

II-447 - VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS EM EFLUENTES DE BIORREATORES ANAERÓBIOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA

Roberta Milena Moura Rodrigues⁽¹⁾

Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UEPB.

Beatriz Susana Ovruski de Ceballos⁽²⁾

Orientadora / Professora do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UEPB.

Wilton Silva Lopes⁽³⁾

Orientador / Professor do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, UEPB.

Endereço⁽¹⁾: Rua Pedro de Azevedo Cruz, 27A – Centro – Serra Redonda – PB – CEP: 58385-000 – Brasil – Tel: (83) 98717 – 4209 – Email: robertamilena_rm@hotmail.com

RESUMO

Processos biológicos secundários empregados para o tratamento de águas residuais têm se desenvolvido de forma acelerada a partir da metade do século XX e são atualmente utilizados na maioria das Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) ao redor do mundo. O lodo é o principal subproduto do tratamento biológico das águas residuais (1% a 2% do volume total do esgoto tratado); este é um material semissólido e pastoso constituído por água (98%), sólidos orgânicos e inorgânicos e abundantes microrganismos, muitos deles patogênicos. Essas características junto com alguns metais, substâncias tóxicas, xenobióticas, e recalcitrantes tornam os lodos brutos resíduos perigosos e um problema de saúde pública e ambiental se descartados no ambiente sem tratamento prévio. Entretanto, esses lodos são fontes valiosas de macronutrientes para a agricultura e empreendimentos florestais (nitrogênio, fósforo), entre outros usos e que podem ser recuperados desse resíduo, assim como os metais. Ainda, são muito valorizados como fonte de energia devido à possibilidade de produzir biogás (55 a 70% de metano) através da biodegradação anaeróbia microbiana de seus componentes orgânicos (fermentação metanogênica) sob condições controladas de pH, temperatura e substratos. Para uma recuperação eficiente da energia deve-se estimular, na fase acidogênica da fermentação, a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) de baixo peso molecular, a partir das macromoléculas orgânicas hidrolisadas previamente por bactérias hidrolíticas específicas e presentes naturalmente nos esgotos. Os AGVs são os principais intermediários das etapas seguintes (acetogênese e a metanogênese) da digestão anaeróbia e sua taxa de produção determina a taxa de produção de metano. A identificação de formação de AGVs e sua quantificação indicam o andamento do processo. A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) vem se destacando na determinação dos ácidos graxos voláteis, pela sua acurácia e sensibilidade, juntamente com a validação adequada do método, o que garante a qualidade dos resultados obtidos e a confiabilidade do método.

PALAVRAS CHAVE: Ácidos graxos voláteis, digestão anaeróbia, cromatografia gasosa, validação de método.

INTRODUÇÃO

Os processos biológicos secundários empregados para o tratamento de águas residuais têm se desenvolvido de forma acelerada a partir da metade do século XX e são atualmente utilizados na maioria das Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) ao redor do mundo.

Durante o tratamento dos esgotos são produzidos lodos que se decantam no tanque de sedimentação primário por deposição por gravidade das partículas solidas, já nos reatores biológicos de tratamento secundários a produção de lodos é mais abundante principalmente se o processo for aeróbio, e se depositam no decantador secundário; também são gerados no tratamento terciário (METCALF, EDDY, 2003)-

Alem Sobrinho (2001), cita que a produção de esgoto doméstico no Brasil varia entre 80 a 200 litros/hab.dia e cada habitante produziria cerca de 150 g/dia de lodo centrifugado, totalizando uma produção média em torno de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca por ano. Para Andreoli et al (2001), no Brasil, aumentos na coleta

dos esgoto realmente gerados poderiam incrementar em até 4 vezes a produção de lodos. Cálculos de Soares (2004), que consideraram o tratamento de somente 30% dos esgotos urbanos produzidos, mostraram uma geração de lodos superior a 400.000 mil toneladas/ano. O lodo das estações de tratamento de esgoto doméstico é um material pastoso, semi-sólido rico em água (até 98%) e com teor de sólidos na ordem de 1 a 2 e até de 5%, sendo estes principalmente orgânicos de composição complexa e putrescível (proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outros), possui também fosfatos, nitratos, nitritos e diversas formas de enxofre, além de ferro, magnésio, cálcio, entre outros componentes (MIKI et al, 2006). A matéria orgânica constitui de 59 a 88% dos sólidos totais sendo aproximadamente 50 a 55% de carbono, 25 a 30% de oxigênio, 10 a 15% de nitrogênio, 6 a 10% de hidrogênio, 1 a 3% de fósforo e 0,5 a 1,5% de enxofre (TIAGY; LO, 2013). Contém ainda detergentes e algumas substâncias de difícil degradação como compostos fenólicos, usados de intermediários ou aditivos na produção dos detergentes e emulsificantes, entre outras muitas e diversas moléculas (CORVINI et al, 2006), microrganismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, helmintos e fungos) e até metais pesados como cádmio, cobre, cromo, chumbo, níquel, manganês, mercúrio e zinco embora em baixas concentrações (CHAGAS, 2000). Os microrganismos patogênicos e as substâncias xenobióticas e recalcitrantes tornam os lodos brutos dos esgotos, resíduos perigosos e um problema de saúde pública e ambiental quando descarregados no solo e na água sem tratamento prévio, por veicularem doenças infecciosas e afetarem a qualidade das águas e dos solos alterando a microbiota e em consequência as cadeias e as teias alimentares (JONSSON, MAIA, 2007).

O lodo é o principal subproduto do tratamento das águas residuais e deve ser tratado para decidir seu destino adequado, sem causar impactos à saúde pública e ao meio ambiente. Sua disposição sanitária e/ou a sua utilização na agricultura e em empreendimentos florestais é um dos mais importantes problemas associados ao projeto e ao gerenciamento das estações de tratamento de esgotos; problema que aumenta com o crescimento populacional e a consequente maior produção de esgotos e de lodos das ETEs, na medida que as redes de coleta de águas residuais são ampliadas e novas estações de tratamento de esgoto são construídas e entram em funcionamento. A correta gestão do lodo é questão relevante de saúde pública, ambiental e sanitária que as empresas de saneamento devem enfrentar e respeitar as disposições da legislação ambiental: a Lei No 12.305/2010 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos no Brasil assim como Resolução CONAMA Nº 430 do 13/05/2011, que complementa e altera a Resolução nº 357/2005 e dispõe sobre as condições adequadas para o descarte de efluentes finais de ETEs.

Lettinga et al (2000), enfatizam que muitos dos resíduos produzidos pelas sociedades humanas podem ser materiais úteis para a recuperação e reusar subprodutos como nutrientes, metais, a água que os compõem e a energia contida na matéria orgânica não totalmente degradada, e para atingir esses objetivos de proteção ambiental e conservação dos recursos, diversas técnicas já estão disponíveis. Efetivamente, os lodos dos esgotos são fontes valiosas de macronutrientes para a agricultura e reflorestamento, como nitrogênio, fósforo, enxofre e cálcio entre outros, que podem ser recuperados assim como os metais pesados ali contidos. Os lodos são muito valorizados como fonte de energia, devido à possibilidade de recuperar a energia dos resíduos orgânicos através da biodegradação microbiana com produção de biogás, em especial metano. Este é liberado na fermentação metanogênica sob condições controladas de pH, temperatura e substratos apropriados e portanto, para a recuperação da energia na forma de biogás deve-se preferir, na etapa de estabilização, a digestão anaeróbia (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994).

Com essa abordagem e aplicando-se tratamento anaeróbio, o lodo transforma-se de um resíduo problema em um produto com valor econômico que com tecnologias modernas e de baixo custo pode ser bem mais valorizado pelo reaproveitamento dos materiais nele contidos (nutrientes e metais pesados) e pelo seu potencial energético (gás metano). Dentre as diversas tecnologias disponíveis, a digestão anaeróbia convencional (DA) é uma excelente opção para o tratamento do lodo derivado do esgoto sanitário. Durante o processo são reduzidas as concentrações dos microrganismos patogênicos e estes podem até serem eliminados, se estabiliza total ou parcialmente as substâncias orgânicas putrescíveis presentes no lodo fresco, se reduz o volume do lodo através de liquefação, gaseificação e adensamento pela diminuição de seu conteúdo em água. A digestão anaeróbia ou fermentação permite também dotar o lodo de características favoráveis para seu uso em solos e outras finalidades após estabilizado e recuperados os metais pesados e a energia.

Os processos da digestão anaeróbia são geralmente explicados como a sequência de quatro fases bioquímicas correspondentes aos metabolismos dos grupos microbianos envolvidos e predominantes em cada uma delas e denominadas fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (VAN HAANDEL; LETTINGA,

1994; CHERNICHARO, 1997). Em cada uma dessas fases microrganismos específicos metabolizam os substratos orgânicos, seja nos lodos, nos esgotos ou de qualquer ambiente com material orgânico putrescível passível de biodegradação ou estabilização por microrganismos heterótrofos fermentativos. Na digestão anaeróbia com metanogêneses, esses grupos de bactérias e arqueias agem sucessivamente e sintroficamente e são denominadas, respectivamente, bactérias hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e arqueias metanogênicas (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994; MADIGAN, et al, 2016). Na fase acidogênica são produzidos, a partir das macromoléculas orgânicas hidrolisadas na fase anterior, ácidos graxos voláteis (AGVs) de baixo peso molecular que são os principais intermediários das etapas seguintes da digestão anaeróbia fermentativa dos compostos orgânicos dos lodos e dos esgotos e portanto da produção de biogás. Sua taxa de produção determina a taxa de produção de metano (CHERNICHARO, 1997; SAWYER; MCCARTHY, 1978). Mudanças ambientais e/ou operacionais podem causar o desequilíbrio da taxa de produção e consumo dos AGVs, por isso, o monitoramento da sua concentração é fundamental para evitar problemas operacionais; o acúmulo desses ácidos pode ter um efeito negativo sobre a digestão anaeróbia, se a capacidade de tamponação for extrapolada e o pH descer para níveis desfavoráveis, por sua vez, uma taxa baixa de formação também freia o resto do processo pela falta de substratos para as bactérias das etapas subsequentes (CHERNICHARO, 1997; LEITÃO et al, 2006).

Diversos métodos foram desenvolvidos para a determinação de ácidos graxos voláteis, dentre eles destaca-se a cromatografia gasosa utilizando como detector um espectrômetro de massas, que oferecem alta eficiência na detecção de baixas concentrações. A validação adequada da metodologia assegura a qualidade metrológica dos ensaios e a confiabilidade técnica dos resultados obtidos.

OBJETIVO

Validar o método de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas para a determinação de ácidos graxos voláteis, considerando que esses compostos, produzidos na digestão anaeróbia da matéria orgânica são intermediários e precursores essenciais da metanogênese, processo que permite recuperar parte importante da energia contida nos resíduos orgânicos na forma de biogás.

METODOLOGIA

LOCAL DAS ANÁLISES

A pesquisa foi realizada no laboratório de Química Sanitária e Ambiental (LAQUISA), da Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgoto Sanitário (EXTRABES), situada na cidade de Campina Grande/PB (07° 14' 22" S e 35° 53' 05" W), em área pertencente à Companhia de Água e Esgoto de Campina Grande – CAGEPA, cedida em sistema de comodato à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

ESCOLHA DOS REAGENTES E PADRÕES

Os ácidos graxos voláteis escolhidos foram ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico. Para preparação dos analitos padrões foram escolhidos ácidos P.A. da marca Sigma Aldrich que são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Pureza, molaridade e concentração comum dos ácidos graxos voláteis (AGVs)

Ácidos (Sigma Aldrich)	Pureza (%)	Molaridade (mol/L)	Concentração Comum (g/L)
Ácido Acético	99,7	17, 43	1046, 85
Ácido Propiônico	99,0	13, 23	980, 10
Ácido Isobutírico	99,5	10, 95	965, 15
Ácido Butírico	99,0	10, 78	950, 40
Ácido Isovalérico	99,0	8, 97	915, 75
Ácido Valérico	99,0	9, 01	920, 70

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÕES DE ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS (AGVs)

No preparo das soluções foram utilizados água Milli Q (para as soluções estoque de 500 mg.L⁻¹) e metanol P.A. (para as diluições). Preparou-se uma solução estoque de 500 mg.L⁻¹ para cada ácido graxo volátil (ácido acético, ácido propiônico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico e ácido valérico) e uma solução estoque de 500 mg.L⁻¹ da mistura dos seis ácidos, a seguir se realizaram diluições das soluções padrões de cada ácido, até atingirem as concentrações de 0,5 mg.L⁻¹, 1 mg.L⁻¹, 2,5 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹, as soluções padrões individuais de cada ácido foram injetadas sequencialmente no cromatógrafo gasoso para obter o cromatograma desses padrões que permitem encontrar as melhores condições para a elaboração do método e para a determinação dos tempos de retenção de cada um desses compostos. Em seguida foram preparadas diluições a partir da solução estoque de 500 mg.L⁻¹ composta pela mistura dos seis ácidos para montar a faixa de trabalho a ser utilizada. As concentrações da faixa de trabalho foram: 0,5mg.L⁻¹, 0,7 mg.L⁻¹, 1mg.L⁻¹, 1,5 mg.L⁻¹, 2 mg.L⁻¹, 2,5 mg.L⁻¹, 3mg.L⁻¹, 4mg.L⁻¹ e 5mg.L⁻¹. Posteriormente cada concentração que contém a mistura dos seis ácidos foi injetada seis vezes no cromatógrafo para analisar a separação dos picos do cromatograma para cada um dos AGVs, os tempos de retenção de cada um, montar a curva de calibração e iniciar a validação do método.

CROMATOGRAFIA GASOSA / ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O cromatógrafo gasoso utilizado é da marca Thermo Scientific (TRACE 1300) e o detector é um espectrômetro de massas Thermo Scientific (ISQ QD – Single Quadrupole). As condições cromatográficas foram estabelecidas com base em dados da literatura e injeções testes para obter as melhores condições cromatográficas, visando maior sensibilidade na identificação dos AGVs selecionados. A coluna utilizada no cromatógrafo gasoso é SPB – 624 Capillary GC column, com fase estacionária (6% cianopropilfenil, 94% dimetilpolisiloxano) que possui polaridade intermediária. Foram estabelecidas as seguintes variáveis: tamanho da coluna cromatográfica (30 m x 0,25 mm), espessura do filme (1,4 µm), volume de injeção de 1µl, temperatura do injetor (170°C), modo de injeção (splitless), velocidade linear do gás de arraste (gás Hélio – 1mL.min⁻¹), temperatura da interface (250°C), temperatura da fonte de ionização (impacto de elétrons) do espectrômetro de massa (230°C), tempo de corte do solvente (4 minutos). Foram testadas algumas rampas de temperatura do forno e as melhores condições encontradas foram de 35°C, com tempo de espera de 1 minuto, seguido de aumentos de temperatura na taxa de 20°C.min⁻¹ até 100°C com tempo de espera também de 1 minuto e continuando com taxa de 50°C.min⁻¹ até atingir 200°C com tempo de espera de 3 minutos. Após escolhida a melhor condição cromatográfica para realização das injeções se procedeu à validação do método. As figuras a seguir mostram as condições utilizadas para elaboração do método cromatográfico e do seu detector, o espectrômetro de massas.

VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A validação da metodologia de análise de AGVs foi realizada utilizando critérios conforme Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003 e documento INMETRO DOQCGCRE-008, de 2016.

Para a validação do um método analítico é fundamental o perfeito controle da qualidade dos reagentes a serem usados: fornecedor, marca, qualidade (grau de pureza) da água ou do diluente a ser usado, entre outros. Destaca-se que os reagentes devem ser grau P.A. (Para Análises) e as soluções preparadas com água deionizada ultrapura. A seguir, deve haver controle acurado da exatidão das concentrações dos reagentes, devem-se conhecer os equipamentos a serem utilizados e seu funcionamento, os pontos críticos do aparato e da técnica, e as temperaturas envolvidas no processo que devem ser controladas ao longo de toda a operação. Ainda, para a avaliação correta e segura dos critérios estabelecidos pela ANVISA e INMETRO, foram empregadas soluções com diferentes concentrações, em ordem crescente, e as análises para cada uma dessas concentrações foram feitas no mínimo com cinco repetições. Sem esses cuidados cada um dos critérios de validação (linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão) não seria corretamente estabelecido.

Linearidade: Foram utilizadas soluções padrões nas concentrações escolhidas para a faixa de trabalho, foi feita a análise de regressão por mínimos quadrados e a correlação linear foi obtida por meio do R². Foram

elaborados os gráficos de resíduos para cada ácido e realizado o test F (F-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão.

Limite de detecção e quantificação: Foi preparada uma solução estoque a partir dos seis ácidos puros e a seguir se procedeu a diluir essa solução até se aproximar do suposto limite de quantificação. Após leitura de cada uma dessas diluições no cromatógrafo sob as condições previamente definidas, foram preparadas três curvas de calibração de cada ácido para obter seus coeficientes lineares e calcular o desvio padrão desses coeficientes, os valores dos desvios padrões obtidos divididos pelos coeficientes angulares das curvas de calibração de cada ácido, multiplicado por três é o limite de detecção e o mesmo valor multiplicado por dez é o limite de quantificação. O limite de detecção também foi calculado multiplicando por três o ruído da linha de base e neste caso o limite de quantificação foi aproximadamente 10 vezes maior que esse ruído.

Precisão: Foi obtida com base na repetitividade. Foram feitas cinco repetições de cada concentração de cada ácido, pelo mesmo analista e nas mesmas condições operacionais, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, concentrações baixa, média e alta. Após as repetições foram calculados os coeficientes de variação de cada ácido para as três concentrações utilizadas.

RESULTADOS OBTIDOS

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

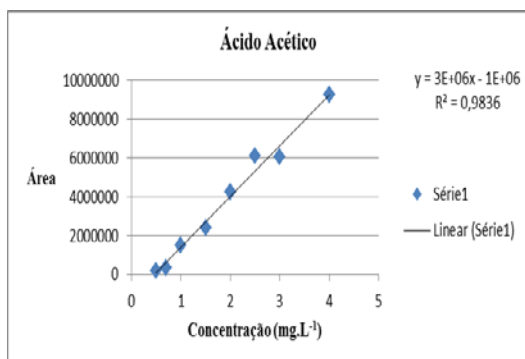


Figura 1: Curva de calibração do ácido acético.

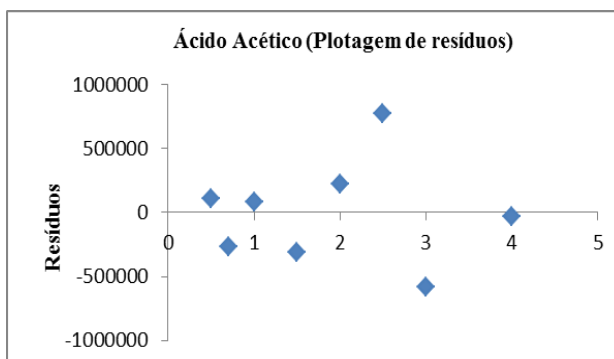


Figura 2: Gráfico de resíduos do ácido acético.

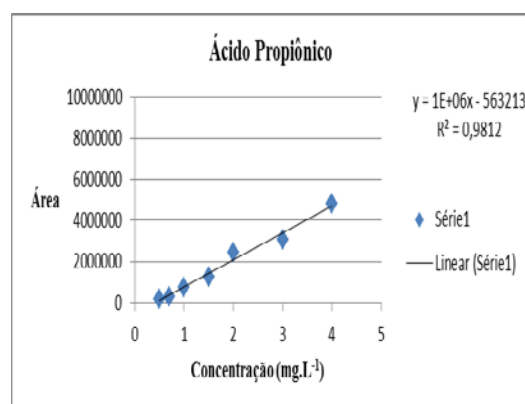


Figura 3: Curva de calibração do ácido propiônico.

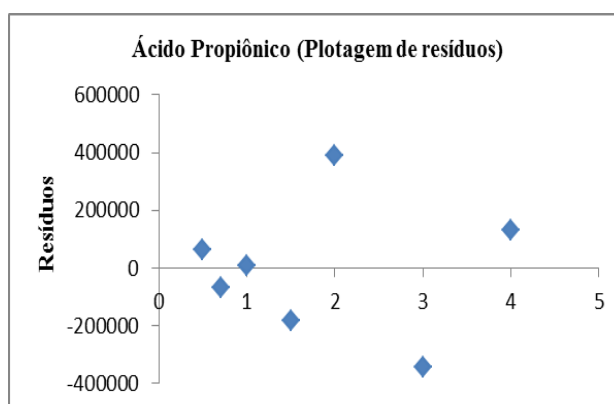


Figura 4: Gráfico de resíduos do ácido propiônico.

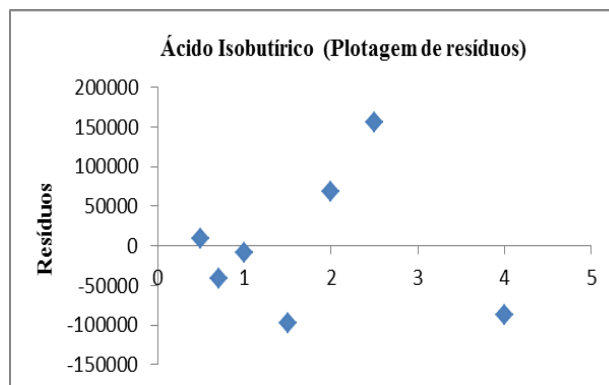
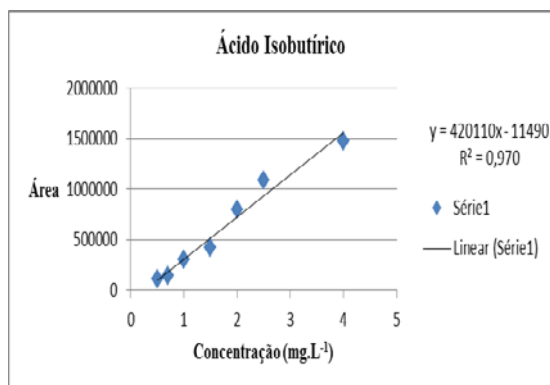


Figura 5: Curva de calibração do ácido isobutírico. Figura 6: Gráfico de resíduos do ácido isobutírico.

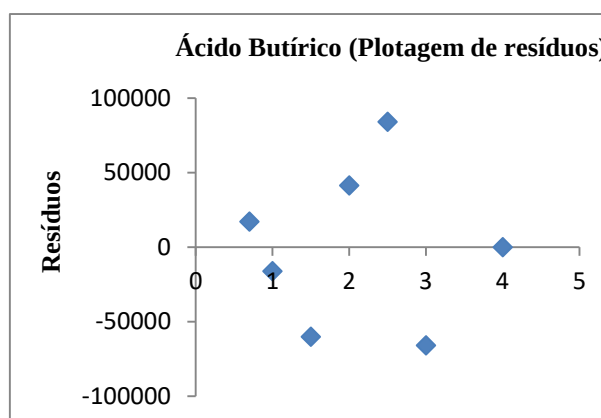
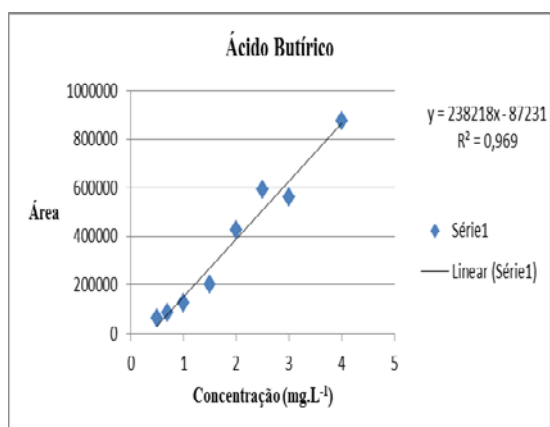


Figura 7: Curva de calibração do ácido butírico. Figura 8: Gráfico de resíduos do ácido butírico.

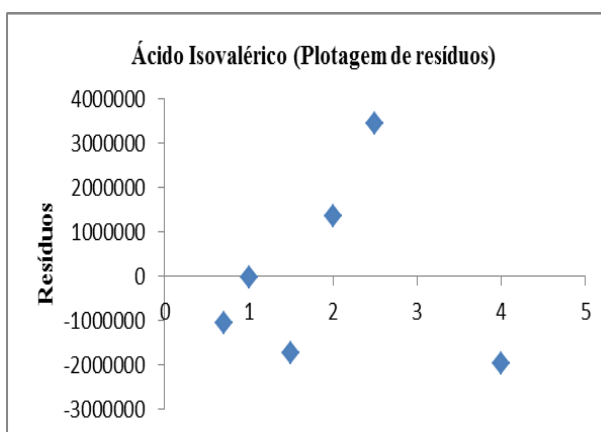
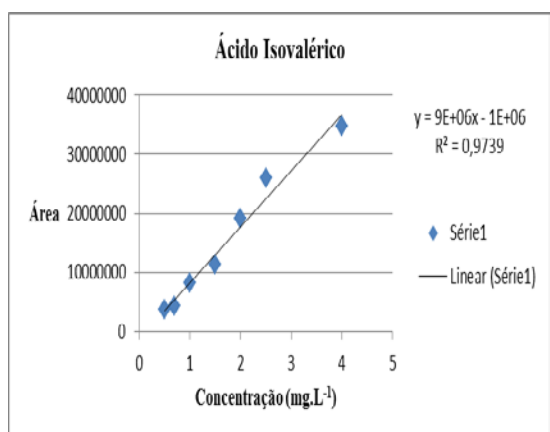


Figura 9: Curva de calibração do ácido isovalérico. Figura 10: Gráfico de resíduos do ácido isovalérico.

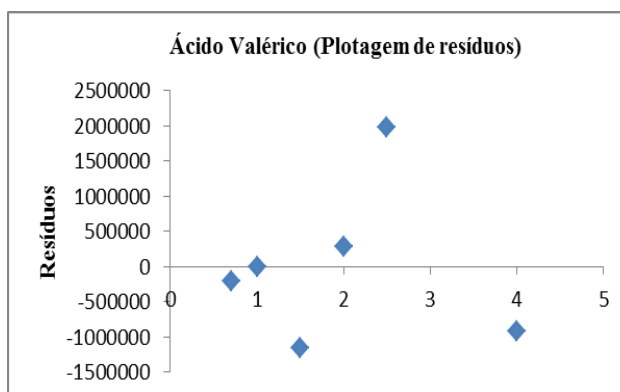
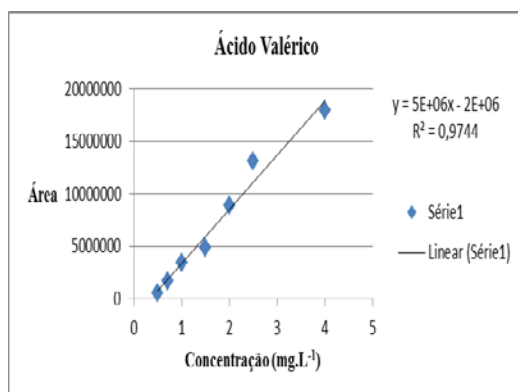


Figura 11: Curva de calibração do ácido valérico. Figura 12: Gráfico de resíduos do ácido valérico.

A faixa de trabalho utilizada, como foi já citado, foi de 0,5 mg.L⁻¹ a 5 mg.L⁻¹, porém as curvas apresentaram melhor linearidade até a concentração de 4 mg.L⁻¹.

PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

A seguir foram calculados os parâmetros de validação para CG-EM seguindo as recomendações ANVISA (2003) e INMETRO (2016) .

LINEARIDADE

Os coeficientes de correlação linear foram obtidos a partir da curva de calibração de cada ácido utilizando os coeficientes de determinação (R²). A tabela 2 mostra os resultados, onde se verifica forte correlação.

Tabela 2: Coeficientes de correlação linear dos ácidos graxos voláteis em estudo

Analito	Coeficiente de correlação linear (r)
Ácido acético	0,9917
Ácido propiônico	0,9905
Ácido isobutírico	0,9848
Ácido butírico	0,9843
Ácido isovalérico	0,9868
Ácido valérico	0,9871

ANVISA (2003) considera para o coeficiente de correlação-linear o valor igual a 0,99, observa-se que os valores obtidos no presente trabalho, para os ácidos acético e propiônico já correspondem a esse valor, os ácidos isovalérico e valérico se arredondarmos os valores também já correspondem a esse valor e o ácido butírico e isobutírico estão bem próximos ao valor estabelecido pela ANVISA.

De acordo com INMETRO (2016), para comprovar a linearidade deve-se mostrar o gráfico dos resíduos para garantir que eles sejam aleatórios e também avaliar a linearidade com aplicação do teste F (também conhecido como F-Snedecor) na análise da variância (ANOVA) da regressão. Como já mostrado anteriormente (figuras 2, 4, 6, 8, 10 e 12) os resíduos foram aleatórios comprovando que o modelo linear é adequado. A tabela 3 mostra os valores de F tabelado e de F calculado.

Tabela 3: Valores de F calculado e F tabelado para cada ácido.

Analito	F (calculado)	F (tabelado)
Ácido acético	359,24	5,99
Ácido propiônico	260,86	6,61
Ácido isobutírico	165,41	6,61
Ácido butírico	140,08	6,61
Ácido isovalérico	120,04	7,71
Ácido valérico	120,87	7,71

Como o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado, deve-se rejeitar a hipótese nula, que diz: o coeficiente angular é igual a zero e não há correlação linear significativa entre x e y, aceitando-se a hipótese alternativa que diz que o coeficiente angular é diferente de zero, demonstrando assim que há correlação linear significativa entre x e y.

LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

A tabela 4 apresenta os limites de detecção para cada ácido calculados de duas maneiras: a partir das curvas de calibração das diluições dos analitos (AGVs) aproximadas do suposto limite de quantificação (a) e utilizando o ruído da linha de base (considerando três vezes maior)(b).

Tabela 4: Limites de detecção calculados a partir das curvas de calibração (a) e utilizando o ruído da linha de base (b).

Analito	LD (a)	LD (b)
Ácido acético	0,086 mg.L ⁻¹	0,030 mg.L ⁻¹
Ácido propiônico	0,244 mg.L ⁻¹	0,100 mg.L ⁻¹
Ácido isobutírico	0,196 mg.L ⁻¹	0,100 mg.L ⁻¹
Ácido butírico	0,848 mg.L ⁻¹	0,500 mg.L ⁻¹
Ácido isovalérico	0,515 mg.L ⁻¹	0,500 mg.L ⁻¹
Ácido valérico	0,335 mg.L ⁻¹	0,500 mg.L ⁻¹

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A tabela 5 apresenta os limites de quantificação para cada ácido, também calculados de duas maneiras, a partir das curvas de calibração das diluições dos analitos (AGVs) aproximadas do suposto limite de quantificação (a); utilizando o ruído da linha de base (considerando dez vezes maior) (b).

Tabela 5: Limites de quantificação (a) calculados a partir das curvas de calibração e (b) utilizando o ruído da linha de base.

Analito	LQ	LQ
Ácido acético	0,289 mg.L ⁻¹	0,120 mg.L ⁻¹
Ácido propiônico	0,815 mg.L ⁻¹	0,400 mg.L ⁻¹
Ácido isobutírico	0,654 mg.L ⁻¹	0,400 mg.L ⁻¹
Ácido butírico	2,827 mg.L ⁻¹	2,000 mg.L ⁻¹
Ácido isovalérico	1,710 mg.L ⁻¹	2,000 mg.L ⁻¹
Ácido valérico	1,110 mg.L ⁻¹	2,000 mg.L ⁻¹

PRECISÃO

INMETRO (2016) utiliza os critérios de aceitação sugeridos pela AOAC (2012), que aceitam o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de 11% para concentrações superiores a de 0,1 mg.L⁻¹ até 1 mg.L⁻¹ e valores de 7,3% para concentrações maiores que 1 mg.L⁻¹ até 10 mg.L⁻¹. Também a mesma referencia utiliza as sugestões de Eurachem (2014) considerando a dificuldade de estimar um desvio padrão confiável a partir de poucas repetições, nesse caso é admissível que os valores calculados a partir de vários pequenos grupos de repetições possam ser agrupados para se obter estimativas com números suficientes de graus de liberdade. A tabela 6 mostra o valor médio dos desvios padrões relativos ou coeficientes de variação.

Tabela 6: Valores médios dos coeficientes de variação para cada ácido.

Amostras	Acético	Propiônico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico
Concentração 0,5 mg.L ⁻¹	9,7	16,3	14,2	13,8	5,5	13,9
Concentração 2 mg.L ⁻¹	5,9	6,8	5,8	10,1	8,5	12,3
Concentração 5 mg.L ⁻¹	4,6	3,8	3,8	5,1	7,4	4,7
MCV%*	6,7	8,9	7,9	9,7	7,1	10,3

*MCV= Valor Médio dos coeficientes de variação.

Os dados da tabela 6, segundo INMETRO (2016), mostram que os valores obtidos se levarmos a média dos coeficientes de variação em consideração, apenas os ácidos acético e isovalérico estão dentro do intervalo aceito que é até 7,3%, analisando as concentrações individuais o método foi mais preciso para a concentração de 5 mg.L⁻¹. ANVISA (2003), aceita o coeficiente de variação de até 5% para métodos analíticos, porém para matrizes biológicas, aceita o coeficiente de variação até 15%. Considerando a segunda opção, com exceção do ácido propiônico na concentração 0,5 mg.L⁻¹, todos os valores obtidos são aceitos por estarem inclusos no intervalo. Fica claro no método validado que o mesmo apresentou melhor precisão para a concentração mais alta, que foi 5 mg.L⁻¹.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

O trabalho obteve bons resultados, se enquadrando dentro dos critérios estabelecidos por INMETRO e ANVISA. A seguir, na tabela 7 se apresentam alguns valores dos parâmetros trabalhados referenciados na literatura.

Tabela 7: Resultados de artigos científicos citados na revisão de literatura utilizando os mesmos parâmetros que no presente trabalho

AUTORES	TRABALHOS	LINEARIDADE	LD/LQ	PRECISÃO
Mulat; Feilberg (2015)	Validaram método GC/MS, C/coluna de alta polaridade para determinar enriquecimento de isótopos de Carbono e concentração de AGVs não derivados por injeção de solução aquosa direta de amostras de digestor de biogás.	Coefficientes de correlação > 0,99	Valores baixos para LD: 0,240 a 0,617 mg.L ⁻¹ LQ: 0,853 a 1,93 mg.L ⁻¹	Coefficiente de variação < 6%
Raposo et al. (2015)	Validaram método de harmonização da determinação quantitativa de perfil de AGVs em amostras de matriz aquosa com técnicas de GC, detector (FID) e coluna de alta polaridade	Coefficientes de correlação ≥ 0,99	LD ≤ 3 mg.L ⁻¹ LQ = 10 mg.L ⁻¹	Coefficientes de variação ≤ 1,5%
Alves (2014)	Validação de método de identificação de AGVs em águas de sedimentos marinhos (SPME-GC-MS), com coluna cromatográfica de alta polaridade	Coefficientes de correlação > 0,99	LD: 0,387 a 0,884 mg.L ⁻¹ LQ: 1,168 a 2,677 mg.L ⁻¹	Coefficiente de variação: 4,8 e 7,7%

Os valores encontrados para os parâmetros de validação (linearidade, limite de detecção e limite de quantificação e precisão) foram próximos aos encontrados na literatura, mostrando a adequação do método para análise de ácidos graxos voláteis.

CONCLUSÕES

A validação do método foi fundamental para sua credibilidade, assegurando a confiança dos seus resultados, de acordo com ANVISA e INMETRO. O método de cromatografia gasosa, acoplada a um espectrômetro de massas (CG/EM) foi muito adequado para a determinação de ácidos graxos voláteis (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) e atendeu aos parâmetros de validação (linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão). Destaca-se que foi utilizada uma coluna comercial de polaridade média, com as vantagens de seu baixo custo e de não ser exclusiva para a detecção e quantificação de AGVs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF.
2. ALEM SOBRINHO, P. Tratamento de esgoto e produção de lodo. In: Biossólidos na agricultura. São Paulo: SABESP, 2001. p. 7 – 40
3. ALVES, S. I. C. Validação de um método analítico para a identificação de ácidos gordos voláteis em águas intersticiais de sedimentos marinhos por SPME-GC-MS. LISBOA, 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Química) – UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2014.
4. ANDREOLI, C. V., VON SPERLING, M., FERNANDES, F. Lodo de esgoto: Tratamento e disposição final. Rio de Janeiro: Editora ABES, 2001. 483 p.

5. BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. DOU nº 92 de 16 maio, 2011, pág. 89.
6. BRASIL. Lei nº 12.305 - Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Brasília - Distrito Federal, 2010.
7. CHAGAS, W.F. Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da ilha do governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 2000. 89 p.
8. CHERNICHARO, C.A.L. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias . Vol. 5 , Reatores Anaeróbios. Belo Horizonte: Segrac, 1997.
9. CORVINI, P.F.X.; SCHAFFER, A.; SCHIOSSER, D. Microbial biodegradation of nonylphenol and the alkyl phenols. App. Microbial Biotechnol. Germany, v 72, p. 223 – 243. Apr/Jun 2006.
10. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento orientativo DOQCGCRE-008. p. 35. 05 ago. 2016.
11. JONSSON, C.M.; MAIA, C.H.M. Avaliação da toxicidade do lodo de esgotos de duas estações de tratamento de esgotos para o invertebrado aquático *Daphnia similis*. Pesticida: r-ecotoxicol e Meio Ambiente, v17, página 1 – 8. Jan/Dez 2007.
12. LEITÃO, R.C.; VAN HAANDEL, A.C.; ZEEMAN G.; LETTINGA, G. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. Bioresource Technology, v 97 (2006). P. 1105–1118
13. LETTINGA, G., HULSHOFF POL, L.W.H., ZEEMAN, G. Biological Wastewater Treatment Part 1 Anaerobic Wastewater Treatment. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, p. 200. 2000.
14. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. Microbiologia de Brock. Artmed, 14 Ed. 960 p. 2016.
15. METCALF, L.; EDDY, H. P. Wastewater Engineering. Treatment and Reuse. McGraw Hill, 4^{ed}. 2003. 1927 p.
16. MIKI, M. K.; ALEM SOBRINHO, P.; VAN HAANDEL, A. C. Tratamento da fase sólida em estações de tratamento de esgotos – condicionamento, desaguamento mecanizado e secagem térmica do lodo. In: Biossólidos: Alternativas de Uso de Resíduos do Saneamento. Rio de Janeiro: ABES, 2006.
17. MULAT, D.G.; FEILBERG, A. GC/MS method for determining carbon isotope enrichment and concentration of underivatized short-chain fatty acids by direct aqueous solution injection of biogas digester samples. Talanta. 2015.
18. RAPOSO, F. et al. Harmonization of the quantitative determination of volatile fatty acids profile in aqueous matrix samples by direct injection using GC and HPLC techniques: Multi-laboratory validation study. Journal of Chromatography. Agosto, 2015.
19. SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L. Chemistry for Environmental Engineering. 3^{ed}. McGrawHill Book Company, 1978.
20. SOARES, M. R. (2004). Coeficiente de distribuição (kd) de metais pesados em solos do estado de São Paulo. 2004. 202p. Tese (Doutorado) -Universidade de São Paulo. São Paulo: 2004.
21. TYAGI, V. K.; LO, S-L. Sludge: A waste or renewable source for energy and resources recovery? Renewable and Sustainable Energy Reviews, n. 25, p. 708-728, 2013.
22. VAN HAANDEL, A. C., LETTINGA, G. Tratamento Anaeróbio de Esgotos: Um Manual para Regiões de Clima Quente, Eppgraf, Campina Grande, 240 p, 1994.