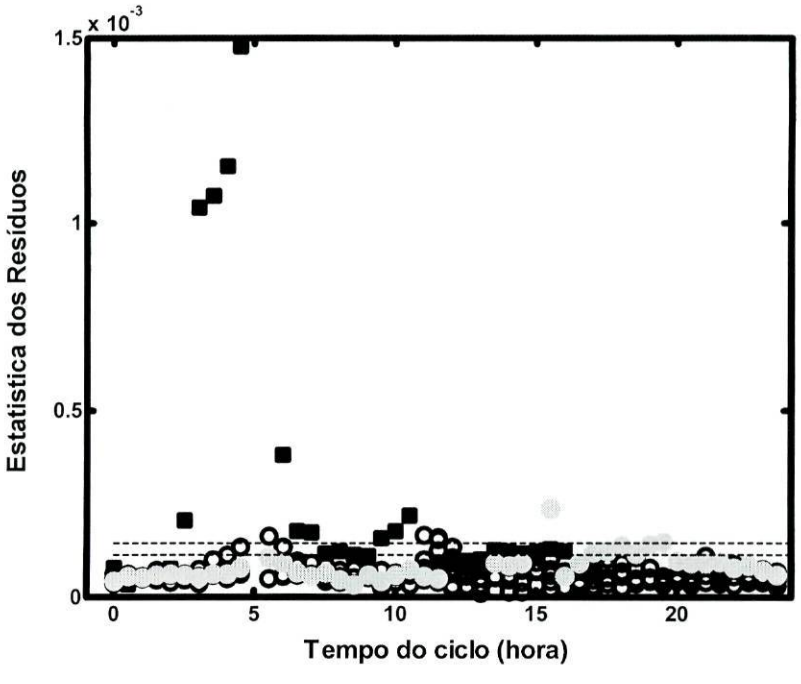


Figura 47. Evolução do primeiro componente principal em função do tempo para os ensaios nominais e para os dois ensaios projectados.

Legenda: O Ensaios nominais, ● Ensaio A1 (nominal para validação), ■ Ensaio A2 (atípico).



A



B

Figura 48. Estatísticas de Hotelling (A) e dos resíduos (B) em função do tempo para os ensaios nominais e para os dois ensaios projectados.

Legenda: O Ensaios nominais, ● Ensaio A1 (nominal para validação), ■ Ensaio A2 (atípico), -- Limites de confiança de 95 e 99%.

A análise dos gráficos de Hotelling e resíduos (Figuras 48(A) e 48(B) respectivamente) permite detectar valores atípicos, neste caso, permite detectar potenciais problemas no SBR. O comportamento das estatísticas para o ensaio A1 foi semelhante ao observado para os outros ensaios usados na construção do modelo. Em ambos os gráficos se visualiza que o ensaio A2 possui algumas anomalias durante as primeiras 10 h do ciclo. Este tipo de gráficos podem vir a ser muito importantes no controlo de ETAR's em termos de identificação de anomalias no momento, permitindo um controlo mais eficiente.

Capítulo 7. Conclusões

Os estudos realizados nesta tese demonstram a possível viabilidade da espectroscopia de infra-vermelho próximo (NIR) na monitorização de processos de lamas activadas, nomeadamente na estimativa de sólidos totais (TS), sólidos suspensos totais (TSS) e carência química de oxigénio (COD).

Em relação à utilização da espectroscopia NIR na medição da concentração de efluente simulado utilizado (leite magro diluído), obteve-se um erro de 0.0017% (v/v) numa elevada gama de concentrações (1 a 90% (v/v)). O erro obtido é baixo, demonstrando assim a capacidade da técnica para esta finalidade. Também se procedeu à medição da concentração do efluente simulado por infra-vermelho próximo de onda curta (SW-NIR), tendo o erro obtido sido de 0.0019% (v/v), embora numa gama curta de concentrações (1 a 4% (v/v)). O equipamento SW-NIR é inferior em termos de qualidade do próprio equipamento e o erro obtido comprova isso mesmo.

Os resultados obtidos da monitorização por NIR dos vários ciclos do reactor descontínuo sequencial (SBR) permitem concluir que o funcionamento do reactor de lamas activadas pode ser monitorizado em tempo real através da tecnologia NIR, permitindo a estimativa de alguns parâmetros importantes e uma detecção rápida de anomalias. Esta detecção rápida permite uma melhor, mais rápida e eficiente capacidade de resposta do operador, garantindo assim um controlo mais eficiente do processo de tratamento das águas residuais.

Os resultados obtidos para a estimativa por NIR dos parâmetros sólidos totais (TS) e sólidos suspensos totais (TSS) através de mínimos quadrados parciais (PLS) são muito prometedores. Em relação aos TSS obteve-se um erro de 0.13 g/L numa gama de concentrações de 2.36 a 3.12 g/L. O erro obtido é próximo de 5% para as gamas de concentração mais baixas. No modelo construído para os TS obteve-se um erro de 0.086 g/L numa gama de concentrações de 3.09 a 3.80 g/L. O erro obtido é próximo de 2% para as gamas de concentração mais baixas. O método de referência para a determinação de TSS possui um elevado erro (<15%) inerente à técnica além do tempo de determinação ser elevado. Para além disso a amostra analisada é destruída. O método de referência para a determinação de TS possui um erro baixo (<2%), o tempo de determinação é elevado e a amostra é igualmente destruída. Tem como vantagem ser um método simples e não ter necessidade de mão-de-obra especializada. A técnica NIR necessita de ferramentas de quimiometria capazes de relacionar o espectro com o parâmetro em questão. Isto é, a construção de um modelo necessita de pessoal especializado embora já não seja necessário depois do modelo estar implementado no sistema. A técnica possui um baixo tempo de determinação (alguns segundos) e é não destrutiva. A tecnologia NIR para este fim permite por

isso uma quantificação rápida de parâmetros processuais, aumentando assim a eficiência de monitorização do processo.

Em relação à utilização da tecnologia NIR na determinação do COD, obteve-se um erro de 78.4 mg O_2/L. O erro obtido é mais elevado quando comparado com os valores das concentrações mais baixas. Contudo, se tivermos em consideração os valores esperados, na ordem dos milhares de mg O_2/L para uma estação de tratamento de águas residuais o erro pode ser considerado aceitável. Comparando o erro obtido com a possibilidade de se obter resultados em tempo real, o erro pode torna-se aceitável, dependendo do grau de precisão necessário. O método de referência utilizado para a determinação de COD possui um erro baixo quando comparado com o obtido pela tecnologia NIR mas possui diversas desvantagens, tais como: geração de resíduos perigosos para o ambiente, utilização de reagentes perigosos para o ambiente e analista, possuir um tempo de determinação elevado (ordem das horas) e implicar a destruição da amostra. A opção de monitorização por NIR não sofre de nenhum destes problemas.

Em relação à utilização da tecnologia UV/Vis na determinação do COD ("at-line"), obteve-se um erro de 52.2 mg O_2/L. O erro obtido é inferior ao obtido com a tecnologia NIR embora como já foi dito, comparado com os valores reais de uma ETAR seja bastante baixo. Deve salientar-se que a determinação de COD por UV/Vis foi realizada "at-line" utilizando um passo de centrifugação da amostra. Numa situação de utilização em-linha de uma sonda de transmitância UV/Vis poder-se-ia igualmente esperar erros de estimativa maiores.

A utilização de espectros NIR recolhidos *in-situ* durante a operação do SBR permitiu gerar modelos de supervisão multivariada do processo. A informação contida no espectro NIR foi suficiente para a detecção das várias fases de operação do reactor. A supervisão da fase de reacção permitiu identificar o tempo necessário até se atingir um estado pseudo-estacionário, indicativo do quase consumo total de matéria orgânica (estabilização do COD). Esta informação é muito importante para o controlo deste tipo de processo de tratamento uma vez que permite gerir de forma mais flexível a duração dos ciclos sem necessidade de recurso a amostragem e testes laboratoriais morosos (a determinação do COD pelo método de referência é um processo que demora no mínimo 2-3 horas).

Estes resultados demonstram viabilidade e apontam o caminho para estudos mais detalhados sobre a utilização da espectroscopia NIR como um método alternativo para monitorização e controlo de processos de tratamento de águas residuais por lamas activadas.

7.1. Perspectivas futuras

Em termos de perspectivas futuras da tecnologia NIR na área ambiental, podem sugerir-se diferentes caminhos a seguir. Sugerem-se várias hipóteses a explorar em futuros estudos de investigação:

- extensão do trabalho desenvolvido em ambiente laboratorial a ambientes industriais (monitorização directamente em estações de tratamento industriais ou de resíduos urbanos);
- testes de determinação de outros parâmetros ambientais, para além dos estudados neste trabalho;
- consolidação dos modelos obtidos para medidas de concentração de biomassa (sólidos) e carga poluente (COD) com um maior número de análises e mais robustas;
- testar a espectroscopia NIR até aos 2,400 nm uma vez se ter utilizado um equipamento com um detector até aos 1800 nm;
- testar a aplicabilidade de medidas de reflectância difusa na monitorização de processos de lamas activadas (apenas foram testadas medidas de transflectância);
- extensão desta abordagem baseada na monitorização *in-situ* com sondas NIR a outros processos de tratamento na área ambiental.

Bibliografia

Amaral A. (2003) Image analysis in biotechnological processes: applications to wastewater treatment, Tese de Doutoramento, Universidade do Minho.

Arnold S.A., Gaensakoo R., Harvey L.M., McNeil B. (2002) Use of "at-line" and *in-situ* near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli Process, Biotechnol. Bioeng., 80 (4), 405-413.

Aske N., Kallevik H., Sjöblom J. (2001) Determination of saturate, aromatic, resin and asphaltenic (SARA) components in crude oil by means of infrared and near infrared spectroscopy, Energy Fuels, 15, 1304–1312.

Bakeev K.A. Ed. (2005) Process Analytical Technology, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 451pp.

Barnes R., Dhanoa M., Lister S. (1989) Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance, Appl. Spectrosc., 43, 772-777

Bertran E., Iturriaga H., Maspoch S., Montoliu I. (2001) Effect of orthogonal signal correction on the determination of compounds with very similar near infrared spectra, Anal. Chim. Acta, 431, 303–311.

Bitton G. (1994) Wastewater Microbiology, Wiley-Liss, New York.

Blanco M., Coello J., Montoliu I., Romero M.A. (2001) Effect of orthogonal signal correction on the determination of compounds with very similar near infrared spectra, Anal Chim Acta, 434, 125–132.

Blanco M., Villaroya, I. (2002) NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool, Anal. Chem., 21, 240.

Brennan D., Alderman J., Sattler L., O'Connor B., O'Mathuna C. (2003) Issues in development of NIR micro spectrometer system for "on-line" process monitoring of milk product, Measurement, 33, 67–74.

Büning-Pfaue H. (2003) Analysis of water in food by near infrared spectroscopy, Food Chem. 82, 107–115.

Casellas M., Dagot C., Pons M., Guibaud G., Tixier N., Baudu M. (2004) Characterisation of the structural state of flocculent microorganisms in relation to the purificatory performances of sequencing batch reactors, Biochem. Eng. J., 21, 171–181.

Chen G., McAvoy J. (1998) Predictive on-line monitoring of continous processes, J. Proc. Cont., 8(5), 409-420.

Chen G., McAvoy J., Piovoso M. (1998) A multivariate statistical controller for online quality improvement, J. Proc. Cont., 8(2), 139-149.

Chen D., Hu B., Shao X., Su Q. (2004) Removal of major interference sources in aqueous near-infrared spectroscopy techniques, Anal. Bioanal. Chem., 379, 143–148.

Cheng-Wen C.W., Laird D.A., Mausbach M.J, Hurburgh, C.R.Jr. (2001) Near-infrared reflectance spectroscopy–principal components regression analyses of soil properties, Soil Sci. Soc. Am. J., 65, 480–490.

Cooper C.D., Mustard J.F. (2002) Spectroscopy of loose and cemented sulfate-bearing soils: Implications for duricrust on Mars, Icarus, 158, 42.

Čurda L., Kukačková O. (2004) NIR spectroscopy: a useful tool for rapid monitoring of processed cheeses manufacture, J. Food Eng., 61, 557–560.

Denham M., 1995, Implementing partial least squares, Stat. Comput., 5, 191-202.

Eikelboom D. (2000) Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation, IWA Publishing, 150pp.

Ferrão M.F., Carvalho C.W., Muller E.I., Davanzo C.U. (2004) Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIRR-PLS DRIFT-PLS1, Cienc. Tecnol. Alimentos, 24, 333–340.

Franco D., Núñez M.J., Pinelo M., Sineiro J. (2005) Applicability of NIR spectroscopy to determine oil and other physicochemical parameters in Rosa mosqueta and Chilean hazelnut, Eur. Food Res. Technol., 222, 443–450.

Geladi P., Kowalsky B. (1986) Partial least squares regression: a tutorial, Anal. Chim. Acta, 185, 1-17.

Geladi P., Forsström J. (2002) Monitoring, of a batch organic synthesis by near-infrared spectroscopy: modeling and interpretation of three-way data, J. Chemom., 16, 329–338.

Gonçalves I.C., Penha S., Matos M., Santos A.R., Franco F., Pinheiro H.M. (2005) Evaluation of an integrated anaerobic/aerobic SBR system for the treatment of wool dyeing effluents, Biodegradation, 16, 81–89.

Gonzalez-Vara A.R., Vaccari G., Dosi E., Trilli A., Rossi M., Matteuzzi D. (2000) Enhanced production of l-(+)-lactic acid in chemostat by Lactobacillus casei DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR, Biotechnol. Bioeng., 67(2), 147–156.

Grznar J., Booth D. (1997) A Robust smoothing approach to statistical process control, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 37, 246-248.

Heikka R.A, Immonen K.T., Minkkinen P.O., Paatero E., Salmi T.O. (1997) Determination of acid value, hydroxyl Value and water content in reactions between dicarboxylic acids and diols using near-infrared spectroscopy and non-linear partial least squares regression, Anal. Chim. Acta, 349, 287–294.

Herschel W. (1800a) Phil Trans. Roy. Soc. London. Part II, 255.

Herschel W. (1800b) Phil. Trans. Roy. Soc. London. Part II, 284.

Holm-Nielsen J.B., Dahl C.K., Esbensen K.H. (2006) Representative sampling for process analytical characterization of heterogeneous bioslurry systems—a reference study of sampling issues in PAT, Chemom. Intell. Lab. Syst., 83, 114-126.

Kassidas A., Taylor P., MacGregor J. (1998) Off line diagnosis of deterministic faults in continuous dynamic multivariable processes using speech recognition methods, J. Proc. Cont., 8(5), 381-393.

Kays S.E., Windham W.R., Barton I. (1996) Prediction of total dietary fiber in cereal products using near-infrared reflectance spectroscopy, J. Agric. Food Chem., 44, 2266–2271.

Kays S.E., Windham W.R., Barton I., (2002) Near-infrared analysis of soluble and insoluble dietary fiber fractions of cereal food products, J Agric Food Chem, 50, 3024–3029.

Kubelka e Munk (1931) Zeit. Für Tekn. Physik, 12, p593.

Kukačková O., Čurda, L., Jindřich, J. (2000) Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy, Czech J. Food Sci., 18(1), 1–4.

Laporte, M.F., Martel, R., Paquin, P. (1998) The NIR optic probe for monitoring rennet coagulation in individual cow milks, Int.Dairy J., 8, 659-666.

Laporte M.F., Paquin P. (1999) Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk, J. Agric. Food Chem. 47, 2600-2605.

Lee, S. J., Jeon, I. J., Harbers, L. H. (1997) Near-infrared reflectance spectroscopy for rapid analysis of curds during Cheddar making, J. Food Sci., 62 (1), 53-56.

Liu J., Böjrnsson L., Mattiasson B., (2000) Immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement, Biosens. Bioelectron., 14, 883–893.

Lopes J. (2001) Supervisão e diagnóstico de processos farmacêuticos com métodos inteligentes de análise de dados, Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa.

Lopes J.A., Costa P..F., Alves T.P., Menezes J.C. (2004a) Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technologies (PAT) applications, Chemom. Intell. Lab. Syst., 74, 269-275.

Lopes J.A., Menezes J.C. (2004b) Multivariate monitoring of fermentation processes with non-linear methods, Anal. Chim. Acta, 515(1), 101-108.

MacGregor J., Jaeckle C., Kiparissides C., Koutoudi M., 1994, Process monitoring and diagnosis by multiblock PLS methods, Proc. Syst. Eng., 40(5), 826-838.

Martens H., Naes T. (1992) Multivariate calibration, John Wiley & Sons, New York, pp 438.

Martens, H., Pram Nielsen, J., Balling Engelsen, S (2003) Light scattering and light absorbance separated by extended multiplicative signal correction. Application to near-infrared transmission analysis of powder mixtures, Anal. Chem. 75(3), 394–404.

Martin E., Morris J. (1996a) An overview of multivariate statistical process control in continous and batch process monitoring, Trans. Inst. MC, 18(1), 51-60.

Martin E., Morris J. (1996b), Non-parametric confidence bounds for process performance monitoring charts, J. Proc. Cont., 6(6), 349-358.

McGill C.A., Nordon A., Littlejohn D. (2002) Evaluation of low-field nuclear magnetic resonance spectrometry for at-line process analysis, Analyst, 127, 287–292.

Metcalf e Eddy (1991) Wastewater Engineering, McGraw-Hill International Editions, 3rd edition.

Naes T., Isaksson t., Fearn T., Davies t. (2002) A use friendly guide to Multivariate Calibration and Clarification, NIR publications, Chichester, UK.

Nomikos P., MacGregor J. (1995) Multivariate SPC charts for monitoring batch processes, Technometrics, 37(1), 41-59.

Ogunnaike B., Ray W. (1994) Process dynamics, modeling and control, Oxford University Press, New York, USA.

Ozen B.F., Mauer L.J. (2002) Detection of hazelnut oil adulteration using FT-IR spectroscopy, J. Agric. Food Chem., 50, 3898–3901.

Pasquini C. (2003) Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications, J. Braz. Chem. Soc., 14 (2), 198-219.

Pierce, M. M., Wehling, R. L. (1994) Comparison of sample handling and data treatment methods for determining moisture and fat in Cheddar cheese by near-infrared spectroscopy, J. Agric. Food Chem., 42, 2830-2835.

Pons M., Bonté S., Potier O. (2004) Spectral analysis and fingerprinting for biomedia characterization, J. Biotechnol., 113, 211–230.

Richard M. (1989) Activated Sludge Microbiology, The Water Pollution Control Federation, Alexandria.

Rodionova O.Y., Houmøller L.P., Pomerantsev A.L., Geladi P., Burger J., Dorofeyev V.L., Arzamastsev A.P. (2005) NIR spectrometry for counterfeit drug detection, Anal. Chim. Acta, 549, 151–158.

Rodriguez-Otero, J.L., Hermida, M. (1996) Analysis of fermented milk products by near-infrared reflectance spectroscopy. J. AOAC Int. 79 (3), 817-821.

Sasic S., Ozaki Y. (2001) Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares, Anal. Chem., 73, 64-71.

Sjöblom J., Svensson O., Josefson M., Kullberg H., Wold S. (1998) An evaluation of orthogonal signal correction applied to calibration transfer of near infrared spectra, Chemom. Intell. Lab. Syst., 44, 229–244.

Stephens A.B., Walker P.N. (2002) Near-infrared spectroscopy as a tool for real-time determination of BOD5 for single-source samples, Trans. ASAE, 45 (2), 451–458.

Symons M.C.R. (2000) Spectroscopy of aqueous solutions: protein and DNA interactions with water CMLS, Cell. Mol. Life Sci., 57, 999–1007.

Tøgersen G., Isaksson T., Nilsen B.N., Bakker E.A, Hildrum K.I. (1999) On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches, Meat Science, 51, 97-102.

Trygg J., Wold S., 1998, PLS regression on wavelet compressed NIR spectra, Chemom. Intell. Lab. Syst., 42, 209-220.

Uddin M., Okazaki E., Ahmad M.U., Fukuda Y., Tanaka M. (2006) NIR spectroscopy: A non-destructive fast technique to verify heat treatment of fish-meat gel, Food Control, 17, 660–664.

Vaidyanathan S., Arnold S.A., Matheson L., Mohan P., McNeil B., Harvey L. (2001) Assessment of near-infrared spectral information for rapid monitoring of bioprocess quality, Biotechnol. Bioeng., 74 (5), 376–388.

Vaidyanathan S., White S., Harvey L., McNeil B. (2003) Influence of morphology on the near-infrared spectra of mycelial biomass and its implications in bioprocess monitoring, Biotechnol. Bioeng., 82 (6), 715–724.

Wachs A., Lewin D., 1999, Improved PCA methods for process disturbance and failure Identification, AIChE J., 45(8), 1688-1700.

Wählby U., Skjöldebrand C. (2001) NIR-measurements of moisture changes in foods, J. Food Eng., 47, 303–312.

Wise B., Gallagher N. (1996) The process chemometrics approach to process monitoring and fault detection, J. Proc. Cont., 8(6), 329-348.

Wold S, Antti H, Lindgren F, Ohman J. (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. Chemom. Intell. Lab. Syst., 44:175-185.

Yabuki Y., MacGregor J. (1997) Product quality control in semibatch reactors using midcourse correction policies, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 36, 1268-1275.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA