

**THIAGO RANZANI DA COSTA**

**Técnicas analíticas para autópsia de membranas de osmose reversa**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO  
2011

**THIAGO RANZANI DA COSTA**

**Técnicas analíticas para autópsia de membranas de osmose reversa**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. René Peter Schneider

Versão original

SÃO PAULO  
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Da Costa, Thiago Ranzani.

Técnicas analíticas para autópsia de membranas de osmose reversa  
/ Thiago Ranzani da Costa. -- São Paulo, 2011.

Orientador: René Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Biofouling de membranas filtrantes.

Versão do título para o inglês: Analytical techniques for the autopsy of reverse osmosis.

Descritores: 1. Osmose reversa 2. Autópsias de membranas  
I. Schneider, René Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
III. Título.

ICB/SBIB059/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):        Thiago Ranzani da Costa.

Título da Dissertação:        Técnicas analíticas para autópsia de membranas de osmose reversa.

Orientador(a):                René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**                 **Reprovado(a)**

Examinador(a):        Assinatura:.....  
Nome:.....  
Instituição: .....

Examinador(a):        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7428  
e-mail:

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP ICB N° 269/08, referente ao projeto intitulado: "*Análise das membranas de microfiltração e ultrafiltração em relação ao rendimento e à caracterização do biofouling formado através da permeação da água da raia da USP*" sob a responsabilidade de **Thiago Ranzani da Costa**, foi analisado na presente data pela CEFA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SÉRIES HUMANAS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de outubro de 2008.

PROF. DR. WOTLAN FAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEFA - ICB/USP

PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO  
Coordenador da CEPSh - ICB/USP

A minha família,

A minha mulher Ana Paula, minha filha Giovanna, meu pai Arnaldo, minha mãe Helouisa, meus irmãos Daniel e Andrea que pavimentaram e nortearam a estrada que percorri; acompanham a minha história e compreendem melhor que os outros o significado disso.

DEDICO

Aos meus avós paternos João (“in memorian”) e Aparecida, avós maternos Cleibe (“in memorian”) e Leida.

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A sociedade pelo investimento despendido.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB – USP) pela estrutura fornecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. René Peter Schneider pela oportunidade de trabalhar com um tema tão interessante.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas pela amizade e apoio técnico.

Aos colegas de laboratório Fernando Freitas de Oliveira, Leandro Jorge da Silva, Júlia Helena Ortiz, Luciana de Oliveira, Bianca de Miranda Peres, Diana Maria Chica Cardona, Georges Mikhael Nammoura Neto, Roberta Novaes, Paulo Henrique Mendes, André Bacetti e Maria do Carmo Zaza Daulisio pela grande amizade.

Aos docentes do programa de mestrado em Microbiologia do ICB-USP.

Aos discentes do programa de mestrado em Microbiologia do ICB-USP.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

da Costa, T. R. **Técnicas analíticas para autópsia de membranas de osmose reversa**. 2011. 61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Sistemas de membranas filtrantes, principalmente os de osmose reversa, estão sendo cada vez mais utilizados em diversos seguimentos de empresas (farmacêutica, tratamento de água, alimentícia e química), devido à diminuição do preço dos elementos filtrantes e da alta qualidade do produto obtido. Apesar do preço dos elementos de osmose reversa terem caído nos últimos tempos, a substituição destes continua sendo o fator mais dispendioso de um sistema de osmose reversa. A autópsia de membranas é uma técnica utilizada para investigar a causa que levou à colmatção de um elemento, contribuindo no melhoramento do pré-tratamento da água de alimentação e conseqüentemente aumentando a vida útil dos elementos. O presente trabalho teve como objetivo incrementar a técnica de autópsia de membranas de osmose reversa através da análise da volatilização dos principais compostos inorgânicos presentes nestas membranas, modificação na metodologia de quantificação de açúcares e proteínas, comparação de diferentes técnicas de remoção do material depositado sobre as membranas e análise da distribuição de biofilmes sobre elementos colmatados de osmose reversa. A análise dos resultados mostrou que dentre os inorgânicos, ocorreu volatilização completa do cloreto de amônio e pequena variação no composto cloreto férrico; a quantificação de proteínas e açúcares, através da fortificação das amostras, apresentou valores diferentes quando comparados com os valores obtidos diretamente da curva padrão, devido à diferença de inclinação entre as retas de fortificação e padrão; os resultados também mostraram que a trituração foi mais eficiente na remoção do material aderido quando comparado com a raspagem e a sonicação e a distribuição de biofilmes se mostrou uniforme nos dois elementos analisados.

**Palavras-chave:** Osmose reversa. Autópsias de membranas. Biofouling.



## ABSTRACT

da Costa, T. R. **Analytical techniques for the autopsy of reverse osmosis membranes.** 2011. 61 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Filter membrane systems, especially reverse osmosis, are being increasingly used in various business segments (pharmaceutical, water treatment, food and chemical) due to decrease in the price of the filter elements and high quality product. Although the price of reverse osmosis elements have fallen in recent times, the replacement of the part remains more expensive a reverse osmosis system. The autopsy of membranes is a technique used to investigate the cause that led to clogging of one factor contributing to the improvement of pre-treatment of water feeding and consequently increasing the life of the elements. This study aimed to improve the technique of autopsy reverse osmosis membranes by examining the volatilization of major inorganic compounds present in these membranes, modification the methodology for quantification of sugars and proteins, comparison of different techniques for removal of material deposited on the membranes and distribution analysis of biofilms on elements obscured reverse osmosis. The results showed that among the Inorganic volatilization was full of ammonium chloride and small variation in the compound ferric chloride, the quantification of proteins and sugars, by fortifying the samples showed different values when compared with values obtained directly the standard curve due to the difference in slope between the lines of and fortification standard, the results also showed that the blending was more efficient in removing adhered material when compared with the scraping and sonication and distribution of biofilms showed uniform the two elements analyzed.

**Key words:** Reverse osmosis. Membrane autopsy. Biofouling.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Coeficiente angular das fortificações das amostras .....	52
<b>Tabela 2-</b>	Coeficiente angular das fortificações das amostras .....	53
<b>Tabela 3-</b>	Comparação das concentrações de proteína nas amostras utilizando as absorvâncias obtidas diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão.....	56
<b>Tabela 4-</b>	Coeficiente angular das fortificações das amostras .....	59
<b>Tabela 5-</b>	Coeficiente angular das fortificações das amostras.....	60
<b>Tabela 6-</b>	Comparação das concentrações de glicose nas amostras utilizando as absorvâncias obtidas diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão.....	61

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Representação de uma folha de membrana assimétrica de osmose reversa...	19
<b>Figura 2:</b>	Configuração em espiral de um elemento de osmose reversa .....	20
<b>Figura 3:</b>	Elemento aberto de osmose reversa mostrando um envelope de membrana.	21
<b>Figura 4:</b>	Elemento de osmose reversa fechado (A) e após abertura do elemento em (B) .....	22
<b>Figura 5:</b>	Esquema do fluxo de água da alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana .....	23
<b>Figura 6:</b>	Diferentes arranjos de sistemas de osmose reversa .....	25
<b>Figura 7:</b>	Revestimento externo de um elemento de osmose reversa (A); em uma autópsia deve-se observar se há ou não rachaduras deste revestimento. Vista frontal do elemento com o revestimento externo (B) e sem o revestimento externo (C) .....	30
<b>Figura 8:</b>	Abertura de um elemento de osmose reversa para a observação dos envelopes de membrana .....	30
<b>Figura 9:</b>	Análise dos espaçadores de permeado de dois elementos diferentes .....	31
<b>Figura 10:</b>	Micrografia eletrônica da superfície de uma amostra de membrana de osmose reversa .....	31
<b>Figura 11:</b>	Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa apresentando biofilmes .....	32
<b>Figura 12:</b>	Isolamento da região do permeado de uma das amostras de membranas de osmose reversa utilizadas no crescimento de biofilmes .....	42
<b>Figura 13:</b>	Superfície da membrana exposta ao crescimento de biofilmes.....	42
<b>Figura 14:</b>	Imagem de um envelope de membrana de osmose reversa indicando uma camada de <i>fouling</i> homogênea .....	43
<b>Figura 15:</b>	Região de entrada da água de alimentação de um dos elementos de membrana colmatados .....	44
<b>Figura 16:</b>	Amostras coletadas dos envelopes de membranas analisados .....	45
<b>Figura 17:</b>	Variação de massa dos compostos durante a secagem na estufa à 103°C...	46
<b>Figura 18:</b>	Variação da massa do sulfeto ferroso durante o tempo de estufa à temperatura de 103°C .....	47
<b>Figura 19:</b>	Variação da massa das amostras entre as 12 horas de estufa e duas horas de mufla .....	48

<b>Figura 20:</b>	Variação da massa de sulfeto ferroso entre as 12 horas de estufa e 2 horas de mufla .....	49
<b>Figura 21:</b>	Curva padrão obtida utilizando quantidades conhecidas de BSA .....	50
<b>Figura 22:</b>	Curva padrão obtida utilizando quantidades conhecidas de BSA .....	50
<b>Figura 23:</b>	Absorbância de amostras de biofilmes de 6 membranas diferentes de osmose reversa sem e com homogeneização utilizando esferas de vidro .....	51
<b>Figura 24:</b>	Absorbância das amostras de membranas de osmose reversa sem homogeneização (A) e com homogeneização (B) fortificadas com quantidades variáveis de BSA .....	54
<b>Figura 25:</b>	Representação de um esquema do prolongamento da curva de fortificação de uma amostra qualquer para $y=0$ .....	55
<b>Figura 26:</b>	Curva padrão construída com solução de D-glicose anida dissolvida em água Milli-Q .....	57
<b>Figura 27:</b>	Concentração de glicose das amostras de membranas de osmose reversa com e sem desagregação utilizando esferas de vidro .....	58
<b>Figura 28:</b>	Absorbância das amostras com desagregação (A) e sem desagregação (B) fortificadas com quantidades variáveis de glicose .....	60
<b>Figura 29:</b>	Amostras de membrana após a raspagem do material aderido utilizando espátula (A) e amostra de membrana colmatada (B) .....	62
<b>Figura 30:</b>	Micrografia da amostra de membrana antes da remoção do <i>fouling</i> por raspagem (A) e após a remoção do <i>fouling</i> por raspagem (B) .....	62
<b>Figura 31:</b>	Amostra de membrana após a sonicação (A) e amostra de membrana colmatada (B) .....	63
<b>Figura 32:</b>	Micrografia de uma amostra de membrana antes da sonicação (A) e após a sonicação (B) .....	63
<b>Figura 33:</b>	Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa antes da trituração (A) e após a trituração (B) .....	64
<b>Figura 34:</b>	Amostras de membrana de osmose reversa depois de três meses submersas em um tanque contendo água da raia .....	64
<b>Figura 35:</b>	Peso de dez amostras de membranas limpas com área de 33,6cm <sup>2</sup> antes da estufa e depois de 12 horas na estufa à 70°C .....	65
<b>Figura 36:</b>	Região do permeado de uma das amostras de membrana após três meses submersas em um tanque contendo água da raia da USP .....	66

<b>Figura 37:</b>	Isolamento da região de uma das amostras de membrana onde ocorreu a formação de depósitos .....	66
<b>Figura 38:</b>	Amostra de membrana antes da raspagem (A) e depois da raspagem (B) ...	67
<b>Figura 39:</b>	Micrografia da amostra de membrana antes da remoção do fouling por raspagem (A) e após a remoção do fouling por raspagem (B) .....	67
<b>Figura 40:</b>	Resultados obtidos através da raspagem da superfície das amostras de membranas .....	68
<b>Figura 41:</b>	Uma das amostras de membrana antes da sonicação (A) e depois da sonicação por 5 minutos (B) .....	68
<b>Figura 42:</b>	Micrografia de uma amostra de membrana antes da sonicação (A) e após a sonicação (B) .....	69
<b>Figura 43:</b>	Remoção do <i>fouling</i> em amostras de membranas de osmose reversa utilizando sonicação por 5 minutos na potência máxima .....	69
<b>Figura 44:</b>	Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa antes da trituração (A) e após a trituração (B) .....	70
<b>Figura 45:</b>	Resultados da remoção do <i>fouling</i> em 10 amostras de membrana utilizando a trituração como método de remoção .....	70
<b>Figura 46:</b>	Peso seco das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	71
<b>Figura 47:</b>	% de matéria orgânica das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	72
<b>Figura 48:</b>	% de proteínas das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	72
<b>Figura 49:</b>	% de glicose nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	73

<b>Figura 50:</b>	Unidades formadoras de colônia por área de membrana nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	73
<b>Figura 51:</b>	Número de células por área de membrana nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa .....	74

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1	Membranas filtrantes.....	18
1.2	Elemento de membrana .....	19
1.3	Elementos de membrana de osmose reversa de configuração espiral.....	19
1.3.1	<i>Estrutura e materiais para fabricação de membranas</i> .....	19
1.3.2	<i>Sistemas de osmose reversa</i> .....	24
1.4	Concentração-polarização e Fouling de membranas.....	26
1.5	Biofilmes e biofouling.....	28
1.6	Biofouling em sistemas de membranas.....	29
1.7	Autópsia de membranas .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	Teste de volatilização de compostos inorgânicos.....	35
3.1.1	<i>Incubação das amostras</i> .....	35
3.1.2	<i>Amostras analisadas</i> .....	35
3.1.3	<i>Preparo e manipulação das amostras</i> .....	35
3.1.4	<i>Compensação da massa da água em compostos hidratados</i> .....	36
3.2	Quantificação de proteínas em amostras de membranas de osmose reversa colmatadas utilizando o método de Bradford .....	36
3.2.1	<i>Preparo do reagente</i> .....	36
3.2.2	<i>Ensaio</i> .....	37
3.2.3	<i>Construção da curva padrão utilizando proteína pura (BSA)</i> .....	37
3.2.4	<i>Preparo das amostras de fouling em membranas de osmose reversa sem homogeneização com esferas de vidro</i> .....	37
3.2.5	<i>Preparo das amostras de fouling em membranas de osmose reversa homogeneizadas com esferas de vidro</i> .....	38
3.2.6	<i>Adição de quantidades conhecidas de BSA nas amostras de fouling em membranas de osmose reversa</i> .....	38
3.3	Quantificação de carboidratos em amostras de membranas de osmose reversa colmatadas utilizando o método de Dubois .....	38
3.3.1	<i>Ensaio para quantificação de açúcares</i> .....	39

3.3.2	<i>Construção da curva padrão utilizando D-glicose pura</i>	39
3.3.3	<i>Preparo das amostras de membranas de osmose reversa colmatadas sem homogeneização com esferas de vidro</i>	39
3.3.4	<i>Preparo das amostras de membranas de osmose reversa desagregadas com esferas de vidro</i>	40
3.3.5	<i>Fortificação de amostras com quantidades conhecidas de glicose</i>	40
3.4	<b>Remoção do fouling em membranas de osmose reversa</b>	40
3.4.1	<i>Membrana analisada</i>	41
3.4.2	<i>Métodos de remoção de fouling analisados</i>	41
3.4.3	<i>Método de raspagem</i>	41
3.4.4	<i>Remoção do fouling por sonicação</i>	41
3.4.5	<i>Trituração</i>	42
3.4.6	<i>Cultivo de biofilmes em amostras de osmose reversa</i>	42
3.4.7	<i>Métodos de remoção de fouling analisados</i>	44
3.5	<b>Autópsia de dois elementos colmatados utilizando os parâmetros analisados</b>	44
3.6	<b>Análise estatística dos resultados</b>	46
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
4.1	<b>Variação do peso dos compostos inorgânicos</b>	47
4.1.1	<i>Variação do peso dos compostos inorgânicos durante o tempo de estufa</i>	47
4.1.2	<i>Variação do peso dos compostos durante o tempo na mufla</i>	48
4.2	<b>Quantificação de proteínas em amostras de membranas de osmose reversa</b>	50
4.2.1	<i>Curva padrão</i>	50
4.2.2	<i>Eficiência da lise de células</i>	52
4.2.3	<i>Absorbância das amostras com a adição de quantidades conhecidas de BSA53</i>	
4.2.4	<i>Quantificação de proteínas em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão</i>	56
4.2.5	<i>Comparação das concentrações de proteínas com e sem a utilização da curva padrão</i>	56
4.3	<b>Quantificação de açúcares em amostras de membranas de osmose reversa</b>	57
4.3.1	<i>Curva padrão</i>	57
4.3.2	<i>Absorbância das amostras de membranas de osmose reversa sem e com a desagregação com esferas de vidro</i>	58
4.3.3	<i>Fortificação com glicose das amostras sem e com a desagregação com esferas de vidro</i>	59



4.3.4	<i>Quantificação de açúcares em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão</i>	62
4.3.5	<i>Comparação das concentrações de glicose com e sem a utilização da curva padrão</i>	62
4.4	<b>Remoção do fouling em membranas de osmose reversa</b>	62
4.4.1	<i>Remoção do fouling formado sob condições reais de operação</i>	62
4.4.1.1	<i>Remoção por raspagem</i>	59
4.4.1.2	<i>Remoção por sonicação</i>	61
4.4.1.3	<i>Remoção por trituração</i>	62
4.4.2	<b>Cultivo de biofilmes em amostras de osmose reversa limpa</b>	65
4.4.2.1	<i>Amostras de membranas limpas</i>	63
4.4.2.2	<i>Análise de remoção do fouling das amostras de membranas</i>	64
4.4.2.3	<i>Remoção do fouling das amostras de membranas: raspagem</i>	65
4.4.2.4	<i>Remoção do fouling das amostras de membranas: sonicação</i>	66
4.4.2.5	<i>Remoção do fouling das amostras de membranas: trituração</i>	68
4.4.3	<b>Autópsia de membranas</b>	72
5	<b>CONCLUSÃO</b>	76
	<b>REFERÊNCIAS</b>	77

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Membranas filtrantes

O processo de filtração por membranas é um processo em que a membrana é usada como uma barreira física seletiva para separar compostos aplicando-se uma força dirigida através da membrana. Em um sistema de membranas, a corrente de água da alimentação é separada em duas, o produto ou permeado, contendo solutos que passaram através da membrana e o concentrado, contendo solutos e partículas rejeitadas pela membrana (MALLEVIALLE; ODENDAAL; WIESNER, 1996).

A história recente das membranas filtrantes começou a 250 anos atrás com o clérigo francês Abbe Nollet, quando ele observou o transporte de água através da bexiga de porco que cobria um jarro contendo vinho (LONSDALE, 1982). Cem anos mais tarde em 1867, Moritz Traube preparou a primeira membrana artificial (TRAUBE, 1867). Em 1950, Hassler introduziu o primeiro conceito de dessalinização por membranas (GLATER, 1998). No final de 1950 a base para a osmose reversa atual foi estabelecida através de pesquisas com membranas de acetato de celulose feitas por Reid e Breton (1959) e Loeb e Sourirajan (1960, 1963). Reid e Breton foram os primeiros a demonstrar que filmes de acetato de celulose poderiam produzir água potável a partir de soluções salinas. Loeb e Sourirajan (1963) inventaram as membranas assimétricas de acetato de celulose com alta rejeição de sais e bom fluxo de água, tornando prática a dessalinização por membranas. O primeiro elemento em espiral foi desenvolvido pela empresa General Atomics em 1963. Em 1970, membranas de filme fino, onde uma camada ultrafina separadora de poliamida é depositada sobre um suporte de membrana de ultrafiltração foram desenvolvidas, proporcionando um maior fluxo de água, maior rejeição de sais com pressão de alimentação bem inferior à de membranas de acetato de celulose (BODDEKER, 1995).

Sistemas de membranas podem ser classificados considerando os seguintes parâmetros: força motriz, mecanismo de separação e propriedades de rejeição. No caso de processos de membranas por pressão, a força motriz é a diferença de pressão através da membrana. Exemplos de processos de separação por membranas que utilizam a pressão como força motriz incluem: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa. Uma subclassificação geralmente adotada na prática classifica as membranas de microfiltração e ultrafiltração como processos de separação de baixa pressão, e membranas de nanofiltração e osmose reversa como processos de separação de alta pressão. Microfiltração separa partículas

com tamanho de 0,1 – 0,5 micrômetros e ultrafiltração separa partículas de 0,005 – 0,05 micrômetros. Membranas de nanofiltração são utilizadas para a retenção de íons bivalentes, compostos orgânicos e inorgânicos com peso molecular maior do que cerca de 200 D. Membranas de osmose reversa retêm íons monovalentes (99% de retenção) e constituem as membranas clássicas de dessalinização. Osmose reversa e nanofiltração são processos de separação por membranas em que a membrana densa permite a difusão do solvente e do soluto. Sais, compostos de baixo peso molecular e partículas são rejeitados fisicamente ou por exclusão de carga na superfície da membrana, resultando na separação destes compostos da água (LI, 1990).

## **1.2 Elemento de membrana**

Um elemento de membrana é a unidade operacional contendo as membranas. As membranas precisam ser empacotadas em elementos para maximizar a relação área de superfície da membrana/volume ocupado pelo elemento, permitir a aplicação homogênea da água de alimentação e da pressão de alimentação, de forma que toda a área útil de membrana esteja sujeita às mesmas condições operacionais e garantir a integridade da barreira de separação entre a água de alimentação e o permeado. Muitas configurações têm sido desenvolvidas para os elementos: folha plana, fibra oca, tubular e em espiral. A densidade (área de membrana/volume de elemento) varia muito entre estas configurações. Ela é maior para elementos com membranas de fibra oca (variando de 1000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> em sistemas de microfiltração ou ultrafiltração para 10000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> em sistemas de osmose reversa), intermediária para elementos com folhas planas em configuração espiral (variando de 700 a 1000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>), e mais baixa para elementos de placa ou tubulares (entre 100 a 400 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>), (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001). Atualmente, a configuração mais utilizada em elementos de osmose reversa é a configuração em espiral (MALLEVIALLE; ODENDAAL; WIESNER, 1996).

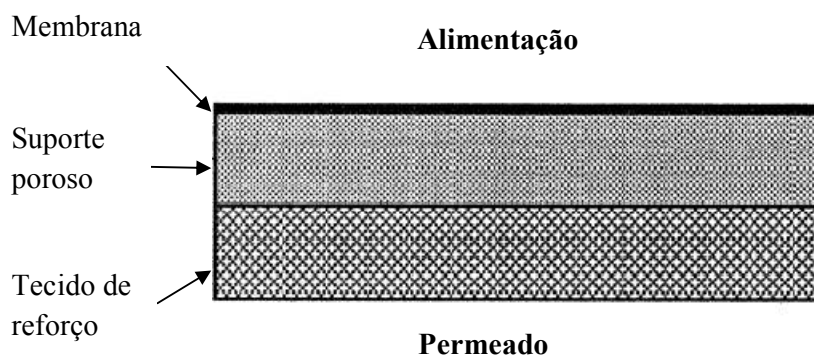
## **1.3 Elementos de membrana de osmose reversa de configuração espiral**

### ***1.3.1 Estrutura e materiais para fabricação de membranas***

Em princípio, qualquer material que permita a síntese de filmes com porosidade controlada pode ser utilizado para a fabricação de membranas. Na prática, entretanto, o

mercado de saneamento básico é dominado por membranas fabricadas com polímeros orgânicos. O alto custo de fabricação ainda restringe o uso de membranas inorgânicas (cerâmicas de óxidos de zircônio, alumínio ou titânio, aço inoxidável) a nicho de mercado que envolvem tratamento de soluções agressivas (pH muito baixo ou muito alto, soluções oxidantes), de altas temperaturas ou de alto valor agregado (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

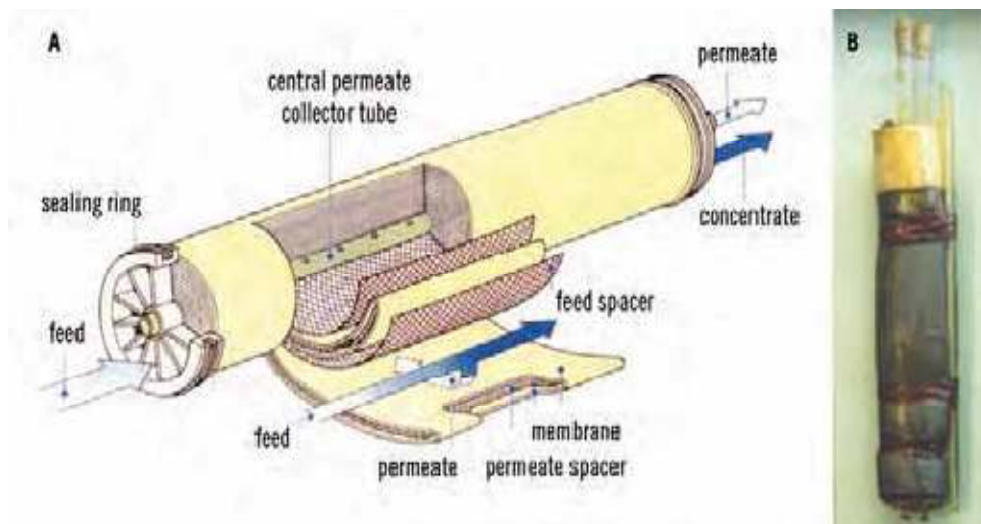
As membranas produzidas e utilizadas atualmente são as chamadas membranas de terceira geração ou membranas compostas. Estas membranas consistem em uma camada fina de polímero depositada em um ou mais suportes porosos (o polímero destes suportes porosos é quase sempre diferente do polímero da membrana). A figura 1 mostra um esquema deste tipo de membrana. A fina camada que corresponde à membrana determina o fluxo e as características de separação, os polímeros abaixo da membrana servem apenas como um suporte mecânico, não afetando as propriedades de transporte da membrana. O polímero que forma a membrana é extremamente fino (0,1  $\mu\text{m}$  ou menos), permitindo um alto fluxo de água (CADOTTE et al., 1981; LONSDALE, 1987; BAKER, 1990; STRATHMANN, 1990; PETERSEN e CADOTTE, 1990).



**Figura 1:** Representação de uma folha de membrana assimétrica de osmose reversa. A membrana em si representa apenas 1% da espessura do suporte poroso.

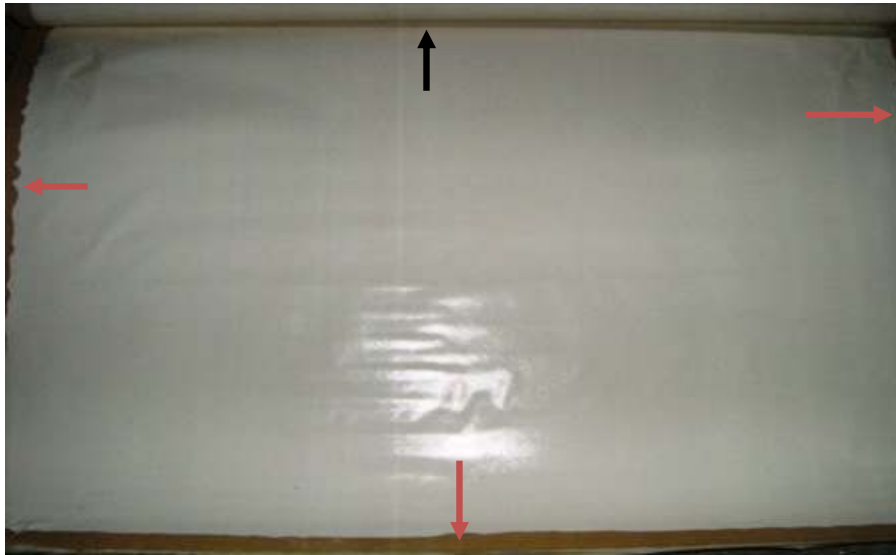
Nos elementos de membrana de configuração espiral, folhas de membranas são enroladas em volta de um tubo perfurado denominado coletor de permeado (Figura 2). Para que este sistema seja funcional, é necessário garantir a alimentação contínua com água sob pressões que podem atingir até 90 bar na dessalinização de água do mar, a remoção contínua

do permeado e a separação dos canais de alimentação, onde circula água bruta, do canal de permeado, por onde escorre a água filtrada na pressão atmosférica.



**Figura 2:** Configuração em espiral de um elemento de osmose reversa: modelo atualmente utilizado (A) e um dos primeiros elementos fabricados (B) em 1963.

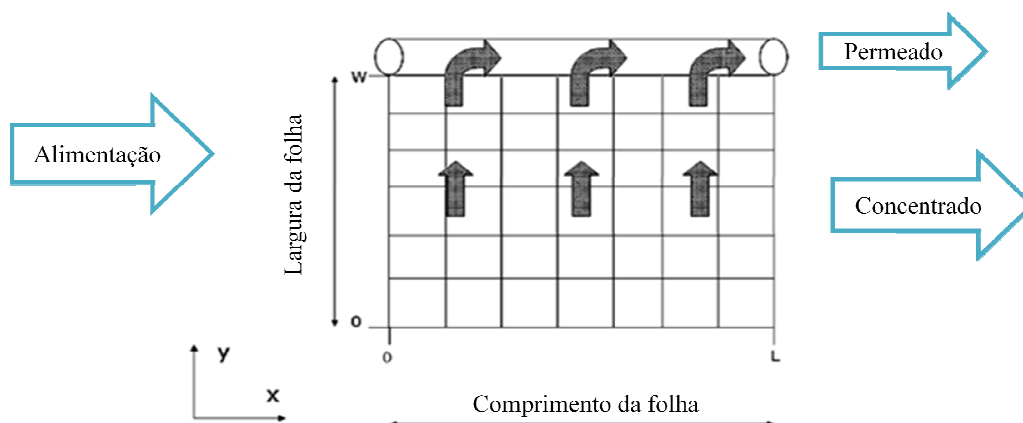
Para maximizar a quantidade área de membrana por volume, as folhas planas de membrana de osmose são acondicionadas em pacotes. Cada pacote consiste de duas folhas de membrana separadas por um espaçador de permeado, sendo que o verso da membrana fica em contato com o espaçador. Para garantir a estanqueidade do canal de permeado, as membranas são coladas nos três vértices formando um envelope; o vértice que não foi colado é conectado ao tubo coletor de forma que o permeado possa escoar para o tubo (Figura 3). Um elemento de membrana contém um grande número destes envelopes, que são separados entre si pelo espaçador de alimentação. O espaçador de alimentação é uma tela bem mais aberta do que o espaçador de permeado e tem como função manter o canal de alimentação aberto no elemento e gerar turbulência e mistura, aumentando o transporte de massa próximo da superfície da membrana, removendo os compostos rejeitados pela membrana (Figura 4). O escoamento da água de alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana é mostrado na figura 5.



**Figura 3:** Elemento aberto de osmose reversa mostrando um envelope de membrana. As setas vermelhas indicam os vértices que foram colados e a seta preta indica o vértice que não foi colado e está em conexão com o canal de permeado.



**Figura 4:** Elemento de osmose reversa fechado (A) e após abertura do elemento em (B); a coloração escura dos envelopes de membrana se deve ao acúmulo de depósitos em suas superfícies (*fouling*). O espaçador de alimentação (C) localiza-se entre os envelopes de membrana gerando turbulência e mistura. O espaçador de permeado (D) é uma tela muito fina que se localiza dentro de cada envelope de membrana ajudando no escoamento do permeado e evitando o colapso entre as folhas de membranas.



**Figura 5:** Esquema do fluxo de água da alimentação, do permeado e do concentrado em um envelope de membrana. O fluxo de água de alimentação dentro de um elemento é tangencial à membrana. O permeado se difunde pela membrana e escoar dentro do envelope para o coletor de permeado (setas escuras)

Fonte: Schwingeetal. (2004).

### 1.3.2 Sistemas de osmose reversa

Plantas com elementos de membranas de osmose reversa na configuração espiral frequentemente utilizam vários estágios de processo. O número de elementos utilizados é uma função da produção desejada. Estas plantas podem ser configuradas em uma variedade de arranjos de um único passo ou vários arranjos com recirculação de permeado (MULDER, 1996).

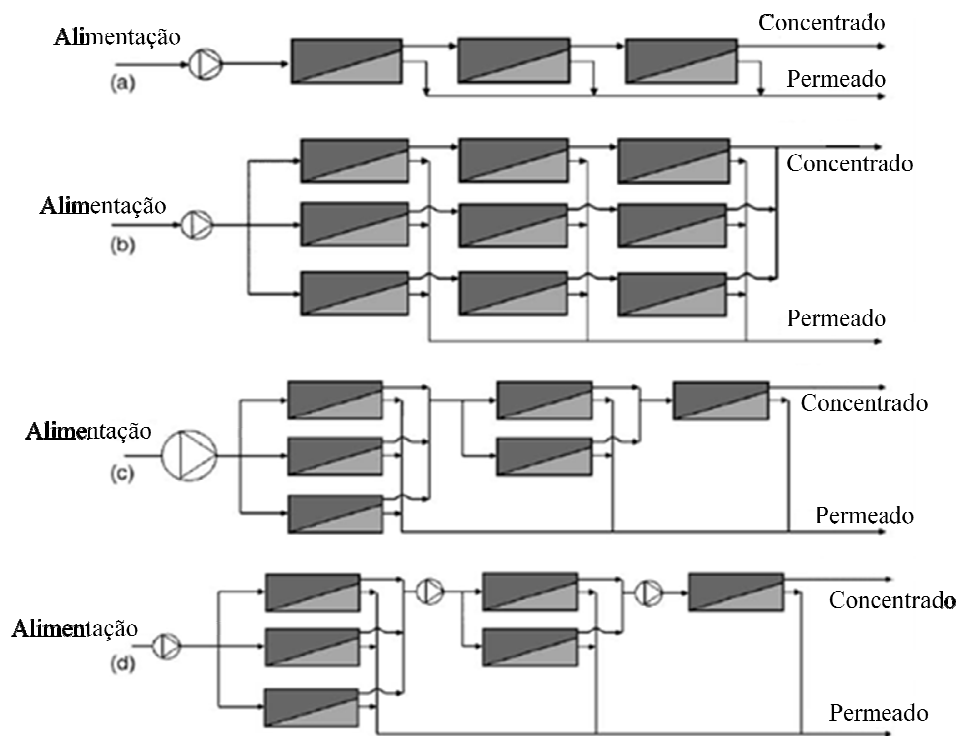
A escolha entre as várias configurações depende do critério utilizado pelo comprador, assim como a eficiência de separação requerida, o tipo e volume do fluido a ser processado e do tamanho da planta (MACINTOSH, 2002).

Os elementos de membrana são combinados em série dentro dos vasos de pressão e estes são dispostos em paralelo para formar um estágio. Estes estágios são combinados em série para formar arranjos. Dependendo do tamanho da planta e da produção desejada, existem três configurações principais de arranjos de osmose reversa (SCHWINGE et al., 2004).

A figura 6 mostra os três principais arranjos de osmose reversa. O arranjo 6(a) é realizado conectando vários vasos de pressão em série. Esta configuração é limitada pelo potencial de formação de *fouling* devido ao grande fluxo de água da alimentação e pela



bomba de pressão que limita o tamanho dos vasos de pressão. Como a pressão de alimentação fornecida pela bomba é igual em todos os vasos (na realidade ela é um pouco menor nos vasos subseqüentes devido à perda de carga nos canais de alimentação), a força-motriz da filtração diminui nos vasos subseqüentes devido ao aumento progressivo da pressão osmótica do concentrado, causando uma redução da taxa de transferência de massa e aumento na formação de fouling (FAZILET, 2000). Arranjos em paralelo como mostrado na figura 6(b), consistem em um número de vasos de pressão em paralelo e são capazes de acomodar um maior número de elementos. O comprimento total dos vasos de pressão é limitado no arranjo em série. Quando o fluxo da alimentação é reduzido significativamente ao longo dos vasos de pressão, devido à permeação, a configuração do arranjo cônico, como é mostrado na figura 6(c) é utilizada. Esta é uma melhor opção de projeto, pois permite uma redução da área transversal ao longo do comprimento do vaso de pressão proporcional à redução da taxa de fluxo. Este arranjo é às vezes chamado de “árvore de natal” (MULDER, 1996). Apesar de mais capaz de lidar com fluxos de alimentação reduzidos, o arranjo cônico pode requerer altas pressões antes do primeiro estágio. O aumento da concentração pode também reduzir a pressão a níveis muito baixos; nestes casos, bombas interestágios, como mostrado na figura 6(d), são usadas para aumentar a pressão e assim melhorar a transferência de massa (SCHWINGE et al., 2004).



**Figura 6:** Diferentes arranjos de sistemas de osmose reversa: (a) arranjo em série, (b) arranjo em paralelo, (c) arranjo cônico e (d) arranjo cônico com bombas entre os estágios

Fonte: Macintosh(2002).

#### 1.4 Concentração-polarização e Fouling de membranas

O termo concentração-polarização se refere ao gradiente de concentração de materiais rejeitados pela membrana, que se forma na camada limite do meio, logo acima da membrana ou da torta de filtro. A retenção de solutos pela membrana aumenta a sua concentração na camada-limite para valores acima dos que ocorrem na zona de mistura total no canal de alimentação. Conseqüentemente, estabelece-se um gradiente de concentração da superfície da membrana em direção ao canal do concentrado. Este processo é o principal responsável pelo acúmulo de partículas, macromoléculas e íons na superfície de membranas. A concentração-polarização não inclui a formação de tortas de filtro, de camadas de gel, de sais precipitados ou de biofilmes microbianos, que são conseqüências da formação da camada de concentração-polarização (SCHNEIDER e TSUTIYA, 2001).

Durante o período inicial de operação a concentração-polarização é a principal razão da queda do fluxo de permeado (SABLANI et al., 2001).

Concentração-polarização é considerada como sendo reversível, podendo ser controlada através do ajuste da velocidade da água de alimentação, pulsação ou campo elétrico. O *fouling* de membranas, ao contrário, é mais complicado, pois existem fatores físicos, químicos e biológicos que conduzem a uma perda da permeabilidade da membrana irreversível (SABLANI et al., 2001).

Denomina-se, genericamente, *fouling* ou *acumulação*, como a formação de depósitos sobre a superfície de equipamentos ou instalações industriais. Esses depósitos têm como efeito negativo uma importante diminuição da eficiência e da vida útil do equipamento (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

Um problema em aplicações de membranas filtrantes é o *fouling*; resultando em um aumento da pressão do canal de alimentação, declínio do fluxo e aumento da passagem de sais. As conseqüências do *fouling* podem ser: aumento da pressão do sistema e, conseqüentemente, maior consumo de energia, limpezas químicas freqüentes e diminuição da vida útil das membranas. Os principais tipos de *fouling* em membranas de osmose reversa são: depósitos inorgânicos, coloidal, particulado e *fouling* orgânico. Diferentes tipos de *fouling* podem ocorrer simultaneamente e podem influenciar uns aos outros (FLEMMING, 1993).

*Fouling* inorgânico é usualmente controlado por um antiescalante e/ou ácido. Testes dinâmicos foram conduzidos por Sahachaiyunta et al.(2002) para investigar o efeito da sílica em *fouling* de membranas de osmose reversa na presença de pequenas quantidades de vários cátions inorgânicos como ferro, manganês, níquel e bário; que estão presentes em processos de tratamento de água industrial. Resultados experimentais mostraram que a presença de ferro afeta muito a estrutura do *fouling* na superfície das membranas quando comparados com outras espécies de metais pesados.

A sílica está presente em águas naturais sob diferentes formas. Quando a concentração de sílica aumenta, a sílica solúvel tende a se polimerizar. A polimerização de íons silicatos conduzem à formação de “incrustação de sílica”, que é um produto amorfo e complexo, uma mistura de numerosos componentes, e impossível precisar que espécies estão presentes e como elas reagem (BRAUN et al., 2010).

O *fouling* coloidal é de particular interesse no campo de membranas filtrantes. Colóides são definidos como partículas finas que possuem um tamanho que varia de 1nm-1µm (BUFFLE, 1995). Devido ao seu tamanho, os colóides podem causar problemas de

fouling em membranas. Partículas menores que os colóides podem ser dispersadas da superfície das membranas via difusão molecular; e partículas maiores que os colóides podem ser removidos pela força de cisalhamento ou por migração lateral (BACCHIN; AIMAR; SANCHEZ, 2006). Exemplos de *fouling* coloidal frequentemente encontrado na superfície de membranas são: alumínio silicatos, sílica, hidróxido ou óxido de ferro e enxofre elementar (TANG e LECKIE, 2010).

*Fouling* particulado pode ser controlado por pré-tratamento, como ultrafiltração. Além disso, todos os tipos de *fouling*, exceto *biofouling* e *fouling* orgânico, podem ser controlados. Os ácidos húmicos possuem moléculas com estruturas fenólicas poliméricas com a habilidade de complexar metais, especialmente o ferro. Os ácidos húmicos conferem uma coloração marrom em águas superficiais e geralmente causam problemas de *fouling* em sistemas de separação por membranas (NYSTROM, 1996). A tendência dos ácidos húmicos causarem *fouling* parece ocorrer devido à sua habilidade em se ligar com sais multivalentes (GOOSEN; AL-HINAI; SABLANI, 2004). Nystrom (1996), por exemplo, mostrou que os ácidos húmicos são mais prejudiciais em membranas que possuem a superfície positivamente carregada. Ácidos húmicos formam complexos com metais (íons multivalentes) e formam uma camada de gel sobre a superfície das membranas. Os ácidos húmicos devem ser removidos da água antes de entrarem nos sistemas de membranas através do pré-tratamento (GOOSEN; AL-HINAI; SABLANI, 2004).

### 1.5 Biofilmes e biofouling

Diversos autores relataram problemas de *biofouling* em sistemas de membranas (FLEMMING, 1993; TASAKA et al., 1994; RIDGWAY e FLEMMING, 1996; BAKER e DUDLEY, 1998; HUISMAN e FENG KONG, 2004; SCHNEIDER et al., 2005; KARIME; BOUGUECHA; HAMROUNI, 2008). Das 70 instalações de membranas de osmose reversa nos Estados Unidos, 58 relataram problemas com *fouling*, sendo o *biofouling*, o problema operacional predominante (PAUL, 1991). Gamal Khedr (2000) relatou que no Oriente Médio, cerca de 70% das instalações de osmose reversa enfrentaram problemas com *biofouling*, indicando que o *biofouling* é o principal tipo de *fouling* em sistemas de membranas de osmose reversa.

A formação de biofilmes é a acumulação de microorganismos, incluindo compostos extracelulares, em uma superfície. *Biofouling* ocorre em casos de formação excessiva do

biofilme, causando problemas operacionais como: aumento da pressão do sistema, redução do fluxo e aumento da passagem de sais (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990).

A formação de biofilmes geralmente envolve três fases: adesão de microorganismos a uma superfície, crescimento e fase estacionária. Na fase estacionária, observa-se o desprendimento de pedaços de biofilme. O biofilme é mantido unido devido à excreção de uma matriz orgânica polimérica de origem microbiana denominada substância extracelular polimérica (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999).

Biofilmes podem conter diferentes tipos de microorganismos como: bactérias, protozoários, fungos e algas. Bactérias encontradas em biofilmes podem ter propriedades significativamente diferentes de bactérias planctônicas da mesma espécie. Biofilmes são utilizados de forma benéfica no tratamento de água, na biorremediação e na indústria biotecnológica (BRYERS, 2000).

O EPS representa o componente mais importante na massa de biofilmes e apresenta uma composição variável principalmente de polissacarídeos (40-95%), proteínas (< 60%), lipídeos (< 40%) e ácidos nucleicos (<10%) (FLEMMING e WINGENDER, 2001). Proteínas estão presentes nas células dos microorganismos incorporados aos biofilmes e podem também ocorrer em quantidades significativas na matriz extracelular, particularmente em biofilmes de reatores de lodos ativados e de paredes de tubulações de coleta de esgotos (MARTINEZ et al., 2004).

## 1.6 Biofouling em sistemas de membranas

*Biofouling* geralmente não aparece de uma forma súbita e sim, se manifesta pela deterioração sutil e contínua dos parâmetros operacionais de um sistema de membrana. Este desenvolvimento sutil é devido à acumulação gradual de depósito biológico: o biofilme. Em sistemas de membranas, o parâmetro chave para controlar o *biofouling* é diminuir a concentração de carbono orgânico assimilável na alimentação do sistema (FLEMMING, 1997).

Microorganismos estão presentes em todas as superfícies em contato com água e sua presença não é indicativa de *biofouling*. Muitos estudos mostraram que microorganismos são comumente encontrados em superfícies expostas à água, até mesmo em sistemas de água pura (MITTELMAN, 1991).

Flemming e Schaule (1989) demonstraram que poucos minutos são necessários para ocorrer a primeira adesão irreversível de células na superfície de membranas. Flemming e

Schaule (1989) também observaram a afinidade bacteriana em diferentes materiais de membranas. Membranas de poliuretano, por exemplo, tem uma afinidade biológica menor do que outros materiais como: poliamida, polisulfona e polietersulfona. Estes resultados sugerem que membranas de poliamida e polisulfona não são adequadas para aplicações de reúso de água.

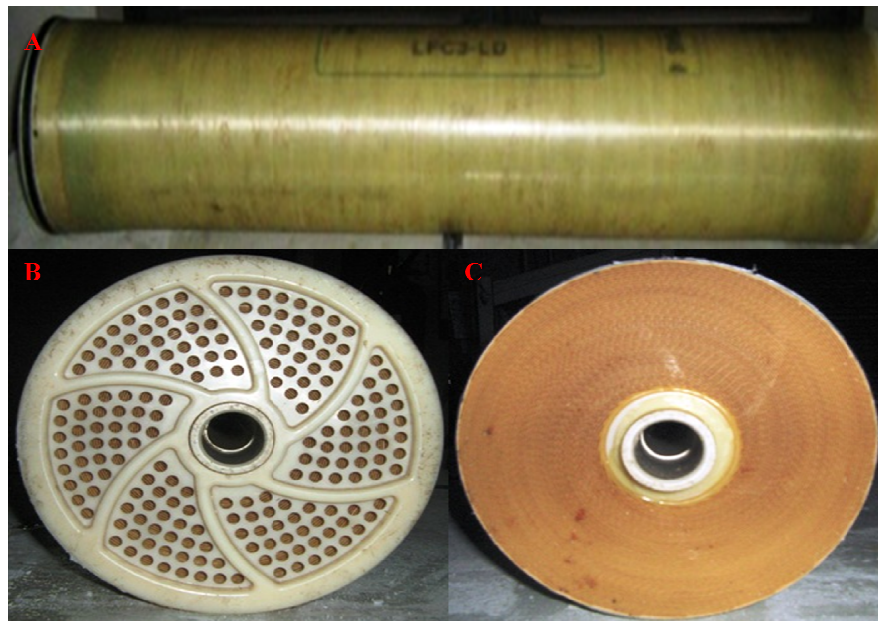
Em sistemas de separação por membranas, a matriz de biofilme é uma membrana secundária que participa do processo de separação. Devido à resistência à difusão do gel, o transporte de massa difusional prevalece sobre o transporte de massa de convecção, que tende a aumentar a concentração polarização sobre a membrana, conduzindo a problemas de incrustação (FLEMMING, 1997).

Ridgway (1991) e Flemming (1992) listaram uma série de conseqüências que o desenvolvimento de biofilmes sobre membranas pode levar: diminuição da produção de permeado, aumento do consumo de energia, inibição do transporte convectivo próximo à superfície da membrana, concentração polarização devido à ausência de fluxo tangencial e diminuição da rejeição de sais.

### **1.7 Autópsia de membranas**

A autópsia de membranas é uma técnica utilizada para identificar a causa do baixo rendimento da membrana. O conceito de autópsia de membranas é tão antigo quanto as próprias membranas (DARTON, 2004). Para isto, um elemento deve ser “sacrificado”, sendo removido da planta para análise. Técnicas analíticas são utilizadas para determinar a natureza do *fouling* presente na superfície das membranas. Um primeiro procedimento na autópsia é a escolha de elementos de membranas apropriados. Cuidados devem ser tomados para preservar a composição de biomassa original. Os procedimentos para uma autópsia de membranas são: seleção de um elemento de membrana representativo (ou elementos), dissecação, análises para identificação dos componentes da camada de *fouling*, com o objetivo de identificar as causas da colmatação (PONTIÉ et al., 2005).

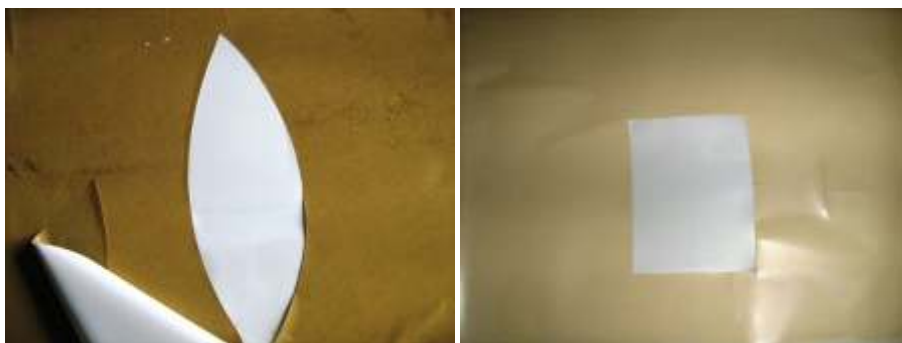
Após a seleção do elemento a ser analisado, a primeira etapa de uma autópsia de membranas, refere-se à observação do revestimento externo das mesmas, dos envelopes de membranas e dos espaçadores de permeado (Figuras 7-9).



**Figura 7:** Revestimento externo de um elemento de osmose reversa (A); em uma autópsia deve-se observar se há ou não rachaduras deste revestimento. Vista frontal do elemento com o revestimento externo (B) e sem o revestimento externo (C).

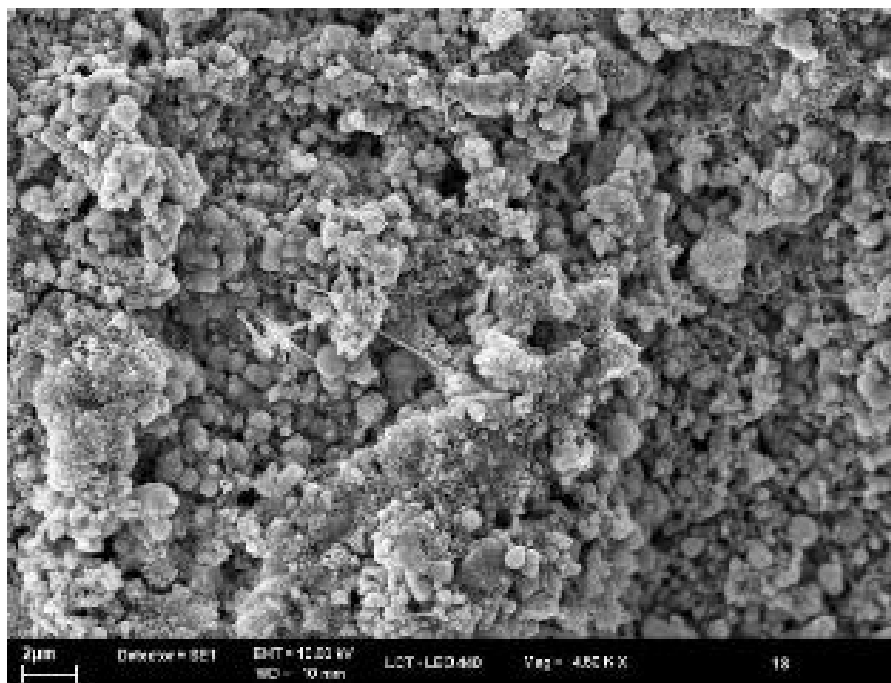


**Figura 8:** Abertura de um elemento de osmose reversa para a observação dos envelopes de membrana.



**Figura 9:** Análise dos espaçadores de permeado de dois elementos diferentes. Para a observação do espaçador de permeado foi removida a membrana de um dos lados de um envelope de membrana. Em ambos os espaçadores não foi observado contaminação. Devido ao espaçador ser extremamente fino, sua observação por fotos fica prejudicada.

Após a análise visual da membrana colmatada, pedaços de membranas são coletados e armazenados em geladeira para análises futuras. Atualmente equipamentos sofisticados como microscopia eletrônica de varredura e fluorescência de raios X são utilizados na análise do *fouling* em membranas (Figuras 10 e 11).



**Figura 10:** Micrografia eletrônica da superfície de uma amostra de membrana de osmose reversa. Presença de material amorfo.





**Figura 11:** Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa apresentando biofilmes.

Darton e Fazell (2001) fizeram uma revisão estatística de 150 artigos de autópsias de membranas e concluíram que: embora todas as membranas analisadas continham biofilmes, estes não são considerados um problema quando as bactérias presentes são menores que  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> e não excretam EPS em grande quantidade; a utilização de cloro não mostrou eficácia na redução de biofilmes sobre a superfície das membranas e o tipo de *fouling* mais comum em membranas de osmose reversa é o *biofouling*, seguido pelo *fouling* causado por ferro e sílica (que invariavelmente está associado ao alumínio e ao ferro).

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo validar os seguintes métodos de autópsia de membranas de osmose reversa: volatilização dos principais compostos inorgânicos presentes em membranas de osmose reversa, para uma quantificação mais precisa da matéria orgânica presente nas amostras de fouling em membranas de osmose reversa, quantificação de proteínas e carboidratos, remoção de *fouling* em superfícies de membranas e análise da distribuição do biofilme em membranas de osmose reversa.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Teste de volatilização de compostos inorgânicos**

Neste ensaio foram validados procedimentos de análises de peso seco e de calcinação, utilizando os seguintes compostos inorgânicos puros: carbonato de cálcio (presença não muito comum, devido a inibidores efetivos presentes no mercado); sulfato de cálcio (forma grandes depósitos na superfície das membranas e sua remoção é muito trabalhosa); sulfato de bário e sulfato de estrôncio (presença não muito comum nas membranas); sílica coloidal (muito encontrada em depósitos nas membranas); fosfato de cálcio (encontrado recentemente como depósito em membranas, devido ao uso de efluentes e águas de reúso); ferro (presença comum nas superfícies de membranas) e sais de manganês e alumínio (pouco presente como depósitos) (DARTON et al., 2004).

##### ***3.1.1 Incubação das amostras***

Cada cadinho de porcelana foi calcinado na mufla à 550 °C por uma hora para remoção de compostos volatilizáveis residuais eventualmente presentes. Depois deste período, os cadinhos foram transferidos para o dessecador até atingirem a temperatura ambiente, para posterior pesagem (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2001).

##### ***3.1.2 Amostras analisadas***

Os compostos inorgânicos analisados foram: sílica, sulfato ferroso, sulfato de estrôncio, sulfato de cálcio, sulfato de bário, carbonato de cálcio, cloreto de amônio, hidróxido de sódio, fosfato de cálcio, cloreto férrico, sulfato de alumínio e sulfeto ferroso.

##### ***3.1.3 Preparo e manipulação das amostras***

Cada amostra foi analisada em triplicata. As amostras foram colocadas em cadinhos de porcelana, previamente aquecidos na mufla, e pesadas em uma balança analítica. Após a pesagem das amostras, estas foram mantidas em uma estufa à 103 °C por no mínimo 12 horas (EPA, 2001). Durante as três primeiras horas na estufa, as amostras eram retiradas, a cada hora, e colocadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente, para depois serem

pesadas. Decorrido este período de três horas, as amostras foram mantidas na estufa até completar o tempo necessário (12 horas), para depois serem pesadas. Após a estufa, as amostras foram aquecidas na mufla à 550 °C por 2 horas (EPA, 2001). Após 20 minutos na mufla à 550 °C, as amostras foram retiradas e colocadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente, para depois serem pesadas (STANDARD METHODS, 1985). Depois de pesadas, as amostras foram novamente aquecidas à 550 °C durante 1 hora. Decorrido este período, elas foram novamente pesadas e, logo após, colocadas na mufla até atingir um tempo total de 2 horas, para novamente serem pesadas.

### ***3.1.4 Compensação da massa da água em compostos hidratados***

Os compostos hidratados sulfato ferroso, sulfato de cálcio, fosfato de cálcio, cloreto férrico e sulfato de alumínio, tiveram a massa de água compensada através de cálculos estequiométricos.

## **3.2 Quantificação de proteínas em amostras de membranas de osmose reversa colmatadas utilizando o método de Bradford**

O método de Bradford baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue nas proteínas. Esta técnica é simples, mais rápida e mais sensível que o método de Lowry. Além disso, quando comparado com o método de Lowry, o método de Bradford sofre menos interferência por reagentes comuns e compostos não protéicos presentes em amostras biológicas, com exceção de detergentes (KRUGER, 2002).

### ***3.2.1 Preparo do reagente***

100 mg de Coomassie blue (Vetec, 95% de pureza) foram dissolvidos em 50 mL de álcool 95%; à esta solução, foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada até completar 1 L de solução. Após o preparo, a solução foi filtrada em filtro de papel e estocada em um frasco envolto por papel alumínio para evitar a entrada de luz na temperatura ambiente (BRADFORD, 1976).

### **3.2.2 Ensaio**

Em cada ensaio foram misturados 100  $\mu$ L de amostra com 5 mL do reagente. Após a adição do reagente nas amostras, estas foram agitadas suavemente em vórtex para não ocorrer a formação de espuma. Para o preparo da amostra sem proteína (branco), 100  $\mu$ L de água Mili-Q e 5 mL de reagente foram adicionados em um tubo de vidro com rosca. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Para a leitura da absorbância das amostras foi utilizado em espectrofotômetro (Amersham, Alemanha) no comprimento de onda de 595 nm. O período de uma hora após a reação para a leitura das amostras não deve ser ultrapassado; pois além deste período, a coloração formada na reação se desestabiliza (BRADFORD, 1976).

### **3.2.3 Construção da curva padrão utilizando proteína pura (BSA).**

A curva padrão foi preparada por diluição de uma solução estoque de Albumina do Soro Bovino (Sigma, 98% de pureza) na concentração de 1 mg/mL (25 mg de BSA diluídos em 25 mL de água Mili-Q). Desta amostra, alíquotas de 10, 20, 40, 60, 80, e 100  $\mu$ L foram transferidas para tubos de vidro com rosca, sendo o volume de 100  $\mu$ L completado com água Mili-Q. Uma curva padrão utilizando as mesmas quantidades de proteínas da curva anterior, porém, com um volume de 200  $\mu$ L, também foi preparada.

### **3.2.4 Preparo das amostras de fouling em membranas de osmose reversa sem homogeneização com esferas de vidro.**

Foram utilizadas amostras de seis elementos colmatados de osmose reversa com uma área de 289 cm<sup>2</sup>. As amostras foram desagregadas em um liquidificador (Black e Decker IB900, São Paulo, São Paulo, Brasil) com 300 mL de água destilada, na velocidade máxima, por 2 minutos. O material produzido na etapa de trituração foi peneirado, para reter os pedaços de membranas, sendo utilizado apenas o líquido percolado pela peneira na análise. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### ***3.2.5 Preparo das amostras de fouling em membranas de osmose reversa homogeneizadas com esferas de vidro***

As mesmas amostras de membrana processadas do item 3.2.4 foram utilizadas neste preparo. Aliquotas destas amostras foram homogeneizadas (Fastprep 120 bio 101 ThermoSavant, EUA) a uma frequência de 5000 rotações por minuto por três minutos junto com esferas de vidro. Nesta homogeneização foram utilizados pequenos frascos com rosca de 2 ml em que um quarto do seu volume foi preenchido com esferas de vidro e o restante com amostras das membranas. Todo o procedimento foi feito em triplicata para cada amostra.

### ***3.2.6 Adição de quantidades conhecidas de BSA nas amostras de fouling em membranas de osmose reversa***

As amostras de membrana foram fortificadas com BSA da mesma solução estoque empregada para o preparo das soluções da curva de calibração. Aliquotas de 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de BSA foram transferidas para tubos de vidro com rosca sendo o volume completado para 100  $\mu\text{L}$  com água Mili-Q. Após este procedimento, 100  $\mu\text{L}$  da mistura obtida após o processamento das amostras de membrana foi adicionada em cada tubo.

## **3.3 Quantificação de carboidratos em amostras de membranas de osmose reversa colmatadas utilizando o método de Dubois**

Os polissacarídeos são quantificados através de métodos de análise de seus açúcares, após hidrólise completa do polímero (AMELUNG; CHESHIRE; GUGGENBERGER, 1996). A quantificação de açúcares monoméricos ou oligoméricos pode ocorrer por métodos cromatográficos ou por meio de técnicas clássicas de colorimetria (DUBOIS, 1956). Os métodos cromatográficos permitem a quantificação de açúcares específicos, o que não é possível com análises colorimétricas, onde são analisados conjuntos de carboidratos em função de suas características químicas. Outro diferencial importante das duas metodologias é a necessidade de equipamentos caros e de técnicos especializados para a execução de análises cromatográficas. As técnicas clássicas de colorimetria demandam menos infra-estrutura laboratorial e menos especialização na sua execução.

A técnica do fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956) é uma reação do carboidrato com fenol e ácido sulfúrico em solução aquosa, resultando em uma coloração laranja. Esta reação pode

ser utilizada para a quantificação colorimétrica de monossacarídeos e seus produtos polimerizados, como oligossacarídeos e polissacarídeos. O método pode ser aplicado para açúcares redutores e não redutores e para muitas classes de carboidratos.

Devido à sua maior robustez e versatilidade, o método de Dubois foi selecionado neste trabalho para análise do teor de açúcares em amostras de *fouling* de membranas de osmose reversa.

### ***3.3.1 Ensaio para quantificação de açúcares***

A reação para a quantificação de carboidratos foi executada conforme descrito por Dubois (1956). A solução estoque de fenol (ultra puro - Invitrogen™) foi preparada dissolvendo-se 80 g de fenol em 20 mL de água Mili-Q. As reações foram executadas em tubos de vidro rosca. À amostra com volume total de 2 ml foram adicionados 50 µl da solução de fenol e 5 ml de ácido sulfúrico (95% de pureza - Synth). Os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos na temperatura ambiente. Decorrido este período, cada amostra foi agitada e colocada em banho-maria à 25 °C por 20 minutos para que a reação se completasse. Todas as amostras foram analisadas utilizando espectrofotômetro (Amersham, Alemanha) com um comprimento de onda de 490 nm. A solução de referência, o “branco”, foi preparada com 2 ml de água Milli-Q.

### ***3.3.2 Construção da curva padrão utilizando D-glicose pura***

A solução estoque foi preparada pela diluição de D-glicose anidra (Synth, 99,8% de pureza) na concentração de 2,94 mg/ml em água Milli-Q. Soluções com as concentrações de glicose de 5, 10, 20, 30 e 35 µg/ml foram preparadas pela transferência de 3,4; 6,8; 13,6; 20,4 e 24 µl, respectivamente, para tubos de vidro rosca, sendo o volume completado para 2ml de água Mili-Q. Cada amostra foi preparada em triplicata.

### ***3.3.3 Preparo das amostras de membranas de osmose reversa colmatadas sem homogeneização com esferas de vidro***

Foram utilizadas amostras de seis elementos colmatados de osmose reversa. Cada amostra de membrana tinha de uma área de 289 cm<sup>2</sup>. As amostras foram trituradas em um liquidificador (Black e Decker IB900, São Paulo, São Paulo, Brasil) com 300 mL de água

destilada, na velocidade máxima, por 2 minutos, e em seguida foram peneiradas, para reter os pedaços de membranas, sendo coletado para a análise, apenas o líquido que passou pela peneira. Uma quantidade de 2 ml de cada amostra foi utilizada no ensaio. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

### ***3.3.4 Preparo das amostras de membranas de osmose reversa desagregadas com esferas de vidro***

Foram utilizadas as mesmas amostras processadas de membrana de osmose reversa citadas no item 3.3.3; porém, 2 ml de cada amostra foi desagregada em homogenizador (Fastprep 120 bio 101 ThermoSavant, EUA) por três minutos a uma frequência de 5000 rotações por minuto junto com esferas de vidro (procedimento utilizado para lisar células bacterianas). Para esta centrifugação, as amostras foram acondicionadas em tubos com rosca de 2 ml. Um quarto do tubo foi preenchido com esferas de vidro, e o restante, preenchido com amostra do material aderido nas membranas. Após a centrifugação, 2 ml de cada amostra processada foi coletada; evitando-se a coleta das esferas. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

### ***3.3.5 Fortificação de amostras com quantidades conhecidas de glicose***

Réplicas das amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de glicose (10, 20, 40, 60 e 70  $\mu\text{g}$ ) pipetando-se os volumes de solução-padrão indicados na seção 3.3.2 para verificação da linearidade da curva de calibração na matriz das amostras. Todos estes experimentos foram conduzidos em triplicata.

## **3.4 Remoção do fouling em membranas de osmose reversa**

Métodos de coleta e processamento de amostras de biofilmes devem garantir a disponibilização de material representativo para análise. No caso de biofilmes suspensos, os métodos devem permitir a seleção dos flocos de biofilme e separar células individuais, enquanto que no caso de biofilmes fixos, o método de coleta deve permitir a remoção quantitativa do biofilme do substrato.



### **3.4.1 Membrana analisada**

As amostras de biofilme aderidas a superfícies sólidas utilizadas nos ensaios foram obtidas de membranas colmatadas de osmose reversa. Para a análise das diferentes técnicas de remoção de biofilmes aderidos à superfície das membranas foi utilizado um elemento de osmose reversa colmatado. Foram coletadas amostras dessa membrana com a mesma área (1,6 x 3,4 cm). Devido à dificuldade de se conseguir uma amostra de membrana limpa do mesmo lote da membrana colmatada, uma análise quantitativa não pode ser feita utilizando este elemento.

### **3.4.2 Métodos de remoção de fouling analisados**

Todos os métodos de extração foram feitos em triplicata. A primeira pesagem das amostras foi executada com o material hidratado, pois caso contrário, o método de raspagem e sonicação ficariam comprometidos devido à dificuldade de se remover a camada de *fouling* com o material seco.

### **3.4.3 Método de raspagem**

Foram coletadas três amostras de área (1,6 x 3,4 cm) do elemento de osmose colmatado. Essas amostras foram pesadas sem a secagem das mesmas em uma balança analítica. Após este procedimento, as camadas de *fouling* foram removidas com movimentos suaves, para não danificar a membrana, utilizando uma espátula. Feita a remoção do material aderido nas amostras, estas foram pesadas e, posteriormente, secas em estufa por 12 horas à temperatura de 105 °C (EPA, 2009). Logo depois, estas amostras foram colocadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas em uma balança analítica. A microscopia eletrônica de varredura, (FEI Quanta 600 FEG Hillsboro, Oregon, EUA), foi utilizada para uma observação mais detalhada da remoção do material aderido nas amostras de membrana.

### **3.4.4 Remoção do fouling por sonicação**

Foram utilizadas três amostras de membranas com área (1,6 x 3,4 cm) de osmose reversa do elemento colmatado. Essas amostras foram pesadas em uma balança analítica. Foi

utilizado o sonicador (Ultrasonik™ 28X) para a remoção do material aderido nas amostras. A cuba do sonicador foi preenchida com água destilada que foi submetida à degaseificação por 10 minutos; este procedimento foi realizado para cada amostra de membrana. Após a degaseificação, cada amostra foi submetida por 5 minutos, à potência máxima de sonicação. Em seguida as amostras de membrana foram secas em temperatura ambiente e pesadas; posteriormente, estas amostras foram incubadas na estufa por 12 horas (105 °C) e depois colocadas no dessecador até atingirem a temperatura ambiente para serem pesadas. A microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 600 FEG Hillsboro, Oregon, EUA) foi utilizada para uma observação mais detalhada da remoção do material aderido nas amostras de membrana.

#### **3.4.5 Trituração**

Três amostras do mesmo elemento de osmose com área de (1,6 x 3,4 cm cada) foram utilizadas neste método. As amostras foram pesadas em uma balança analítica e colocadas, separadamente, em um liquidificador previamente esterilizado com álcool 70%. Foi acrescentada no liquidificador uma quantidade de água destilada suficiente (300 mL) para que cada amostra fosse centrifugada por 2 minutos na potência máxima. Cada amostra processada foi passada por uma peneira para separação dos fragmentos de membrana. Estes fragmentos foram secos em temperatura ambiente para serem pesados em Béckers previamente aquecidos e pesados. Posteriormente, os fragmentos de membranas foram colocados na estufa por 12 horas à 105 °C, para depois serem colocados no dessecador e, posteriormente, pesados. A microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 600 FEG Hillsboro, Oregon, EUA) foi utilizada para uma observação mais detalhada da remoção do material aderido nas amostras de membrana.

#### **3.4.6 Cultivo de biofilmes em amostras de osmose reversa**

Devido à dificuldade de se obter uma amostra de osmose reversa limpa igual ao elemento colmatado do item 3.4.1, um elemento de osmose reversa novo (modelo No: RE-70-1812) foi utilizado para a análise comparativa da eficiência da remoção de *fouling* utilizando as técnicas de raspagem, sonicação e trituração.

A partir da abertura do elemento novo de osmose reversa (modelo No: RE-70-1812), foram obtidas quarenta amostras de membranas. Dentre as quarenta amostras de membrana,

dez amostras com área de 33,6 cm<sup>2</sup> foram separadas e pesadas antes da estufa e novamente pesadas depois de 12 horas em estufa à 70 °C (utilizando uma temperatura superior, observou-se danos nas mesmas) para a obtenção de dados da membrana limpa. As trinta amostras restantes foram utilizadas para o cultivo de biofilmes em suas superfícies.

As trinta amostras de membrana de osmose reversa tiveram a face do permeado isolada com plástico e fita isolante para que o crescimento de biofilmes ficasse restrito à superfície de separação da membrana com área de 33,6 cm<sup>2</sup>, que no sistema real fica exposta à água de alimentação (Figuras 12 e 13). As amostras de membranas foram submersas em um tanque contendo água corrente da raia olímpica da Universidade de São Paulo por um período de três meses para a formação de biofilme microbiano nas suas superfícies



**Figura 12:** Isolamento da região do permeado de uma das amostras de membranas de osmose reversa utilizadas no crescimento de biofilmes. A região do permeado foi isolada utilizando saco plástico, envolvendo toda a região, e fita isolante para fixar este plástico.



**Figura 13:** Superfície da membrana exposta ao crescimento de biofilmes (área de 33,6 cm<sup>2</sup>).

### 3.4.7 Métodos de remoção de *fouling* analisados

Os mesmos métodos de remoção do *fouling* (raspagem, sonicação e trituração) foram utilizados nas amostras de membranas que foram submersas para o crescimento de biofilmes.

### 3.5 Autópsia de dois elementos colmatados utilizando os parâmetros analisados

Dois elementos colmatados de osmose reversa da empresa White Martins foram utilizados para a autópsia. Os parâmetros analisados foram: quantificação de proteínas e carboidratos, contagem total de células, unidades formadoras de colônia, peso seco e porcentagem de matéria orgânica. Após a abertura dos elementos, constatou-se visualmente, que a camada de *fouling* era homogênea em todos os envelopes de membranas (Figura 14).

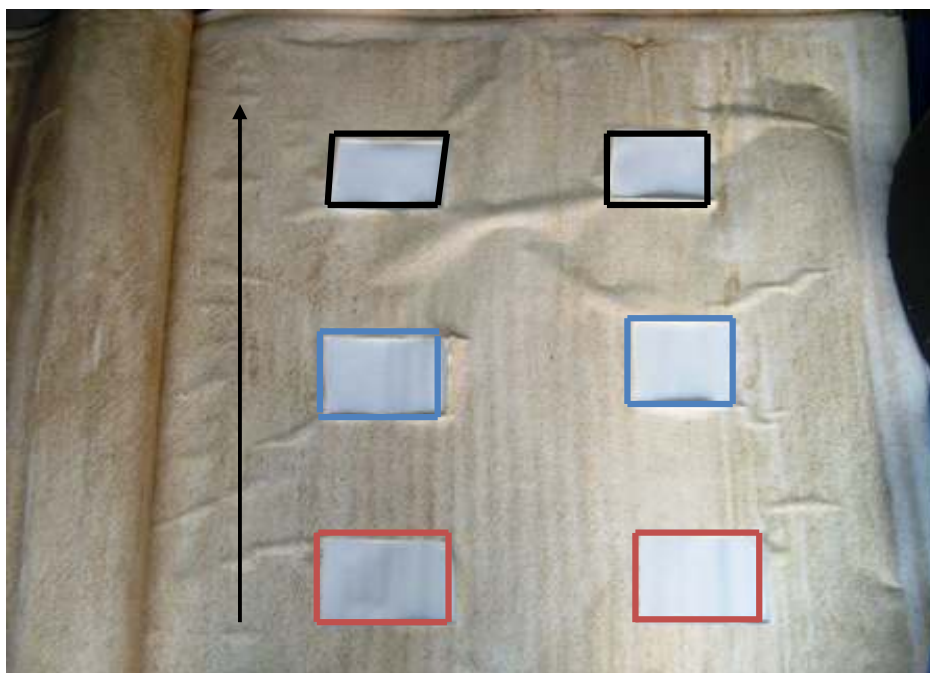
Para verificar se o *biofouling* também era homogêneo, foram coletadas amostras de membranas próximas ao coletor de permeado, amostras da região mediana e da região mais afastada do coletor de permeado (Figura 15). Em cada região, foram coletadas amostras de três envelopes de membrana, totalizando 18 amostras por região (interna, mediana e externa em relação ao coletor de permeado) (Figura 16).



**Figura 14:** Imagem de um envelope de membrana de osmose reversa indicando uma camada de *fouling* homogênea. Nos dois elementos analisados, visualmente, a camada de *fouling* possuía as mesmas características.



**Figura 15:** Região de entrada da água de alimentação de um dos elementos de membrana colmatados. As setas indicam as regiões ou envelopes de membranas que foram utilizados para a coleta das amostras. Três envelopes de cada região foram utilizados para a coleta das amostras. A seta azul indica os envelopes de membranas mais próximos à região do coletor de permeado, a seta vermelha representa os envelopes da região mediana e a seta preta indica os envelopes externos, ou seja, mais distantes do coletor de permeado.



**Figura 16:** Amostras coletadas dos envelopes de membranas analisados. Para cada região analisada (interna, mediana e externa com relação ao coletor de permeado), três envelopes de membranas foram utilizados. Em cada envelope, foram coletadas duas amostras da parte da entrada da alimentação (retângulo vermelho), duas da parte mediana (retângulo azul) e duas da parte da saída do concentrado (retângulo preto). A seta em preto indica o fluxo de água que tangencia cada envelope de membrana.

### 3.6 Análise estatística dos resultados

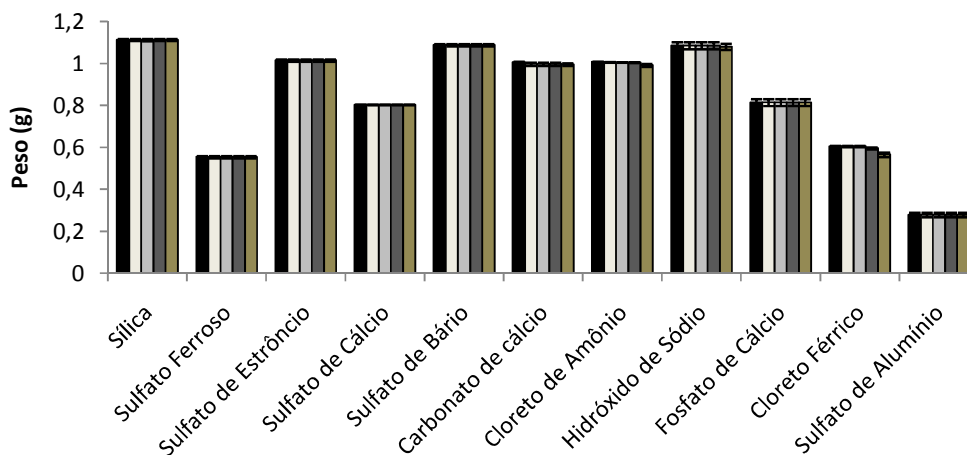
Os testes estatísticos foram realizados através da planilha eletrônica do Excel ANOVA fator único.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Variação do peso dos compostos inorgânicos

#### 4.1.1 Variação do peso dos compostos inorgânicos durante o tempo de estufa

Durante o período de secagem de 12 horas na estufa à 103 °C, a maioria dos compostos não teve seu peso alterado, com exceção do cloreto férrico, que manteve seu peso constante nas três primeiras horas de estufa e perdeu 6,7% de seu peso até completar 12 horas de estufa; e o cloreto de amônio, que manteve seu peso constante nas três primeiras horas de estufa e em seguida perdeu 1,6% de seu peso nas doze horas de estufa (Figura 17).

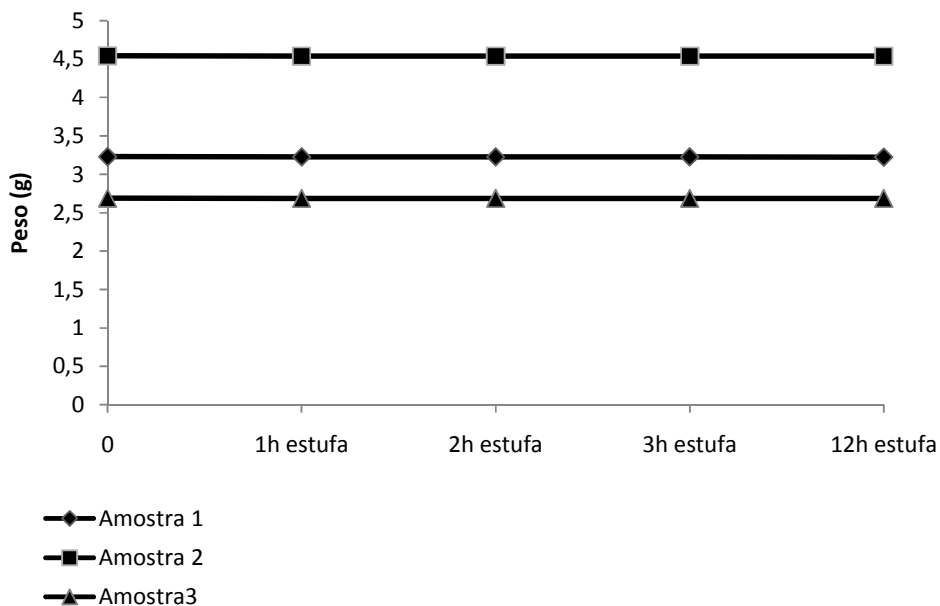


**Figura 17:** Variação do peso dos compostos durante a secagem na estufa à 103°C. ■ 0h de estufa, □ 1h de estufa, ▨ 2h de estufa, ▩ 3h de estufa e ▪ 12 horas de estufa. O desvio padrão das pesagens das amostras foi muito pequeno cerca de 0,005 gramas, permanecendo dentro da dimensão. As amostras foram analisadas em triplicatas.

O peso do cloreto de amônio varia muito pouco até uma temperatura de 200 °C. A 185°C ocorre uma mudança do cristal do cloreto de amônio (ERDEY et al., 1964).

O composto sulfeto ferroso não teve seu peso alterado durante o tempo de estufa (Figura 18). Devido à dificuldade de se pesar as amostras do composto em pequenas

quantidades, pois este se apresentava na forma de agregados muito duros, os resultados referentes a este composto foram apresentados em figura separada.

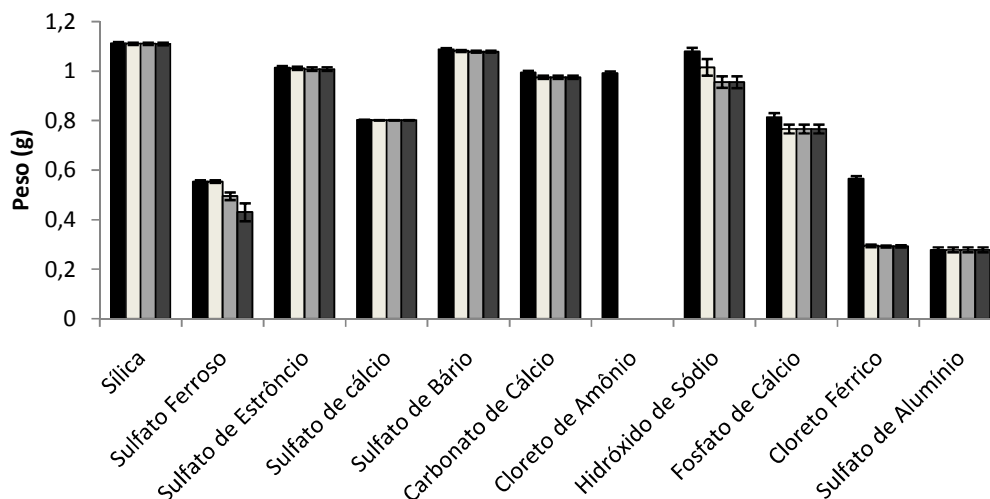


**Figura 18:** Variação do peso do sulfeto ferroso durante o tempo de estufa à temperatura de 103 °C. As três amostras apresentaram pesos diferentes pois foram usados fragmentos do material que estava fortemente agregado.

#### 4.1.2 Variação do peso dos compostos durante o tempo na mufla

Após o tempo de estufa e posterior pesagem, as amostras foram aquecidas na mufla à 550 °C por até duas horas, mas o peso das amostras foram analisados após 20 minutos e 1 hora. O peso de hidróxido de sódio diminuiu 12% durante a primeira hora de incubação a 550 °C e se estabilizou após este período (Figura 19). O fosfato de cálcio perdeu 6% de seu peso nos primeiros 20 minutos de incubação na mufla e se estabilizou posteriormente. O cloreto de amônio volatilizou por completo após 20 minutos de exposição a 550 °C. A massa do sulfato ferroso permaneceu estável durante os primeiros 20 minutos de incubação, mas diminuiu 22% no período seguinte, sendo que os dados não indicaram estabilização do peso no final do experimento, após 2 horas. O cloreto férrico perdeu 48% de sua massa durante os primeiros 20 minutos de incubação, estabilizando após este período.

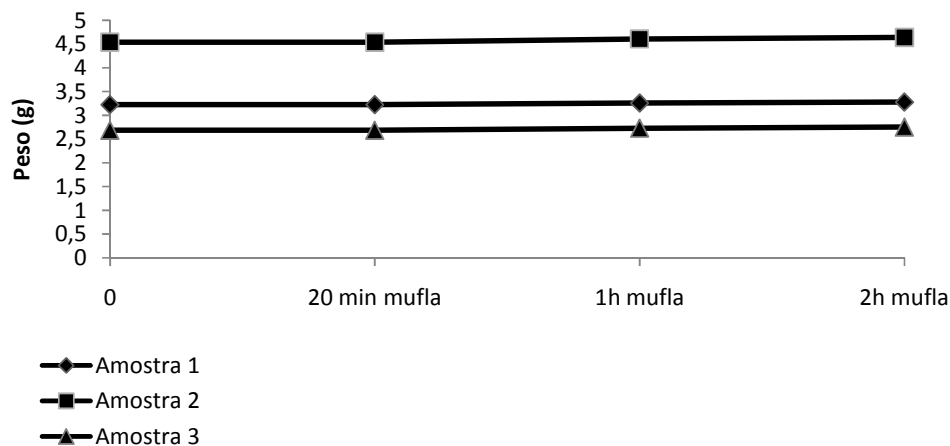




**Figura 19:** Variação do peso das amostras entre as 12 horas de estufa e duas horas de mufla. ■ Após 12h de estufa, □ após 20min de mufla, ▒ após 1 h de mufla e ■ após 2h de mufla. Em algumas amostras, o desvio padrão foi muito pequeno, não sendo visualizado na figura. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

Acima de 200 °C, o composto cloreto de amônio começa a sublimar, atingindo a taxa máxima à 345 °C. Após a sublimação o sal é totalmente dissociado nas fases gasosas em amônia e ácido clorídrico (ERDEY et al., 1964).

O peso do sulfeto ferroso permaneceu estável durante as 2 horas de incubação na mufla (Figura 20).



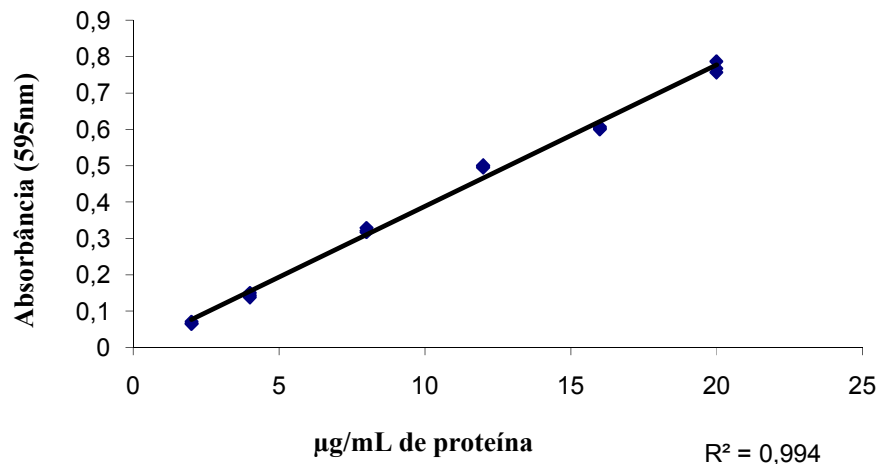
**Figura 20:** Variação do peso de sulfeto ferroso entre as 12 horas de estufa e 2 horas de mufla.

Alguns compostos inorgânicos comuns como o carbonato de cálcio, o fosfato de cálcio, o cloreto férrico e o sulfato ferroso, encontrados em biofilmes formados nas superfícies das folhas de membranas de osmose reversa, sofreram perda do peso durante um tempo de 2 horas na mufla à 550 °C. Dos resultados obtidos, apenas o cloreto de amônio e o cloreto férrico mostraram resultados de acordo com a literatura (temperatura de ebulição 345 e 520 °C respectivamente) (SPEIGHT, 2004).

## 4.2 Quantificação de proteínas em amostras de membranas de osmose reversa

### 4.2.1 Curva padrão

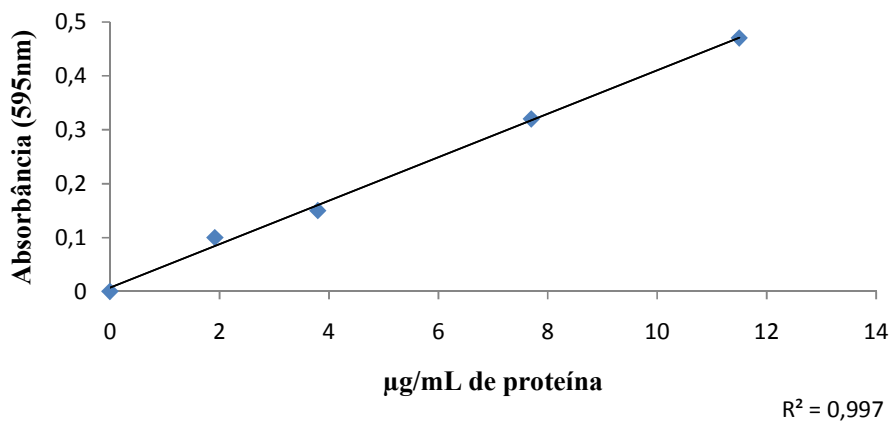
A curva padrão obtida pela adição de diferentes quantidades de BSA em água Mili-Q foi linear na faixa de concentração de 2 a 20 µg/ml (Figura 21).



**Figura 21:** Curva padrão obtida utilizando quantidades conhecidas de BSA (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg) que tiveram suas absorvâncias medidas em um comprimento de onda de 595nm. Os desvios padrão das absorvâncias da menor para a maior concentração de BSA foram respectivamente: 0,003; 0,006; 0,006; 0,003; 0,003 e 0,015.

Bradford (1976) obteve resultado similar de absorvância em relação à quantidade de BSA na construção da curva padrão.

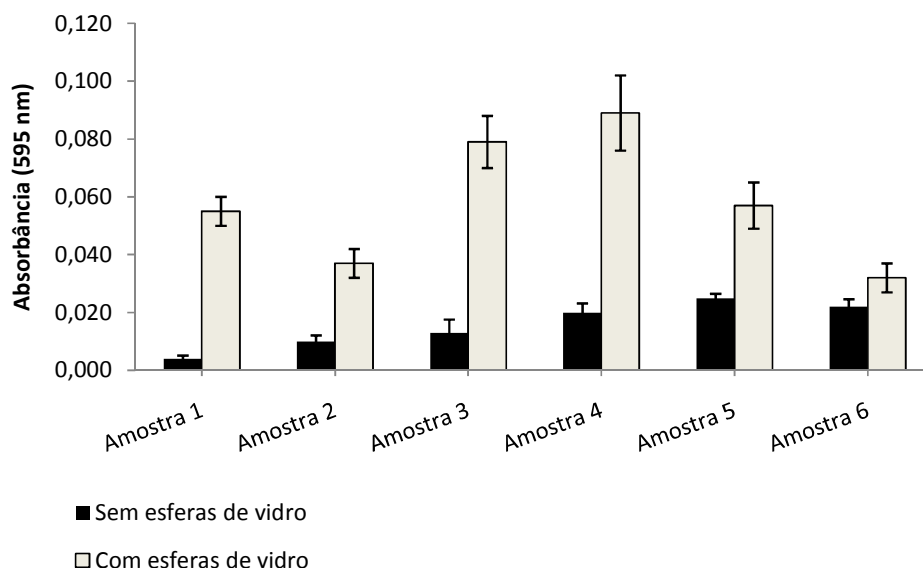
Uma curva padrão foi construída com as mesmas quantidades de proteína utilizadas na figura 21, porém com um volume final de amostra de 200 µL, para verificar possíveis variações na quantificação (Figura 22).



**Figura 22:** Curva padrão obtida utilizando quantidades conhecidas de BSA (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg), com um volume de 200 µL de amostra.

#### 4.2.2 Eficiência da lise de células

Para verificar se a reação de Bradford lisa ou não células com eficiência, foram realizadas reações em amostras de *fouling* com e sem homogeneização com esferas de vidro. A quantidade de proteínas medida nas amostras de membranas processadas sem homogeneização com esferas de vidro sempre foi muito inferior à das amostras homogeneizadas, cerca de 70%, por exemplo, na amostra 3 (Figura 23). Esta diferença foi estatisticamente significativa. O aumento da concentração de proteínas após homogeneização demonstra que a solução utilizada no ensaio não é um agente eficiente de lise celular. É indispensável, portanto, a incorporação de uma etapa de lise prévia no protocolo de análise de proteínas de biofilmes. Zhang (2007) em amostras de lodos, observou um aumento da concentração de proteínas no meio devido à desintegração e lise de células do lodo.



**Figura 23:** Absorbância de amostras de biofilmes de 6 membranas diferentes de osmose reversa sem e com homogeneização utilizando esferas de vidro. Os desvios padrão das amostras que não foram homogeneizadas foram respectivamente: 0,001; 0,002; 0,005; 0,003; 0,002 e 0,003. Das amostras homogeneizadas foram: 0,005; 0,005; 0,009; 0,013; 0,008 e 0,005.

#### 4.2.3 Absorbância das amostras com a adição de quantidades conhecidas de BSA

Pendashteh et al., (2011) e Flemming (1997) utilizaram o método de Bradford para a quantificação de proteínas em biofilmes em membranas de osmose reversa utilizando as absorbâncias diretamente na curva padrão; Rahimpour, Madaeni e Mansourpanah (2010), quantificaram proteínas retidas em diferentes tipos de membranas de ultrafiltração através do método de Bradford utilizando a curva padrão na quantificação das mesmas; Zhao, Song e Ong (2010), Domínguez (2010) e Wang e Waite (2009) utilizaram o método de lowry para a quantificação de proteínas em fouling de membranas, utilizando a curva padrão diretamente na quantificação das amostras. Para verificar se interferentes da amostra influem no resultado da análise, todas as amostras foram fortificadas com quantidades conhecidas de BSA. Todos os experimentos de fortificação resultaram em resposta linear da absorbância com relação à quantidade de proteína adicionada, demonstrando que a reação química do teste continua sendo proporcional à quantidade de proteína (Figura 24).

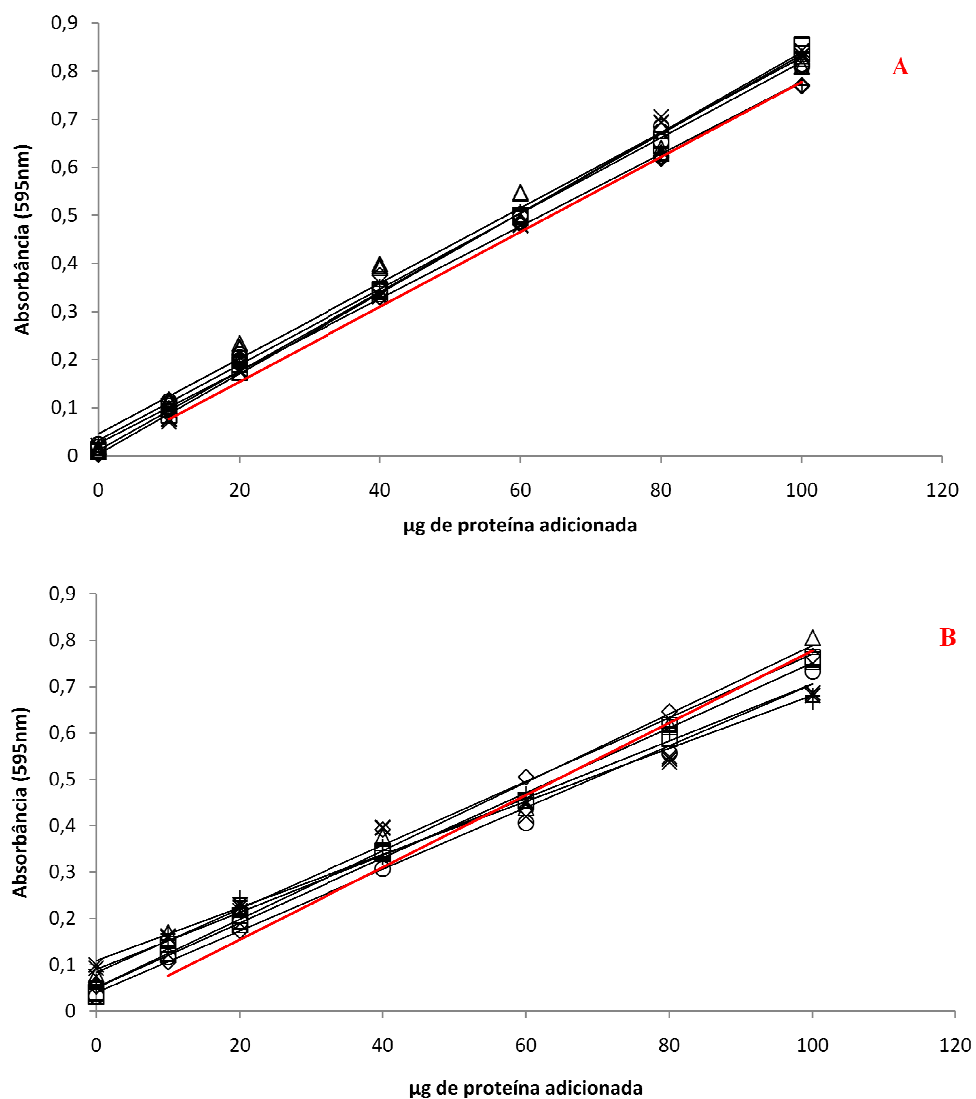
O segundo aspecto importante que deve ser analisado é se a inclinação da reta de calibração na amostra foi similar à inclinação da reta da curva de calibração com solução padrão. Em relação à inclinação da reta, as amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de biofilmes de membrana, que não foram homogeneizadas com esferas de vidro, variaram 0%, 14,3%, 0%, 14,3%, 0% e 0%, respectivamente, em relação à inclinação da reta padrão; as amostras que foram homogeneizadas com esferas de vidro variaram: 0%, 0%, 14,3%, 28,7%, 14,3% e 14,3%, respectivamente, em relação à inclinação da reta padrão (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1- Coeficiente angular das fortificações das amostras.**

Amostras não homogeneizadas	Coeficiente angular
1	0,007
2	0,006
3	0,007
4	0,006
5	0,007
6	0,007

**Tabela 2- Coeficiente angular das fortificações das amostras.**

Amostras homogeneizadas	Coeficiente angular
1	0,007
2	0,007
3	0,006
4	0,005
5	0,006
6	0,006

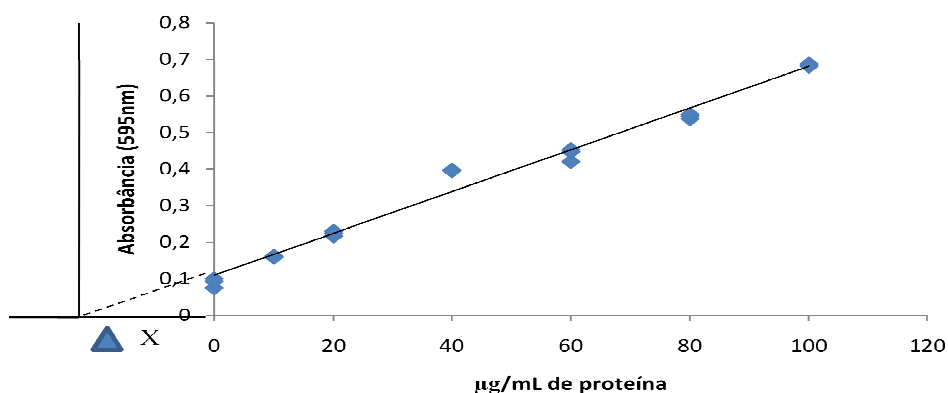


**Figura 24:** Absorbância das amostras de membranas de osmose reversa sem homogeneização (A) e com homogeneização (B) fortificadas com quantidades variáveis de BSA (10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g}$ ). Em (A) temos: amostra 1 ( $\diamond$   $R^2 = 0,996$ ), amostra 2 ( $\square$   $R^2 = 0,998$ ), amostra 3 ( $\boxtimes$   $R^2 = 0,988$ ), amostra 4 (X  $R^2 = 0,996$ ), amostra 5 (+  $R^2 = 0,996$ ) e amostra 6 ( $\circ$   $R^2 = 0,998$ ). Em (B) temos as mesmas amostras, porém homogeneizadas; apresentando  $R^2$  igual a: 0,991; 0,997; 0,984; 0,982; 0,988 e 0,992 respectivamente. A linha vermelha em ambos é a curva padrão.

#### 4.2.4 Quantificação de proteínas em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão

Como as fortificações das amostras apresentaram uma inclinação significativamente diferente da inclinação da amostra padrão (solução de BSA), a quantificação de proteínas nas amostras não pode ser feita por meio da curva padrão.

Para a quantificação de proteínas em amostras de *fouling* de membranas de osmose reversa deve-se fortificar cada amostra para se obter a equação da reta (Figura 24). O primeiro ponto de cada amostra no gráfico corresponde à quantidade de proteína presente nas mesmas; porém, o eixo x encontra-se defasado, indicando como nula a quantidade de proteínas nas amostras. Para corrigir esta defasagem e obter a quantidade total de proteínas nas amostras, deve-se prolongar a reta de fortificação até o ponto  $y=0$ ; neste ponto, temos  $b=0$ . Portanto, com a equação da reta obtida na fortificação de cada amostra e com  $b=0$ , obtêm-se a quantidade real de proteínas nas amostras (Figura 25).



**Figura 25:** Representação de um esquema do prolongamento da curva de fortificação de uma amostra qualquer para  $y=0$ . O valor de  $\Delta X$  representa o valor real da concentração de proteína na amostra.

#### 4.2.5 Comparação das concentrações de proteínas com e sem a utilização da curva padrão

A tabela 3 compara as concentrações de proteínas das amostras de membranas homogêneas com esferas de vidro utilizando os valores das absorvâncias das amostras diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão, ou seja, utilizando o procedimento descrito no item 4.2.3



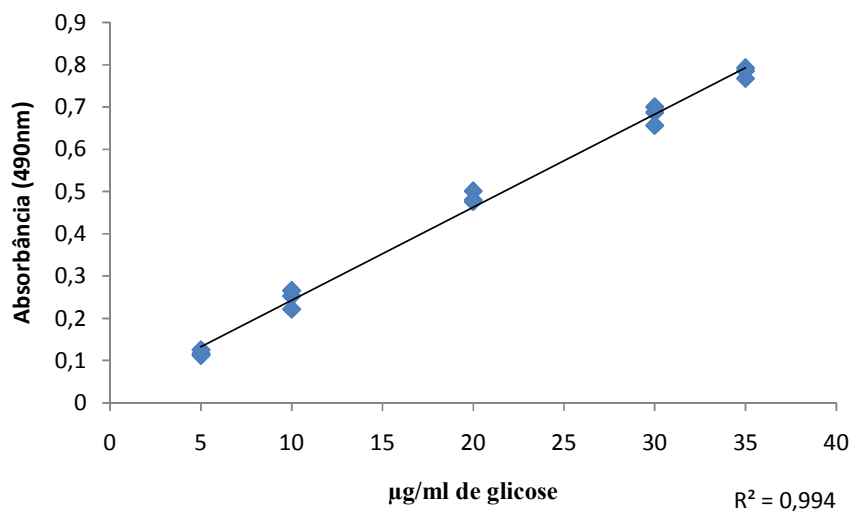
**Tabela 3- Comparação das concentrações de proteína nas amostras utilizando as absorbâncias obtidas diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão.**

Amostras de membranas homogeneizadas	Média das absorbâncias das amostras	[ ] de proteína utilizando diretamente a curva padrão ( $\mu\text{g/ml}$ )	[ ] de proteína utilizando a fortificação ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	0,054	1,35	1,52
2	0,037	0,92	1,06
3	0,079	1,97	2,32
4	0,089	2,22	3,17
5	0,057	1,42	1,9
6	0,032	0,8	0,96

### 4.3 Quantificação de açúcares em amostras de membranas de osmose reversa

#### 4.3.1 Curva padrão

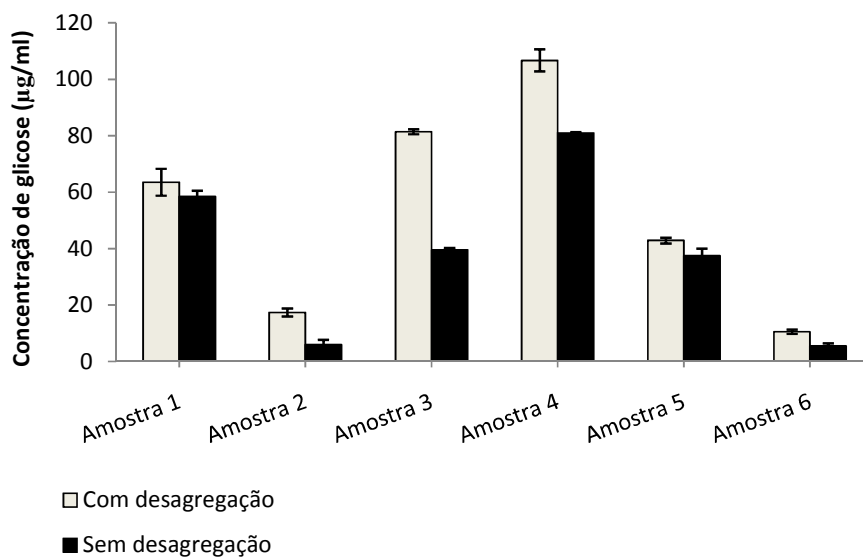
A curva padrão obtida com soluções de D-glicose anidra dissolvida em água Mili-Q foi linear na faixa de concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  a 35  $\mu\text{g/mL}$ , com  $R^2$  de 0,994 (Figura 26). Dubois (1956) obteve resultado similar de absorbância em relação à quantidade de D-glicose na construção da curva padrão.



**Figura 26.** Curva padrão construída com solução de D-glicose anida dissolvida em água Milli-Q. Os desvios padrão foram: 0,006; 0,02; 0,013; 0,022 e 0,012 respectivamente da menor para a maior concentração de glicose.

#### ***4.3.2 Absorvância das amostras de membranas de osmose reversa sem e com a desagregação com esferas de vidro***

Para verificar se a reação de Dubois lisa ou não células, foram realizadas reações em amostras de *fouling* com e sem homogeneização com esferas de vidro. Apesar das amostras das 2, 3, 4 e 6, que não foram homogeneizadas com esferas de vidro, apresentarem teores de açúcares inferiores aos das amostras analisadas com desagregação, estatisticamente, a diferença entre os valores não foi estatisticamente significativa (Figura 27).



**Figura 27:** Concentração de glicose das amostras de membranas de osmose reversa com e sem desagregação utilizando esferas de vidro. As amostras neste trabalho foram denominadas 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Os desvios padrão para as amostras com desagregação foram: 4,76; 1,41; 0,87; 3,88; 1,01 e 0,75 respectivamente. Os desvios padrão para as amostras sem desagregação foram: 2; 1,7; 0,76; 0,28; 2,5 e 1,04 respectivamente.

#### 4.3.3 Fortificação com glicose das amostras sem e com a desagregação com esferas de vidro

Hijnen, 2011, Pendashteh et al., 2011, Domínguez, 2010 e Zhao et al., 2010, utilizaram o método do fenol-sulfúrico na quantificação de carboidratos em *fouling* de membranas; utilizando diretamente a curva padrão na quantificação. Para verificar se as diferenças observadas de quantidade de glicose nas camadas de *fouling* eram reais ou artefatos de interferência analítica, as amostras de material removido das membranas foram fortificadas com quantidades variáveis de glicose. Todos os experimentos de fortificação resultaram em resposta linear da absorbância com relação à quantidade de glicose adicionada (Figura 28), demonstrando que apesar da diferença entre as matrizes, a reação química do teste continua sendo proporcional à quantidade de glicose nestas amostras.

O segundo aspecto importante que deve ser analisado é se a proporcionalidade entre a absorbância medida e a quantidade de açúcares nas amostras foi igual para a curva de calibração, com a matriz água milli-Q, e os extratos de membrana. Esta análise é conduzida através da comparação da inclinação das retas de calibração nas duas matrizes. O coeficiente

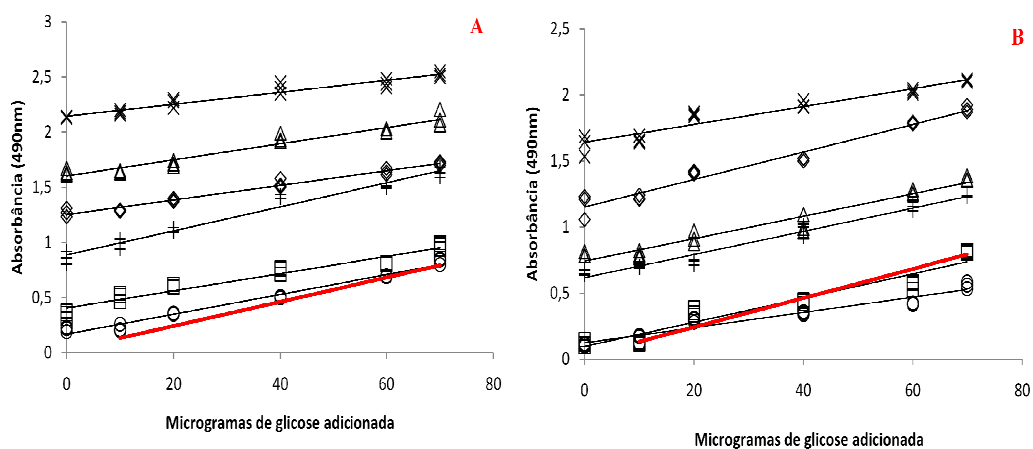
angular das retas de calibração das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6, que foram homogeneizadas com esferas de vidro, variaram 45,5%, 36,7%, 36,7%, 54,6%, 9% e 18% com relação ao coeficiente da reta padrão (Tabela 4); já os coeficientes angulares das amostras que não foram desagregadas com esferas de vidro variaram 9%, 18%, 27%, 45,5%, 45,5% e 54,6%, respectivamente, em relação à inclinação da reta padrão (Tabela 5). Estes resultados demonstram que a curva-padrão construída com D-glicose dissolvida em água Milli-Q não pode ser empregada como referência para a quantificação de açúcares nas amostras de biofilme analisadas. Nestas análises, é necessário sempre construir a curva de calibração específica da amostra, fortificando-se a mesma e, posteriormente determinar a concentração de açúcares pelo método descrito a seguir. A presença de alguns íons como  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{Fe}^{+3}$  pode causar interferência no método do fenol-sulfúrico (MARTENS, 1993). É comum autores desconsiderarem este aspecto importante na quantificação de açúcares em amostras de biofilme (ZHANG,2007).

**Tabela 4- Coeficiente angular das fortificações das amostras.**

Amostras	Coeficiente
Homogeneizadas	Angular
1	0,01
2	0,009
3	0,009
4	0,01
5	0,02
6	0,018

**Tabela 5 - Coeficiente angular das fortificações das amostras.**

Amostras não Homogeneizadas	Coefficiente Angular
1	0,02
2	0,018
3	0,016
4	0,01
5	0,01
6	0,008



**Figura 28:** Absorbância das amostras com desagregação (A) e sem desagregação (B) fortificadas com quantidades variáveis de glicose (10, 20, 40, 60 e 70 $\mu$ g). Em (A) temos: amostra 1 ( $\diamond$   $R^2 = 0,974$ ), amostra 2 ( $\square$   $R^2 = 0,939$ ), amostra 3 ( $\triangle$   $R^2 = 0,942$ ), amostra 4 ( $\times$   $R^2 = 0,939$ ), amostra 5 ( $+$   $R^2 = 0,966$ ) e amostra 6 ( $\circ$   $R^2 = 0,979$ ). Em (B) temos as mesmas amostras, porém homogeneizadas; apresentando  $R^2$  igual a: 0,981; 0,949; 0,970; 0,942; 0,975 e 0,942 respectivamente. A linha vermelha em ambos é a curva padrão.

#### 4.3.4 *Quantificação de açúcares em amostras que apresentaram uma inclinação da reta de fortificação diferente da reta padrão*

A fortificação de carboidratos foi feita de modo semelhante à quantificação de proteínas descritas no item 4.2.4.

#### 4.3.5 *Comparação das concentrações de glicose com e sem a utilização da curva padrão*

A tabela 6 compara as concentrações de glicose das amostras de membranas homogeneizadas com esferas de vidro utilizando os valores das absorvâncias das amostras diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão, ou seja, utilizando o procedimento descrito no item 4.3.3.

**Tabela 6- Comparação das concentrações de glicose nas amostras utilizando as absorvâncias obtidas diretamente na curva padrão e sem utilizar a curva padrão.**

Amostras de membranas homogeneizadas	Média das absorvâncias das amostras	[ ] de glicose utilizando diretamente a curva padrão (µg/ml)	[ ] de glicose utilizando a fortificação (µg/ml)
1	1,27	63,5	104,2
2	0,35	17,5	29
3	1,64	82	114,3
4	2,13	106,5	214,2
5	0,86	43	44,35
6	0,21	9,5	9,4

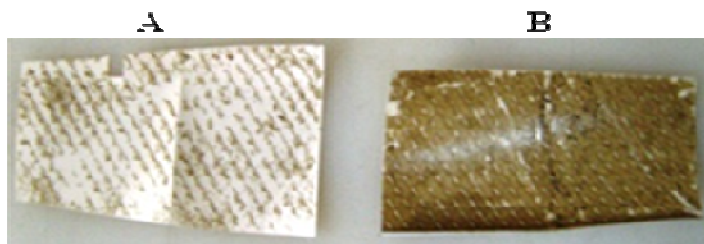
## 4.4 Remoção do fouling em membranas de osmose reversa

### 4.4.1 Remoção do fouling formado sob condições reais de operação

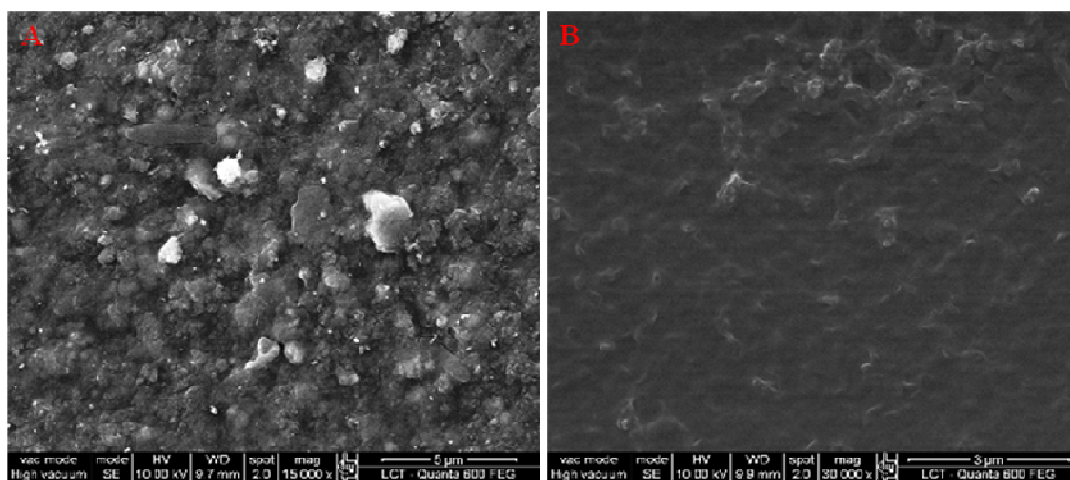
#### 4.4.1.1 Remoção por raspagem

Visualmente, a raspagem permitiu a remoção de uma grande quantidade de material aderido sobre a superfície das amostras de membrana (Figura 29). Micrografias de

microscopia eletrônica de varredura da superfície da membrana antes e depois da raspagem revelaram a redução significativa do material aderido, mas permanência de um filme fino de material de aparência homogênea na membrana (Figura 30)



**Figura 29:** Amostras de membrana após a raspagem do material aderido utilizando espátula (A) e amostra de membrana colmatada (B). Essas amostras não são as utilizadas no experimento, mas fazem parte do mesmo elemento de membrana.



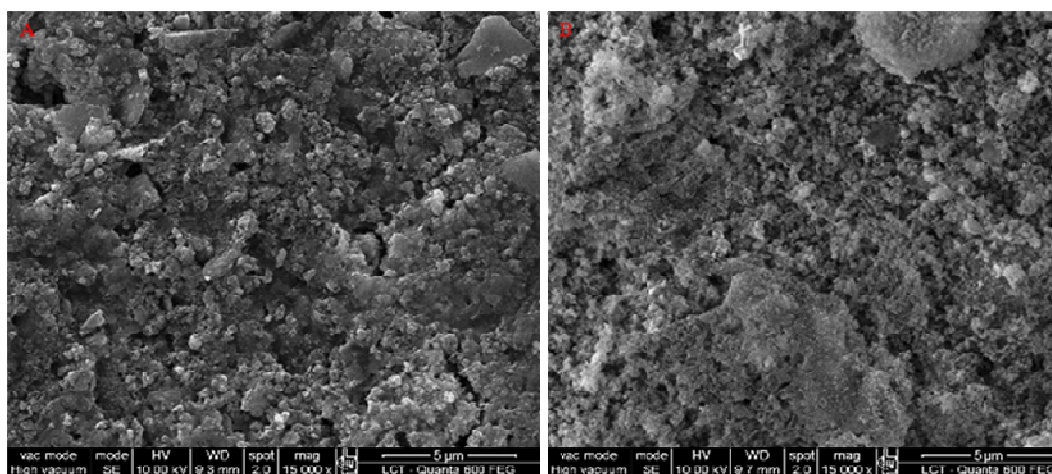
**Figura 30:** Micrografia da amostra de membrana antes da remoção do *fouling* por raspagem (A) e após a remoção do *fouling* por raspagem (B). Após a raspagem houve uma grande remoção do material aderido à membrana, não sendo observado microrganismos nem fragmentos observados em (A).

#### 4.4.1.2 Remoção por sonicação

O método de sonicação, visualmente, não se mostrou eficaz para a remoção do material aderido sobre a superfície das amostras de membrana (Figuras 31 e 32).



**Figura 31:** Amostra de membrana após a sonicação (A) e amostra de membrana colmatada (B). Visualmente, o método de sonicação retirou apenas uma camada superficial do material depositado sobre a amostra. Essas amostras não são as mesmas do experimento, porém, são do mesmo elemento de membrana.

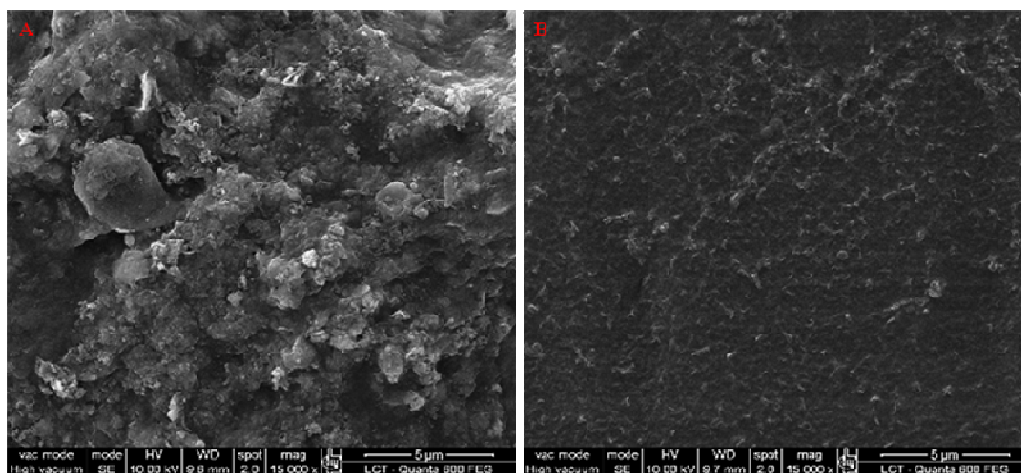


**Figura 32:** Micrografia de uma amostra de membrana antes da sonicação (A) e após a sonicação (B). Não houve uma grande alteração visual da remoção da camada de *fouling* da amostra utilizando o sonicador.

#### 4.4.1.3 Remoção por trituração

O método de remoção por trituração, visualmente, foi o mais eficaz dos procedimentos analisados (Figura 33). Devido à alta fragmentação das amostras por este método, não foi possível obter fotos mostrando a eficiência de remoção do método.





**Figura 33:** Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa antes da trituração (A) e após a trituração (B). Foi observado uma grande remoção de material da superfície da membrana através da trituração.

#### 4.4.2 *Cultivo de biofilmes em amostras de osmose reversa limpa*

Devido à dificuldade de se obter amostras de membranas de osmose reversa do mesmo lote das do item 4.4.1, um elemento de osmose novo foi utilizado para obter amostras para o crescimento de biofilmes, permitindo a coleta de dados quantitativos de remoção de depósitos sobre a membrana.

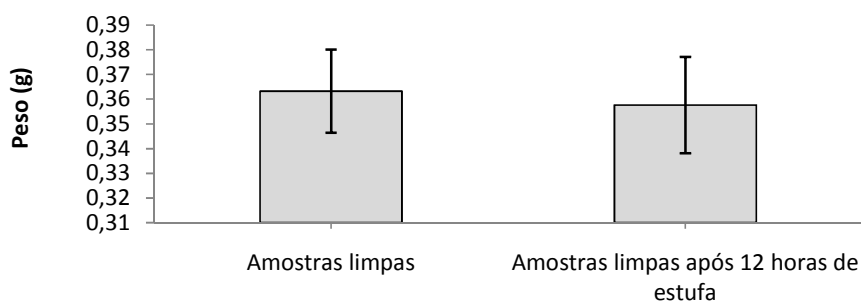
Após três meses submersas, observou-se uma grande quantidade de material aderido nas superfícies das amostras de membranas de osmose limpas expostas à água da raia (Figura 34).



**Figura 34:** Amostras de membrana de osmose reversa depois de três meses submersas em um tanque contendo água da raia. Grande quantidade de depósitos sobre as membranas (*fouling*).

#### 4.4.2.1 Amostras de membranas limpas

As dez amostras de membrana limpas foram pesadas antes da estufa e depois de 12 horas de estufa à 70 °C. Os resultados da figura 35 mostraram que amostras de membrana de osmose reversa limpa com área de 33,6 cm<sup>2</sup> (modelo No: RE-70-1812) possuem um peso de aproximadamente 0,36 g. Após 12 horas de estufa, não ocorreu variação do peso. Este procedimento foi realizado devido a possíveis perdas de água pela membrana podendo interferir nos resultados de remoção.



**Figura 35:** Peso de dez amostras de membranas limpas com área de 33,6 cm<sup>2</sup> antes da estufa e depois de 12 horas na estufa à 70 °C. A média do peso das amostras antes da estufa foi de 0,363 g e depois da estufa 0,357 g. Esta diferença não é estatisticamente significativa. Os desvios-padrão foram: 0,016 e 0,019 respectivamente.

#### 4.4.2.2 Análise de remoção do *fouling* das amostras de membranas

As trinta amostras de membrana, após serem retiradas do tanque e levadas para o laboratório, foram divididas da seguinte forma: dez amostras para a realização do teste de remoção do *fouling* utilizando raspagem, dez amostras para a realização do teste de remoção do *fouling* utilizando sonicação e dez amostras utilizando a trituração como método de remoção. Em todas as amostras não houve contaminação da face da membrana exposta ao permeado (Figura 36). Após a verificação da região do permeado, a região com depósitos (33,6 cm<sup>2</sup>) foi isolada de cada amostra para análises de remoção do *fouling* (Figura 37).



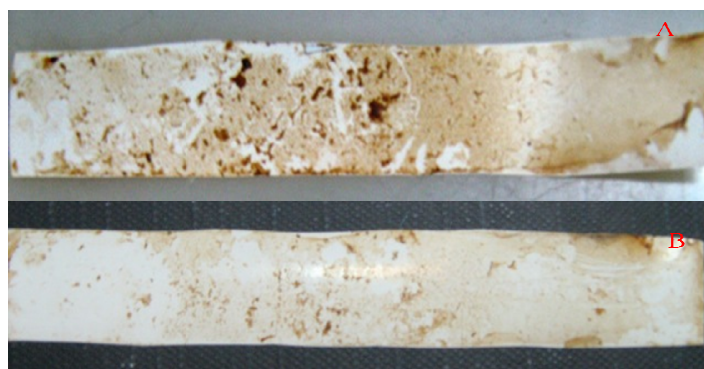
**Figura 36:** Região do permeado de uma das amostras de membrana após três meses submersas em um tanque contendo água da raia da USP. Não foi observado crescimento de biofilmes nesta região, mostrando que o isolamento desta área funcionou corretamente.



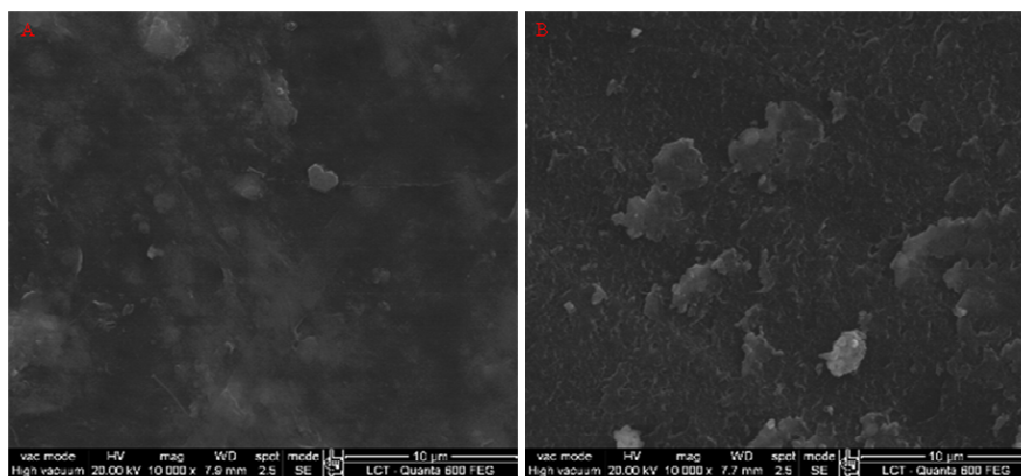
**Figura 37:** Isolamento da região de uma das amostras de membrana onde ocorreu a formação de depósitos com área de 33,6 cm<sup>2</sup>.

#### 4.4.2.3 Remoção do *fouling* das amostras de membranas: raspagem

Para a validação deste método de remoção do *fouling* em membranas de osmose reversa foram utilizadas dez amostras de membrana com *fouling* em suas superfícies. A raspagem foi feita utilizando movimentos leves (sem danificar a membrana), utilizando uma espátula (Figura 38). Todas as membranas foram pesadas antes da raspagem, após a raspagem e, finalizando, após estufa por doze horas à 70 °C. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para uma observação mais detalhada da remoção do material aderido nas amostras de membrana (Figura 39).

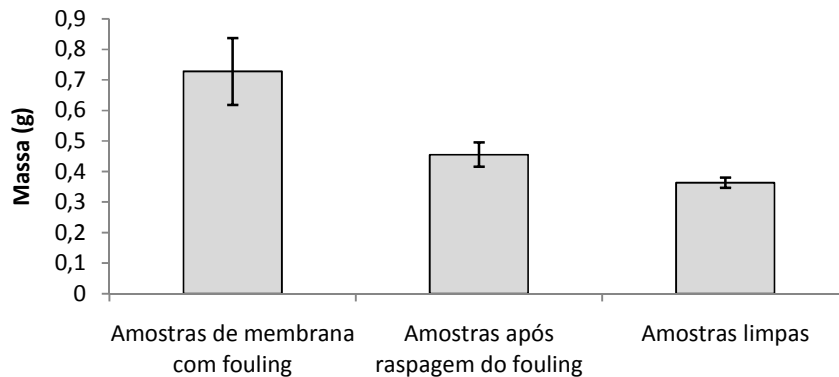


**Figura 38:** Amostra de membrana antes da raspagem (A) e depois da raspagem (B).



**Figura 39:** Micrografia da amostra de membrana antes da remoção do fouling por raspagem (A) e após a remoção do fouling por raspagem (B). Após a raspagem houve uma grande remoção do material aderido à membrana.

Não houve remoção total do depósito sobre a membrana após a raspagem (Figura 39). Comparando-se os pesos obtidos antes e depois da raspagem das amostras e com as amostras limpas, verificou-se que uma pequena quantidade de depósito permaneceu sobre as membranas e que o método remove, na média, 79% do depósito (Figura 40).



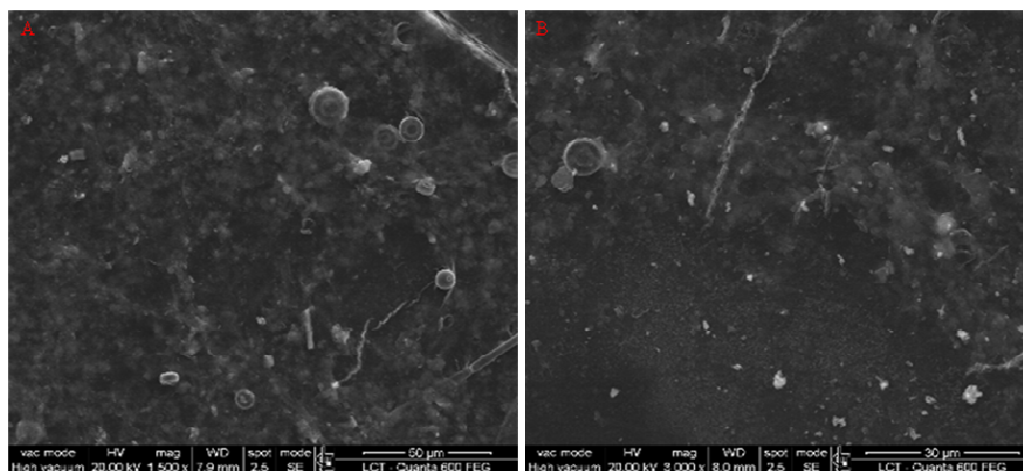
**Figura 40:** Resultados obtidos através da raspagem da superfície das amostras de membranas. Os desvios-padrão foram: 0,11; 0,04 e 0,016 respectivamente.

#### 4.4.2.4 Remoção do fouling das amostras de membranas: sonicação

Para a validação deste método de remoção do *fouling* em membranas de osmose reversa dez amostras foram sonicadas por dez minutos cada na potência máxima (Figura 41). A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para uma observação mais detalhada da remoção do material aderido nas amostras de membrana (Figura 42).

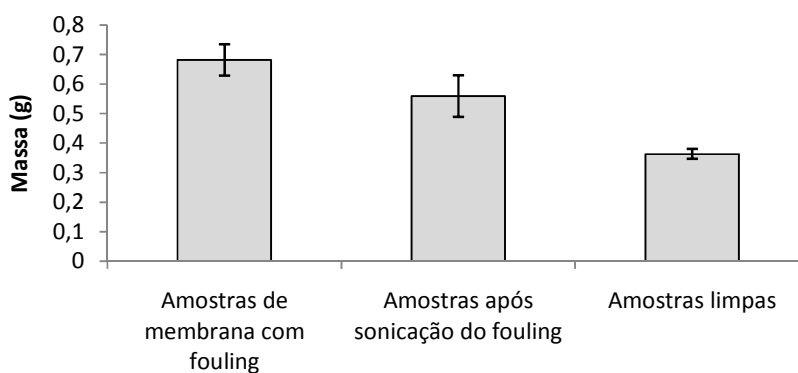


**Figura 41:** Uma das amostras de membrana antes da sonicação (A) e depois da sonicação por 5 minutos (B).



**Figura 42:** Micrografia de uma amostra de membrana antes da sonicação (A) e após a sonicação (B). Não houve uma grande alteração visual da remoção da camada de *fouling* da amostra utilizando o sonicador.

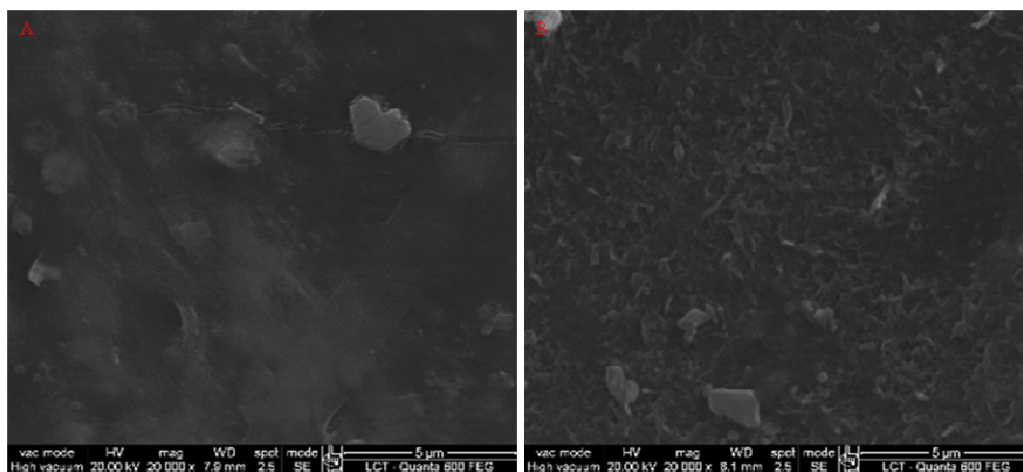
As micrografias obtidas das amostras de membranas mostraram que a sonicação não é um bom método para a remoção do material aderido sobre as membranas, pois praticamente, não houve remoção de depósito após a utilização desta técnica. A análise da figura 43 mostrou que a remoção do *fouling* por sonicação é muito baixa (menos de 32%).



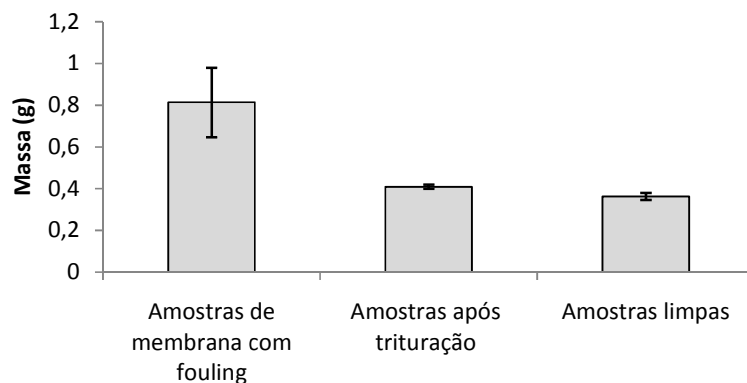
**Figura 43:** Remoção do *fouling* em amostras de membranas de osmose reversa utilizando sonicação por 5 minutos na potência máxima. Os desvios-padrão foram: 0,053; 0,07 e 0,016 respectivamente.

#### 4.4.2.5 Remoção do fouling das amostras de membranas: trituração

A micrografia eletrônica mostrou que através da trituração das amostras de membranas, grande parte do material aderido foi removido (Figura 44). A comparação dos pesos das amostras de membrana antes e depois da trituração e com as amostras limpas, mostraram que praticamente todo o material aderido na superfície das membranas foi removido, cerca de 95% (Figura 45).



**Figura 44:** Micrografia de uma amostra de membrana de osmose reversa antes da trituração (A) e após a trituração (B). Foi observado uma grande remoção de material da superfície da membrana através da trituração.



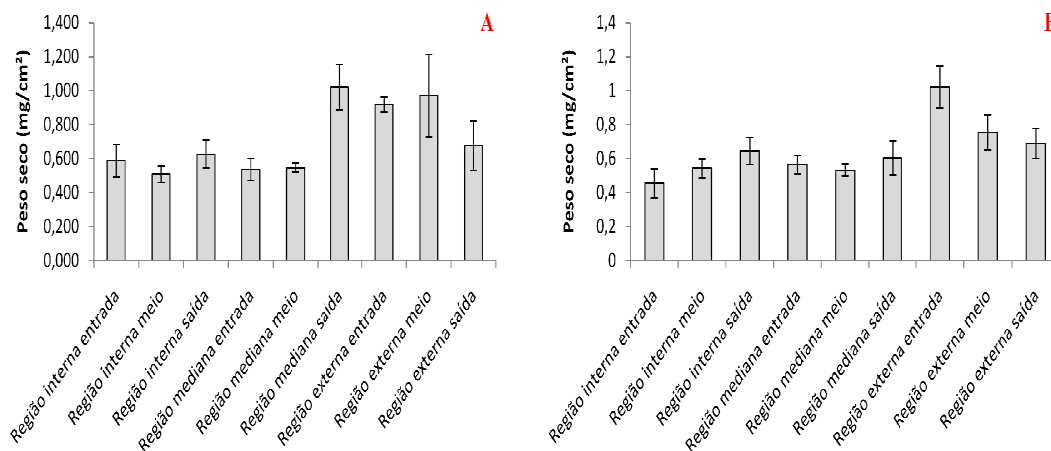
**Figura 45:** Resultados da remoção do *fouling* em 10 amostras de membrana utilizando a trituração como método de remoção. Os desvios-padrão foram: 0,16; 0,01 e 0,016 respectivamente.

Apesar da trituração parecer ser o método mais eficaz de remoção do *fouling* na superfície das membranas, estatisticamente, não foi observado diferença significativa entre os métodos de raspagem e trituração.

Hijnen (2011) e Álvarez et al. (2010) utilizaram a sonicação de amostras de membranas em espiral para analisar o *fouling* das mesmas; Pendashteh et al. (2011) raspou o *fouling* de membranas utilizadas em biorreatores para posterior análise.

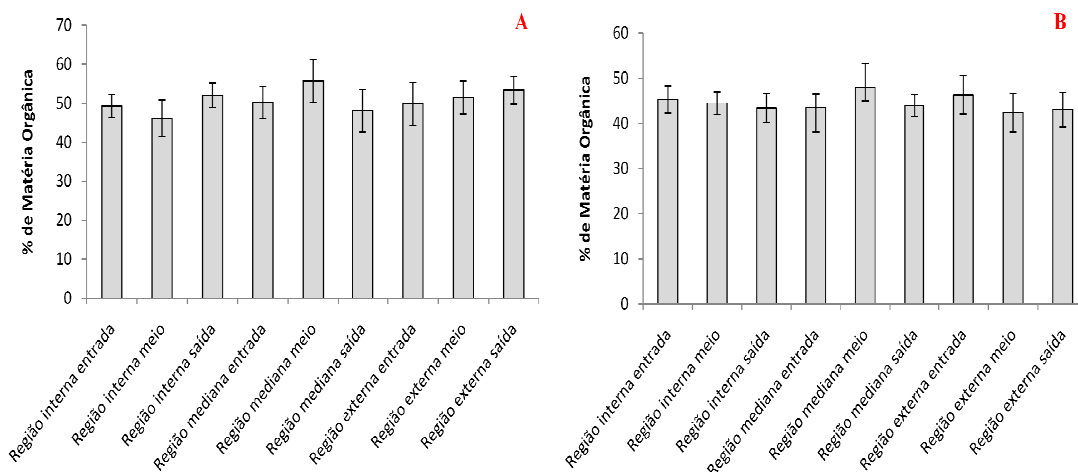
#### 4.4.3 Autópsia de membranas

A autópsia dos dois elementos de osmose reversa foi baseada nos seguintes parâmetros: peso seco, % de matéria orgânica em relação ao peso seco, % de proteína em relação ao peso seco, % de glicose em relação ao peso seco, UFC/cm<sup>2</sup> e células/cm<sup>2</sup>. As figuras 46-51 mostram os resultados obtidos na autópsia.

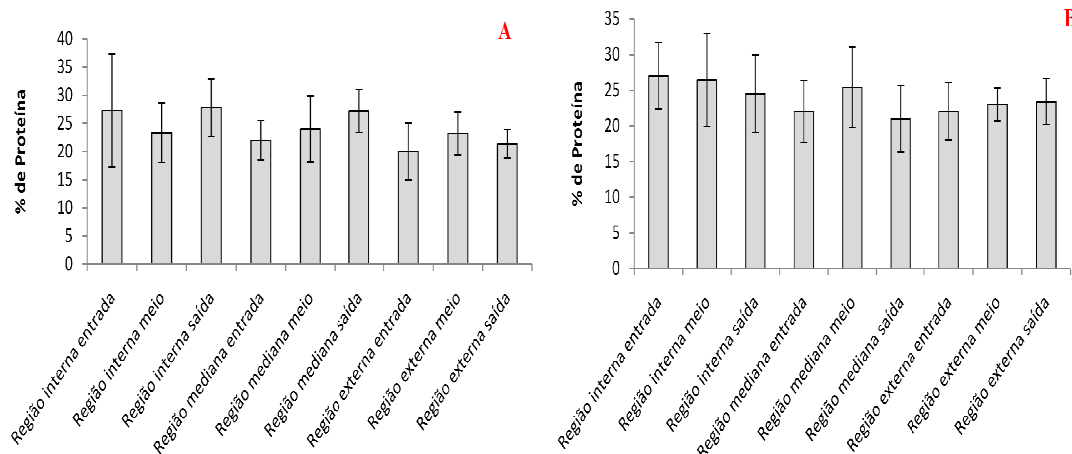


**Figura 46:** Peso seco das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.

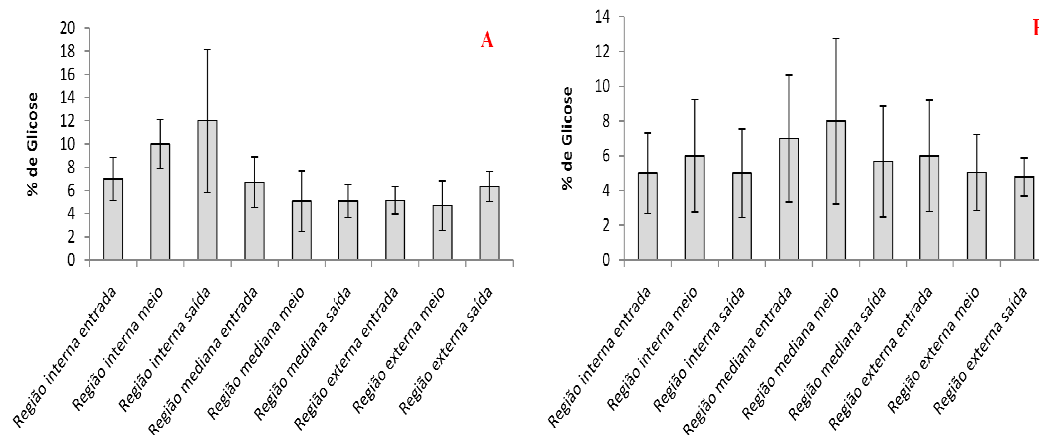




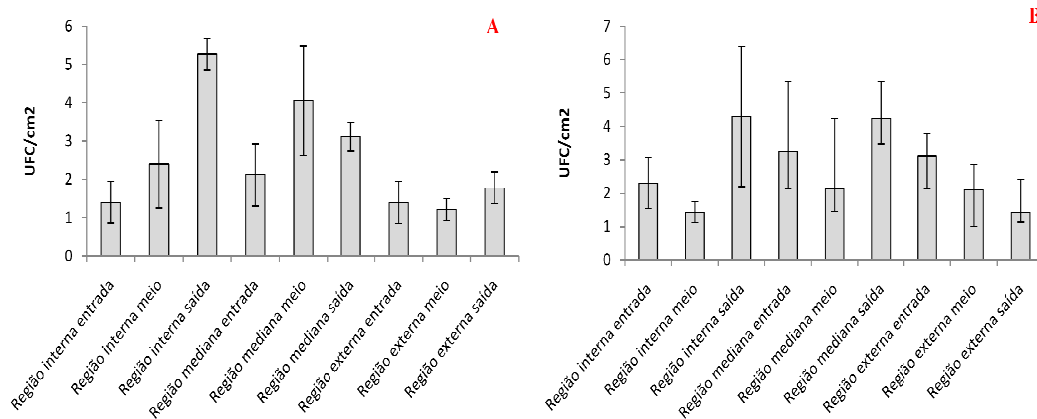
**Figura 47:** % de matéria orgânica das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.



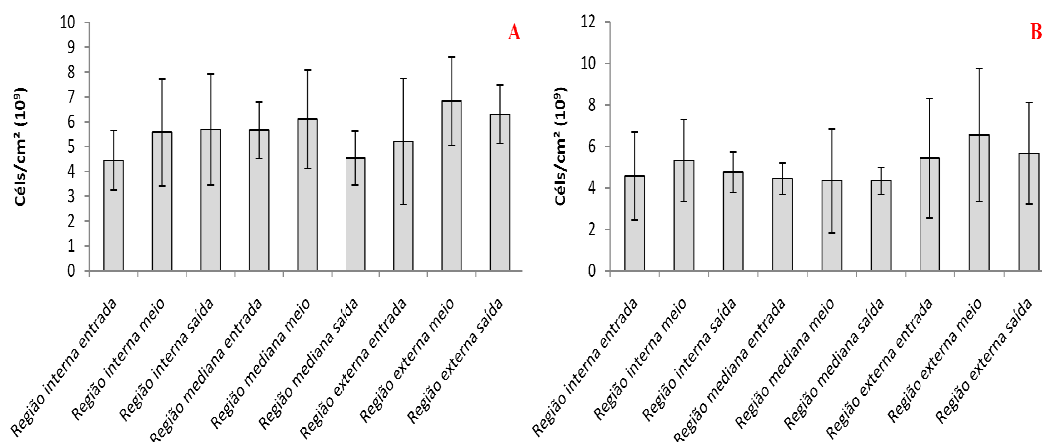
**Figura 48:** % de proteínas das amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.



**Figura 49:** % de glicose nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.



**Figura 50:** Unidades formadoras de colônia por área de membrana nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.



**Figura 51:** Número de células por área de membrana nas amostras obtidas da entrada da alimentação, meio e saída do concentrado nas regiões interna (mais próxima do coletor de permeado), mediana e externa (mais afastada do coletor de permeado) dos dois elementos de osmose reversa. Os resultados do elemento 1 estão representados em (A); e em (B), os resultados do elemento 2.

Estatisticamente, não foi observado variação de nenhum parâmetro analisado entre as diferentes amostras nas diferentes regiões dos dois elementos; concluindo que a formação de biofilmes na superfície das membranas analisadas ocorreram de forma homogênea nos dois elementos.

Vrouwenvelder (2001), analisando diferentes elementos de osmose reversa, mostrou que o maior número de células era verificado na região de entrada da alimentação e espaçador de alimentação.

## 5 CONCLUSÃO

Após a realização dos experimentos concluiu-se que a presença de alguns sais, principalmente o cloreto de amônio, pode resultar em resultados incorretos sobre a quantificação de matéria orgânica presente em amostras de membranas de osmose reversa colmatadas, resultando em um valor maior do que realmente a amostra possui. Outro dado importante, refere-se à quantificação de proteínas e açúcares nestas amostras. A utilização da curva padrão para a quantificação direta destes compostos nas amostras é ineficaz, devido à presença de outros compostos (inorgânicos e orgânicos) na amostras, o que pode causar algum tipo de interferência. Utilizando a fortificação das amostras de membranas, estas apresentaram um coeficiente angular diferente do obtido pela curva padrão das proteínas e dos carboidratos, comprovando que a utilização da curva padrão neste tipo de amostra é ineficaz. Outros resultados importantes foram a quantificação de remoção de depósitos em amostras de membranas de osmose reversa, no qual a trituração e a raspagem se mostraram mais eficaz que a sonicação; e a distribuição do biofilme em elementos de membrana, que apesar de poucos elementos analisados, estes mostraram uma distribuição homogênea nos envelopes de membranas.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AMELUNG, W.; CHESHIRE, M. V.; GUGGENBERGER, G. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1631-1639, 1996.
- BACCHIN, P.; AIMAR, P.; SANCHEZ, V. Model for colloidal fouling of membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 41, n. 1, p. 368-376, 1995.
- BAKER, R. Membrane and Module Preparation. **Membrane Separation Systems**, v. 2, n. 2, p. 119-123, 1990.
- BAKER, J. S.; DUDLEY, L. Y. Biofouling in membrane systems - a review. **Desalination**, v. 118, n. 1-3, p. 81-90, 1998.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, p. 48-254, 1976.
- BRAUN, G.; HATER, W.; KOLK, C.; DUPOIRON, C.; HARRER, T.; GÖTZ, T. Investigations of silica scaling on reverse osmosis membranes. **Desalination**, v. 250, p. 982-984, 2010.
- BRYERS, J. D. **Biofilms II: Process analysis and applications**. New York: John Wiley and Sons, 2000. ISBN 0-471-29656-2.
- BODDEKER, K. W. Commentary: Tracing membrane science. The early history of membrane science selected papers celebrating. **Journal of Membrane Science**, v. 100, n. 1, p. 65-68, 1995.
- BUFFLE, J.; LEPPARD G. G.; Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material. **Environ. Sci. Technol.**, v. 29, p. 2169, 1995.
- CADOTTE, J.; KING, R.; MAJERLE, R.; PETERSEN, R. Interfacial Synthesis in the Preparation of Reverse Osmosis Membranes. **Journal of Macromolecular Science-Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 727, 1981.
- CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. G. **Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach**. Toronto: Ed. John Wiley & Sons, 1990.
- DARTON, T.; ANNUNZIATA, U.; DEL VIGO PISANO, F.; GALLEGRO, S. Membrane autopsy helps to provide solutions to operational problems. **Desalination**, v. 167, n. 1-3, p. 239-245, 2004.
- DOMÍNGUEZ, L.; RODRÍGUEZ, M.; PRATS, D. Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: Influence of extraction methods over three dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. **Desalination**, v. 261, p. 19-26, 2010.

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids. 2001. p. 1-13. Disponível em: <<http://water.EPA.gov/scitech/methods>>. Acesso em: 15 Dec. 2010.

ERDEX, L.; GAL, S.; LIPTAY, G. **Thermoanalytical properties of analytical-grade reagents**. Talanta: Ed. Pergamon Press, 1964.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) — Part I: structural and ecological aspects. **Water Sci. Tech.**, v. 32, p. 1–8, 2001.

FLEMMING, H. C. Reverse Osmosis Membrane Biofouling. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 14, n. 4, p. 382-391, 1997.

FLEMMING, H. C.; SCHAULE, G. Biofouling of Membranes - A Microbiological Approach. **Desalination**, v. 70, n. 2, p. 95-119, 1988.

GAMAL KHEDR, M. Membrane fouling problems in reverse osmosis desalination applications. **Desalination and Water Reuse**, v. 10, n. 3, p. 8-17, 2000.

GLATER, J. The early history of reverse osmosis membrane development. **Desalination**, v. 117, n. 1-3, p. 297-309, 1998.

GOOSEN, M. F. A.; AL-HINAI, H.; SABLANI, S. Capacity-building strategies for desalination: activities, facilities and educational programs in Oman. **Desalination**, v. 141, n. 2, p. 181-189, 2001.

HIJNEN, W. A. M.; CORNELISSEN, E. R.; KOOIJ D. V. Threshold concentrations of biomass and iron for pressure drop increase in spiral-wound membrane elements. **Water Research**, v. 45, p. 1607-1616, 2011.

KARIME, M.; BOUGUECHA, S.; HAMROUNI, B. RO membrane autopsy of Zarzis brackish water desalination plant. **Desalination**, v. 220, n. 1-3, p. 258-266, 2008.

KRUGER, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: WALKER, J. M. **The proteins protocols handbook**. Totowa: Humana press, 2002. Cap. 4. p. 15-21.

LI, K. Membrane Science and Membrane Separation Processes. **Journal of Membrane Science**, v. 52, n. 2, p. 205-219, 1990.

LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. Sea Water Demineralization by Means of a Semi permeable Membrane. **Sea Water Research**, v. 2, n. 1, p. 60, 1960.

LONSDALE, H. K. The growth of membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 10, n. 2-3, p. 81-181, 1982.

LONSDALE, H. The Evolution of Ultrathin Synthetic Membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 33, n. 1, p. 121, 1987.

MALLEVIALLE, J.; ODENDAAL, P. E.; WIESNER, M. R. **Water Treatment Membrane Processes**. New York: Ed. McGraw-Hill, 1996.

MARTENS, D. A.; FRANKENBERGER JR., W. T. Soil saccharide extraction and detection. **Plant and Soil**, v. 149, n. 1, p. 145-147, 1993.

MARTINEZ, F. O.; LEMA, J.; MENDEZ, R.; CUERVO-LOPEZ, F. Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 1, p. 43-48, 2004.

MITTELMAN, M. C. **Bacterial Growth and Biofouling Control in Purified Water Systems**. Heidelberg: Ed. Springer, 1991.

NYSTROM, M.; RUOHOMAKI, K.; KAIPA, L. Humic acid as a fouling agent in filtration. **Desalination**, v. 106, n. 1-3, p. 78-86, 1996.

PAUL, D. H. Reverse osmosis: scaling, fouling & chemical attack. **Desalination and Water Reuse**, v. 1, n. 2, p. 8-11, 1991.

PENDASHTEH, A. R.; FAKHRU'L-RAZI, A.; MADAENI, S. S.; ABDULLAH, L. C.; ABIDIN, Z. Z.; AWANGBIK, D. R. Membrane foulants characterization in a membrane bioreactor (MBR) treating hypersaline oily wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 57, p. 34-37, 2011.

PONTIÉ, M.; RAPENNE, S.; THEKKEDATH, A.; DUCHESNE, J.; LEPARC, J.; SUTY, H. Tools for membrane autopsies and antifouling strategies in seawater feeds: a review. **Desalination**, v. 181, p. 75-90, 2005.

RAHIMPOUR, A.; MADAENI, S. S.; MANSOURPANAH, Y. Nano-porous polyethersulfone (PES) membranes modified by acrylic acid (AA) and 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) as additives in the gelation media. **Journal of Membrane Science**, v. 364, p. 380-388, 2010.

REID, C. E.; BRETON, E. J. Water and ion flow across cellulosic membranes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 1, n. 2, p. 133-143, 1959.

RIDGWAY, H. F.; FLEMMING, H. F. **Membrane biofouling**. New York: Ed. McGraw-Hill, 1996.

SABLANI, S. S.; GOOSENA, M. F. A.; AL-BELUSHI, R.; WILF, M. Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review. **Desalination**, v. 141, n. 2, p. 269-289, 2001.

SAHACHAIYUNTA, P.; KOO, T.; SHEIKHOESLAMI, R. Effect of several inorganic species on silica fouling in RO membranes. **Desalination**, v. 144, n. 1-3, p. 373-378, 2002.

SCHNEIDER, R. P.; FERREIRA, L. M.; BINDER, P.; BEJARANO, E. M.; GOES, K. P.; SLONGO, E.; MACHADO, C. R.; ROSA, G. M. Z. Dynamics of organic carbon and of bacterial populations in a conventional pretreatment train of a reverse osmosis unit experiencing severe biofouling. **Journal of Membrane Science**, v. 266, n. 1-2, p. 18-29, 2005.

SCHNEIDER, R. P.; TSUTIYA, M. T. **Membranas filtrantes para o tratamento de água, esgoto e água de reuso**. Edição. São Paulo: ABES, 2001. 234 p.

SCHWINGE, J.; NEAL, P. R.; WILEY, D. R.; FLETCHER, D. F.; FANE, A. G. Spiral wound modules and spacers Review and analysis. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p. 129-153, 2004.

SPEIGHT, J. G. Lange's handbook of chemistry. 16th ed. Toronto: McGraw-Hill, 2004. 2432 p.

TANG, C. Y.; LECKIE, J. O. Membrane independent limiting flux for RO and NF membranes fouled by humic acid. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 4767-4773, 2007.

TASAKA, K.; KATSURA, T.; IWAHORI, H.; KAMIYAMA, Y. Analysis of RO elements operated at more than 80 plants in Japan. **Desalination**, v. 96, n. 1-3, p. 259-272, 1994.

TRAUBE, M. Physiologie und Wissenschaftliche Medicin. In: REISCHERT, T.; DUBOIS-REYNOLDS, R. (Ed.). **Archiv fur Anatomie**. Leipzig, 1867.

VROUWENVELDER, J. S.; VAN DER KOOIJ, D. Diagnosis, prediction and prevention of biofouling of NF and RO membranes. **Desalination**, v. 139, n. 1-3, p. 65-71, 2001.

WANG, X. M.; WAITE, T. D. Role of Gelling Soluble and Colloidal Microbial Products in Membrane Fouling. **Environ. Sci. Technol**, v. 43, p. 9341-9347, 2009.

WINGENDER, J.; NEU, T.R.; FLEMMING, H.C. **Microbial extracellular polymeric substances**: characterization, structure, and function. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. ISBN 3-540- 65720-7.

ZHANG, P.; ZHANG, G.; WANG, W. Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 207-210, 2007.



ZHAO, Y.; SONG, L.; ONG, S. L. Fouling behavior and foulant characteristics of reverse osmosis membranes for treated secondary effluent reclamation. **Journal of Membrane Science**, v. 349, p. 65-74, 2010.