

DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL, DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO E DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO EM EFLUENTES UTILIZANDO FLUORESCÊNCIA 3D E QUIMIOMETRIA

Ellisson Henrique de Paulo⁽¹⁾

Mestre em Química pela Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Atualmente doutorando em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pesquisador da Tommasi Ambiental e do Tommasi Laboratório.

Otávio Arruda Heringer⁽²⁾

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Vila Velha (UVV). Atualmente diretor operacional da Tommasi Ambiental e pesquisador do Tommasi Laboratório.

Paulo Roberto Filgueiras⁽³⁾

Doutor em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Atualmente professor de Química na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Marco Flôres Ferrão⁽⁴⁾

Doutor em Ciências pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Atualmente professor de Química na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Endereço⁽¹⁾: Rua Arara Azul, 187, Galpão branco - Novo Horizonte - Serra - Espírito Santo - CEP: 29163-306 - Brasil - Tel: +55 (27) 3340-8200 - e-mail: ellisson.hp@gmail.com, ellisson@tommasi.com.br.

RESUMO

A análise físico-química da água e efluentes é essencial para assegurar a conformidade com regulamentações ambientais e de saúde pública. Métodos tradicionais, como DBO, DQO e COT, enfrentam desafios experimentais, como imprecisão e longos tempos de análise. A fluorescência EEM emerge como uma alternativa promissora, oferecendo uma visão abrangente da composição da água. No entanto, a complexidade dos espectros EEM demanda quimiometria para correlacionar os dados espectrais com propriedades como DBO, DQO e COT. Foram construídos modelos UPLS que apresentaram alta capacidade preditiva para as três propriedades. Para DBO, o modelo teve RMSEC de 0,047, RMSEP de 0,069, R^2_c de 0,914 e R^2_p de 0,815. Para DQO, RMSEC de 0,0689, RMSEP de 0,0532, R^2_c de 0,703 e R^2_p de 0,787. Para COT, RMSEC de 0,0165, RMSEP de 0,0161, R^2_c de 0,834 e R^2_p de 0,872. A aplicação de quimiometria com fluorescência EEM representa um avanço, simplificando processos de análise e melhorando a precisão dos resultados. Promete contribuir para a gestão sustentável dos recursos hídricos e a preservação do meio ambiente, oferecendo uma alternativa viável e eficaz aos métodos tradicionais de análise de água.

PALAVRAS-CHAVE: Quimiometria, fluorescência 3D, efluentes.

INTRODUÇÃO

A análise físico-química da água e efluentes desempenha um papel fundamental na identificação e quantificação de propriedades essenciais para o controle de qualidade (Findlay & Sinsabaugh, 2003; Lipps et al., 2023). Tanto a água destinada ao consumo humano quanto os efluentes lançados no meio ambiente devem ser rigorosamente avaliados para garantir conformidade com as legislações ambientais e de saúde pública (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011). Uma gama diversificada de análises físico-químicas é empregada nesse processo, sendo a determinação da matéria orgânica uma das mais relevantes (Leenheer & Croué, 2003; Marhaba et al., 2000; Parron et al., 2011).

A matéria orgânica presente na água abrange uma ampla variedade de substâncias, incluindo proteínas, carboidratos e outros compostos orgânicos complexos (Findlay & Sinsabaugh, 2003; Mostofa et al., 2013). A sua quantificação é frequentemente realizada através de métodos como a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO) (Lipps et al., 2023). Esses métodos visam avaliar a carga de matéria orgânica suscetível à biodegradação por microrganismos ou agentes oxidantes através do consumo de oxigênio do meio, fornecendo uma medida importante da qualidade da água em termos de sua capacidade de suportar vida aquática e manter ecossistemas saudáveis (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011).

Além da avaliação da matéria orgânica por DBO e DQO, a determinação do teor de carbono orgânico total (COT) na água é outra análise crucial (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011). Este método quantifica todas as formas de carbono orgânico presentes na amostra, fornecendo informações valiosas sobre a composição química e a qualidade geral da água. A avaliação de COT é essencial para compreender a origem e a natureza da poluição orgânica na água, bem como para monitorar a eficácia de processos de tratamento (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011).

Contudo, as análises tradicionais enfrentam várias limitações experimentais que podem comprometer a sua eficácia e eficiência. Questões como imprecisão, longos tempos de análise, exigência de cultivo de microrganismos, controle rigoroso da temperatura e influência do intemperismo, especialmente no caso da DBO, além do uso de reagentes tóxicos na DQO e a necessidade de equipamentos complexos e a destruição da amostra no caso do COT, são apenas algumas das barreiras enfrentadas por esses métodos (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011). Essas desvantagens tornam as análises de DBO, DQO e COT extremamente laboriosas e, por vezes, pouco práticas para aplicações em larga escala (Lipps et al., 2023; Parron et al., 2011).

Uma alternativa promissora para superar essas limitações é a utilização de métodos espectroscópicos (Christian et al., 2017). A espectroscopia de emissão de fluorescência, por exemplo, emerge como uma técnica não destrutiva, rápida e altamente correlacionada a vários compostos orgânicos presentes na água (Khan et al., 2022). Uma extensão poderosa dessa técnica é a fluorescência em matriz de excitação-emissão (EEM, do inglês excitation-emission matrix), também conhecida como fluorescência 3D, cujos espectros de emissão são adquiridos simultaneamente em diversos comprimentos de onda de excitação, resultando em um mapa tridimensional detalhado para cada amostra (Lakowicz, 2006). Dessa forma, a fluorescência EEM é capaz de fornecer uma quantidade significativa de informações químicas em um único espectro, o que pode revolucionar a forma como a qualidade da água é avaliada (Khan et al., 2022).

No entanto, lidar com a complexidade dos espectros EEM pode ser uma tarefa desafiadora, devido à sua natureza tridimensional (Chen et al., 2022). Nesse contexto, métodos de quimiometria desempenham um papel imprescindível. A quimiometria é essencial para organizar e correlacionar os espectros EEM com as propriedades de interesse, como DBO, DQO e COT (Dai et al., 2022). Por meio da construção de modelos de regressão linear, como a regressão por mínimos quadrados parciais desdobrados (UPLS, do inglês unfolded partial least squares) (Olivieri et al., 2015). Esses modelos podem ser empregados para quantificar as propriedades de forma mais rápida, proporcionando uma abordagem mais acessível e robusta para a análise de água e efluentes (Dai et al., 2022). Neste estudo, a combinação de espectroscopia de fluorescência EEM com técnicas de quimiometria foi avaliada para a construção de modelos capazes de quantificar a DBO, DQO e COT em amostras de efluentes sanitários.

OBJETIVOS

Construir modelos de regressão UPLS via fluorescência EEM para determinar DBO, DQO e COT em amostras de efluentes sanitários.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizadas 32 amostras de efluentes coletadas no estado do Espírito Santo. A determinação experimental de DBO, DQO e COT foi realizada seguindo os métodos 5210B, 5220D e 5310B da *American Public Health Agency* (Lipps et al., 2023). A DBO foi determinada usando um oxímetro, a DQO foi determinada usando um espectrofotômetro no Ultravioleta-visível (UV-vis) e o COT foi determinado pelo analisador TOC da Shimadzu com detecção por infravermelho. Todos resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os dados de COT, DBO e DQO foram tratados com a equação 1 para melhorar a distribuição dos valores, na qual v_i são os valores iniciais das propriedades físico-químicas, \log é o operador logarítmico e v_f é o valor padronizado das propriedades (Dias & Aguiar, 2011).

$$v_f = \log(\log(v_i + 1))$$

equação (1)

Os espectros EEM foram coletados num fluorímetro Horiba Aqualog usando a faixa de excitação em 200 a 800 nm e emissão em 250 a 800 nm (ASTM International, 2022). Os espectros foram corrigidos pelo efeito de filtro interno, espalhamento Raman e Rayleigh (Bahram et al., 2006). Para a construção da matriz de dados, os espectros EEM foram desdobrados com a estratégia *unfold-muliway* (Olivieri et al., 2015). As amostras foram divididas em conjunto calibração (70%) e previsão (30%) pelo algoritmo Kennard-Stone (Kennard & Stone, 1969). Após a divisão, os espectros de fluorescência foram pré-tratados com normalização, variação normal padrão e autoescalamento (Barnes et al., 1989; Rinnan et al., 2009).

Os modelos UPLS foram construídos no software Matlab® versão 2013a usando *scripts* caseiros. Os modelos foram avaliados pela raiz quadrada do erro médio de calibração (RMSEC) e previsão (RMSEP) que estão disponíveis nas equações 2 e 3, onde a_i é o valor de referência das propriedades, b_i é o valor estimado pelo modelo, c_i é o valor médio de referência das propriedades, LV é o número de variáveis latentes usadas no modelo, n_{cal} é o número de amostras presentes no conjunto de calibração e n_{pred} é o número de amostras disponíveis no conjunto de previsão. Devido ao uso do logaritmo, os valores dos erros RMSEC e RMSEP reportados são adimensionais. Os coeficientes de determinação (R^2) também foram calculados para verificar o ajuste linear das amostras de calibração (R^2_c) e previsão (R^2_p) (equação 4) (Allegrini & Olivieri, 2016; Olivieri, 2014).

$$RMSEC = \sqrt{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (a_i - b_i)^2 / n_{cal} - LV - 1} \quad \text{equação (2)}$$

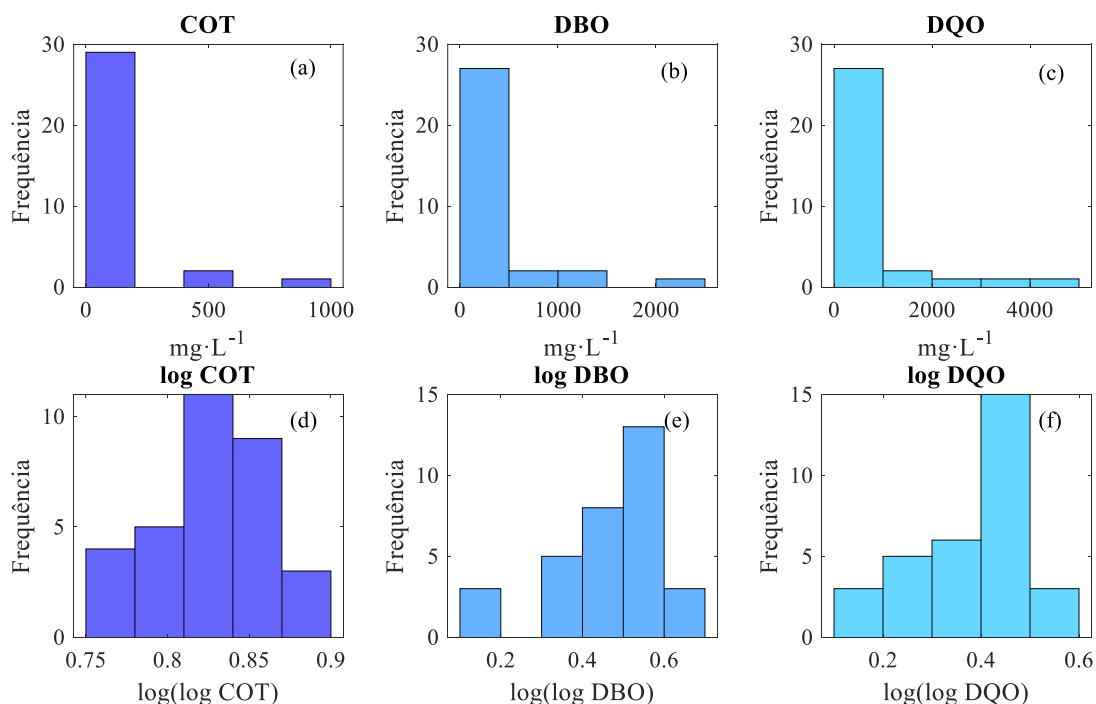
$$RMSEP = \sqrt{\sum_{i=1}^{n_{pred}} (a_i - b_i)^2 / n_{pred}} \quad \text{equação (3)}$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1} (a_i - b_i)^2}{\sum_{i=1} (a_i - c_i)^2} \quad \text{equação (4)}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os resultados obtidos experimentalmente para COT, DBO e DQO, respectivamente. A maioria das amostras nos três casos se concentram no início da faixa de distribuição das propriedades nos histogramas. A maior parte das amostras possui valores de COT até 200,0 mg·L⁻¹, com poucas amostras excedendo este limite. A faixa de resultados para COT foi de 6,96 a 867,2 mg·L⁻¹. No caso da DBO, a faixa de distribuição foi de 2,00 a 2.060 mg·L⁻¹, com média em 282,9 mg·L⁻¹. Os resultados de DQO foram similares aos de DBO, com distribuição entre 22,0 e 4.350 mg·L⁻¹ e valor médio de 646,6 mg·L⁻¹.

Figura 1. Gráficos de distribuição dos valores originais e valores transformados por logaritmo de COT, DBO e DQO.



Fonte: Os autores, 2024.

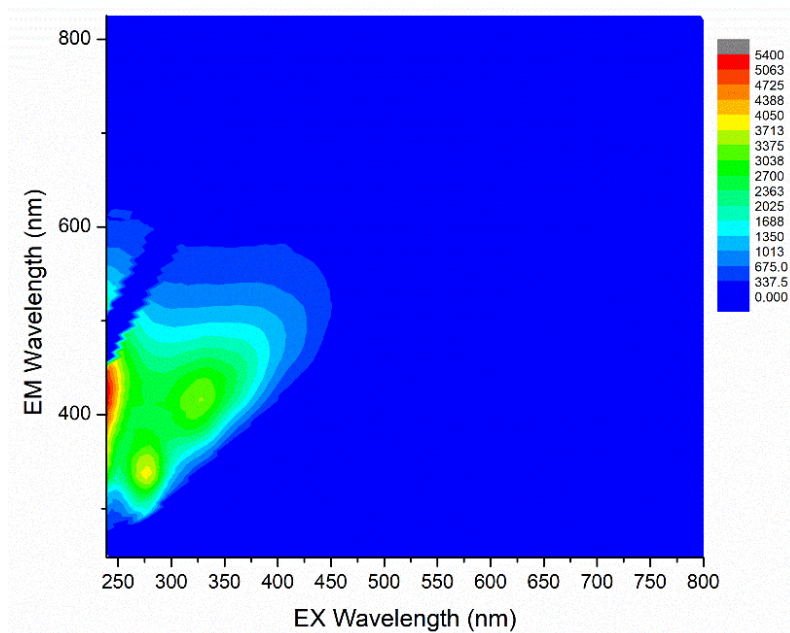
Devido ao fato de que a DBO mensura apenas a fração de matéria orgânica biodegradável e a DQO consegue quantificar a porção não-biodegradável, os resultados de DQO geralmente são maiores do que os de DBO. A reação química envolvida para oxidar a matéria orgânica não-biodegradável permite a quantificação de muitos compostos

que não são percebidos na análise da DBO. Em contraste, os valores de COT representam toda a fonte de carbono orgânico disponível nas amostras. O método de análise de COT é por combustão completa, na qual, a matéria orgânica é convertida em dióxido de carbono, cuja carbonila é detectada por infravermelho.

Ao aplicar o tratamento com logaritmo, os valores de todas as propriedades se assemelham a uma distribuição normal. Isso pode contribuir na melhoria dos modelos de regressão, uma vez que a transformação logarítmica pode ajudar a linearizar as relações entre as variáveis independentes (espectros) e dependentes (propriedades), tornando-as mais adequadas para modelos lineares.

A Figura 2 apresenta o espectro de fluorescência EEM de uma amostra de efluente bruto. Nela, destacam-se as regiões entre 250 e 500 nm para excitação e 250 e 400 nm para emissão. A intensidade máxima dos sinais de fluorescência vai até 5400 (u.a), com algumas regiões atingindo 4050 (u.a) e grande parte da emissão em até 3713 (u.a).

Figura 2. Espectro de fluorescência EEM de uma amostra de efluente.



Fonte: Os autores, 2024.

Amostras de efluentes podem conter uma série de fluoróforos, que são substâncias capazes de emitir fluorescência. Esses fluoróforos podem ser originários de diferentes fontes, como matéria orgânica natural, poluentes industriais, produtos domésticos e produtos de degradação biológica (Khan et al., 2022; Mesquita et al., 2017). Dentre eles, destacam-se os ácidos húmicos com excitação em 237-400 nm e emissão em 260-500 nm, e aminoácidos como o triptofano e tirosina, que fluorescem na faixa de excitação entre 225-275 nm e emissão entre 340-381 nm e na faixa de excitação entre 300-460 nm e emissão entre 340-480 nm, respectivamente (Khan et al., 2022; Mesquita et al., 2017).

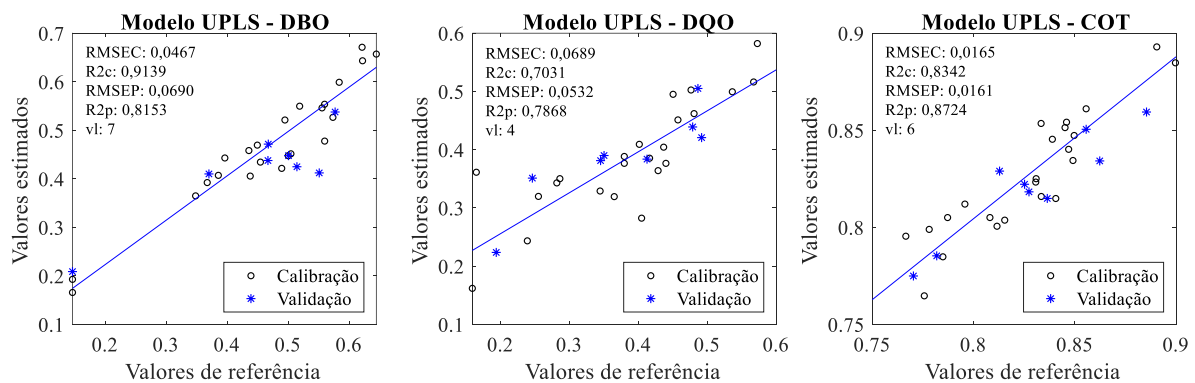
A carga de matéria orgânica num efluente bruto geralmente é superior que um efluente tratado. Porém, a espectroscopia de fluorescência EEM possui sensibilidade suficiente para capturar informações dos fluoróforos em concentrações da ordem de picomol (Saha & Yakovlev, 2009). Contudo, extrair informação química de um espectro pode ser uma tarefa complicada, o que demanda a utilização da quimiometria (Dai et al., 2022).

No caso da fluorescência EEM, cada espectro pode ser desdobrado e transformado em vetor amostral com a finalidade de compor uma matriz de amostras (Morais & Lima, 2017). Assim, a correlação das informações espectrais com as concentrações das propriedades de interesse como a DBO, DQO e COT podem ser facilitadas com os modelos de regressão (Dai et al., 2022).

Christian et al. (2017) usaram a espectroscopia de fluorescência para determinar DBO, DQO e COT em efluentes. Todas as propriedades apresentaram coeficientes de correlação r acima de 0,9. Neste estudo, os autores selecionaram alguns picos e correlacionaram às concentrações. Contudo, a escolha das regiões mais importantes pode ignorar partes dos espectros com sinais de substâncias que contribuam ainda que pouco para a correlação. A modelagem via PLS permite o tratamento de todas as variáveis que possam estar relacionadas à DBO, DQO e/ou COT, evitando assim, a perda de informação útil.

Os modelos desenvolvidos para estimar DBO, DQO e COT estão apresentados na Figura 3. Para DBO, o modelo UPLS apresentou um RMSEC igual a 0,047 e um RMSEP igual a 0,069. Os valores de R^2_c e R^2_p foram 0,914 e 0,815, respectivamente, indicando elevada capacidade preditiva. Já para DQO, o modelo mostrou um RMSEC de 0,0689 e um RMSEP de 0,0532. Os valores de R^2_c e R^2_p foram de 0,703 e 0,787, respectivamente, sugerindo uma capacidade razoável de previsão, embora menor em comparação com a DBO.

Figura 3. Modelos UPLS de DBO, DQO e COT.



Fonte: Os autores, 2024.

No caso do COT, o RMSEC foi de 0,0165 e RMSEP foi de 0,0161, indicando uma boa capacidade de previsão. Os coeficientes R^2_c e R^2_p foram de 0,834 e 0,872, respectivamente, sugerindo que o modelo é capaz de capturar a variação do COT na água. Todas as três propriedades apresentaram elevado comportamento linear.

Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R^2 , mais linearmente ajustadas são as amostras. No caso dos conjuntos de testes, que indicam a aplicação dos modelos em um subconjunto externo às amostras de calibração, os resultados de R^2_p foram em ordem crescente para os modelos de DQO, DBO e COT. Esse ajuste indica que todas as três propriedades são possíveis de serem modeladas por técnicas lineares como o PLS. Vale ressaltar que a obtenção de um modelo PLS capaz de ser usado como alternativa para prever DBO, DQO e COT via espectroscopia de fluorescência precisa de R^2_p cada vez mais próximos de 1,0 e possuir uma quantidade de amostras suficientemente representativas para a realidade onde o modelo será aplicado.

Uma vez que a variação dos valores das propriedades é elevada e a maioria dos valores se concentra numa parte desta distribuição, é necessário tanto o tratamento com logaritmo, quanto o aumento do número de amostras. Um aumento significativo no conjunto de dados poderia melhorar a representatividade e aumentar a linearidade dos modelos.

CONCLUSÕES

Os modelos UPLS apresentaram alta correlação linear entre os dados físico-químicos e os espectrais para as três propriedades analisadas. A aplicação de logaritmo permite a correção dos valores físico-químicos e melhora na distribuição deles. Todas as três propriedades podem ser estimadas via espectros de fluorescência EEM.

A aplicação de quimiometria com a fluorescência EEM representa um avanço significativo no campo da análise de água, oferecendo uma alternativa viável e altamente eficaz aos métodos tradicionais. Os modelos PLS podem ser implementados como alternativa para prever os valores de DBO, DQO e COT em amostras de efluentes a partir dos espectros EEM sem a necessidade da análise padrão dessas propriedades.

Essa abordagem promete não apenas simplificar e acelerar os processos de análise, mas também melhorar a precisão e a confiabilidade dos resultados, contribuindo assim para a gestão sustentável dos recursos hídricos e a preservação do meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEGRINI, F., OLIVIERI, A.C. *Multi-way figures of merit in the presence of heteroscedastic and correlated instrumental noise: Unfolded partial least-squares with residual multi-linearization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.158, p. 200–209, 2016.
2. ASTM International. *ASTM D8431-22 - Standard Test Method for Detection of Water-soluble Petroleum Oils by A-TEEM Optical Spectroscopy and Multivariate Analysis*. 2022.
3. BAHRAM, M., BRO, R., STEDMON, C., & AFKHAMI, A. *Handling of Rayleigh and Raman scatter for PARAFAC modeling of fluorescence data using interpolation. Journal of Chemometrics*, 20(3–4), 99–105. 2006.
4. BARNES, R.J., DHANOA, M.S., & LISTER, S.J. *Standard Normal Variate Transformation and Detrending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. Applied Spectroscopy*, 43(5), 772–777. 1989.
5. CHEN, L., KOW, C., AFIRA, N.A., MOK, E., TENG, S., GILMORE, A.M. *Use of simultaneous absorbance-transmittance and excitation-emission matrix (A-TEEM) spectroscopy to monitor source water contamination for waterworks. Aqua Water Infrastructure, Ecosystems and Society*, v.71, n.1, p. 62–71, 2022.
6. CHRISTIAN, E., BATISTA, J. R., GERRITY, D. *Use of COD, TOC, and Fluorescence Spectroscopy to Estimate BOD in Wastewater. Water Environment Research*, v.89, n.2, p. 168–177, 2017.
7. DAI, Y., WANG, H., WANG, J., WANG, X., WANG, Z., GE, X. *Prediction of water quality based on SVR by fluorescence excitation-emission matrix and UV–Vis absorption spectrum. Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v.273, 121059, 2022.
8. DIAS, J.C.M., AGUIAR, P.F. *A Statistical Method for Acceptance of Crude Oil Viscosity-Temperature Curves. Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, v.5, n.1, p. 019–024, 2011.
9. FINDLAY, S.E.G., SINSABAUGH, R.L. *Aquatic Ecosystems: Interactivity of Dissolved Organic Matter*. 1st ed. Academic Press, 2003.
10. KENNARD, R.W., & STONE, L.A. *Computer Aided Design of Experiments. Technometric*, 11(1), 137–148. 1969.
11. KHAN, M.F.S., AKBAR, M., WU, J., XU, Z. *A review on fluorescence spectroscopic analysis of water and wastewater. Methods and Applications in Fluorescence*, v.10, n.1, 2022.
12. LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy. Springer*. 2006.

13. LEENHEER, J. A., CROUÉ, JP. *Characterizing aquatic dissolved organic matter. Environmental Science and Technology*, v.37, n.1, 2003.
14. LIPPS, W.C., BRAUN-HOWLAND, E.B., & BAXTER, T.E. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (24th ed.). APHA, AWWA, WEF. 2023.
15. MARHABA, T.F., VAN, D., LIPPINCOTT, R. L. *Rapid identification of dissolved organic matter fractions in water by spectral fluorescent signatures. Water Research*, v.34, n.14, p. 3543–3550, 2000.
16. MESQUITA, D.P., QUINTELAS, C., AMARAL, A.L., FERREIRA, E.C. *Monitoring biological wastewater treatment processes: recent advances in spectroscopy applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.16, n.3, p. 395–424, 2017.
17. MORAIS, C.L.M., LIMA, K.M.G. *Comparing unfolded and two-dimensional discriminant analysis and support vector machines for classification of EEM data. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.170, p. 1–12, 2017.
18. MOSTOFA, K.M.G., LIU, C.Q, VIONE, D., MOTTALLEB, M.A., OGAWA, H., TAREQ, S.M., YOSHIOKA, T. *Colored and Chromophoric Dissolved Organic Matter in Natural Waters. Environmental Science and Engineering*, January, 2013.
19. OLIVIERI, A. C. *Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. Chemical Reviews*, v.114, n.10, p. 5358–5378, 2014.
20. OLIVIERI, AC., ESCANDAR, G.M., GOICOECHEA, H.C., & DE LA PEÑA, A.M. *Unfolded and Multiway Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Fundamentals. Data Handling in Science and Technology*, 29, 365–397. 2015.
21. PARRON, L.M., MUNIZ, D.H. de F., PEREIRA, C.M. *Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. EMBRAPA - Documento 232, 69, 2011. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/921050/1/Doc232ultimaversao.pdf>>. Acesso em: 11/11/2021.*
22. RINNAN, Å., BERG, F. van den, & ENGELSEN, S.B. *Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201–1222. 2009.
23. SAHA, A., YAKOVLEV, V.V. *Detection of picomolar concentrations of lead in water using albumin-based fluorescence sensor. Applied Physics Letters*, v.95, n.14, p. 10–12, 2009.