

## FUNÇÕES SIGMOIDAIS APLICADAS NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA - AME

Helenice de Oliveira FLORENTINO<sup>1</sup>  
Adriana de Fátima Vilela BISCARO<sup>2</sup>  
José Raimundo de Souza PASSOS<sup>1</sup>

- RESUMO: O sucesso de um processo anaeróbio em reatores, depende fundamentalmente da manutenção de uma biomassa com elevada atividade microbiológica e resistente a choques. Para que essa biomassa possa ser preservada e monitorada, foram desenvolvidas técnicas para a avaliação da atividade microbiana, como por exemplo, o teste da Atividade Metanogênica Específica (AME), cujo propósito consiste em avaliar a capacidade das bactérias metanogênicas em converter substrato orgânico em metano e gás carbônico. O objetivo deste trabalho, para auxiliar o teste da AME, é determinar a taxa máxima de variação de produção de metano através da estimativa do ponto de inflexão de modelos de regressão não-linear ajustados aos dados observados, pelo método dos mínimos quadrados.
- PALAVRAS-CHAVE: Digestão anaeróbia; modelagem matemática; potencial da biomassa.

### 1 Introdução

A digestão anaeróbia é um processo biológico natural que ocorre na ausência de oxigênio molecular. Neste processo, as populações bacterianas interagem para promover a fermentação estável e auto-regulada da matéria orgânica, em que resulta o biogás - constituído, na maior parte, de metano e dióxido de carbono. As relações entre os diversos grupos de microorganismos envolvidos na digestão anaeróbia são muito complexas e, portanto, avaliações mais profundas deste processo em geral são caras e sofisticadas e muitas vezes consomem um tempo de ensaio muito grande.

A busca de um parâmetro que pudesse fornecer informações a respeito da biomassa ativa metanogênica de lodos anaeróbios, levou a proposição de um teste para avaliar a Atividade Metanogênica Específica - AME (Bertolino et al. (2008), Aquino et al. (2007), Penna (1994) e Soto et al. (1993), ).

A avaliação da AME é feita por meio de um ensaio em laboratório e consiste em avaliar a capacidade das bactérias metanogênicas em converter substrato orgânico em biogás, medindo a taxa máxima de conversão de substratos específicos em metano por unidade de biomassa.

---

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Bioestatística, Caixa Postal 510, CEP: 18618-000, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: [helenice@ibb.unesp.br](mailto:helenice@ibb.unesp.br) / [jrpastos@ibb.unesp.br](mailto:jrpastos@ibb.unesp.br)

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura, Caixa Postal 237, CEP: 18610-307, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: [adrianafvb@hotmail.com](mailto:adrianafvb@hotmail.com)

O teste da AME, além de ser utilizado para quantificar a atividade metanogênica específica de lodos anaeróbios, também tem sido utilizado em diversas aplicações: para obtenção de informações sobre a digestão anaeróbia (Alves ET al. (2005), Aquino ET al. (2003), Mosey(1989) e De Zeeuw (1984)), para avaliação de inóculos para partida de reatores (Etchebehere et al. (2002)), para estimar porcentagem de biomassa acetoclástica em lodos anaeróbios (Valcke&Verstraete (1983)), estimar os diferentes grupos fisiológicos presentes nos lodos (Dolfing&Bloemen (1985)), avaliação de toxicidade por produtos químicos na digestão anaeróbia (Cohen (1992), Sanz et al. (1997) e Colleran et al. (1992)), investigar a distribuição da atividade bacteriológica em reatores anaeróbios (Etchebehere et al. (2002) e Soto et al. (1992)), entre outras.

Neste trabalho, propomos a utilização de modelos de regressão não-linear para determinação da AME, através da obtenção do ponto de inflexão das curvas obtidas.

## 2 Materiais e métodos

### O teste da AME

A avaliação da atividade microbiana de lodos anaeróbios é importante para caracterizar o potencial da biomassa na conversão de substratos solúveis em metano e gás carbônico. Uma maneira de caracterizar este potencial é utilizar o teste da Atividade Metanogênica Específica – AME. Este teste quantifica, por meio de um ensaio em escala de bancada de laboratório, a taxa máxima de conversão de substratos específicos em metano por unidade de biomassa presente em um lodo anaeróbio.

A literatura apresenta diferentes formas de se proceder ao desenvolvimento do teste da AME. No entanto, a precisão de várias metodologias existentes é considerada duvidosa ou demasiadamente sofisticada e cara para a reprodução em laboratório (Aquino (2008), Chernicharo (1997), Penna (1994)). Para amenizar tais problemas, foi estabelecido no âmbito da PROSAB (Programa de pesquisa em saneamento básico) um protocolo a ser seguido para realização deste teste.

Segundo Chernicharo (1997), para o teste da AME considera-se conhecida a quantidade de biomassa, expressa em gramas de Sólidos Voláteis Totais (gSVT) e de substrato, expressa em gramas de Demanda Química de Oxigênio (gDQO). Definidos os parâmetros preparatórios e seguido o protocolo do PROSAB, pode-se avaliar a produção de metano ao longo do período do teste.

O monitoramento contínuo da produção de metano nos frascos utilizados no teste possibilita a obtenção de dados que correlacionam tempo (t), em horas, e produção cumulativa de metano (PCM), em  $mL_{CH_4}$  - como representado graficamente na Figura 1.

A avaliação da AME, em  $mL_{CH_4}/gSVTh$ , é feita determinando-se a razão entre a taxa máxima de produção de metano, em  $mL_{CH_4}/h$ , e a quantidade inicial de biomassa, em gSVT, presente no frasco de reação.

A obtenção da taxa máxima de produção de metano, em  $mL_{CH_4}/h$ , pode ser feita de maneira empírica - como descrito por Penna (1994) e Chernicharo (1997). Este método tem como base a escolha, de maneira subjetiva, de pontos da porção central da referida curva típica; ajustando-se posteriormente um modelo de regressão linear a esses pontos, cuja inclinação é a estimativa da taxa máxima de produção de metano. Esta metodologia

permite que o valor da taxa máxima varie segundo a escolha que é feita do conjunto de pontos – sendo pois um método empírico.

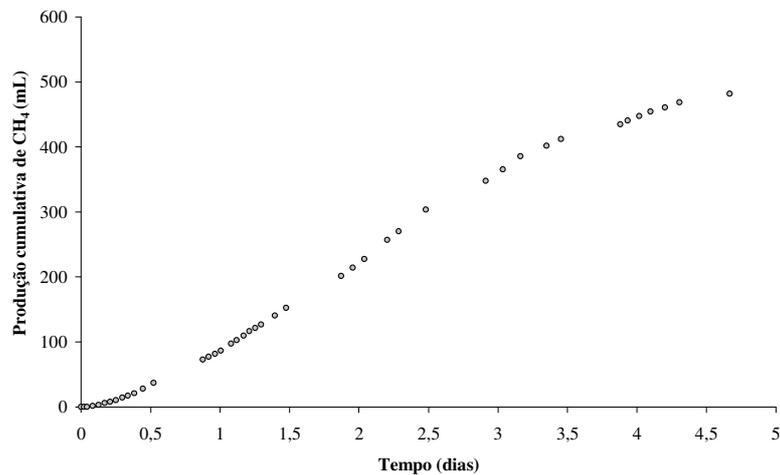


Figura 1 - Curva típica de produção cumulativa de metano (mL) na avaliação Atividade Metanogênica Específica de lodos anaeróbios (Penna (1994).

Para determinação da AME em sua unidade usual, em  $\text{gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSVTd}$ , utiliza-se a conversão de  $\text{mL}_{\text{CH}_4}$  em  $\text{gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{d}$  através das seguintes equações:

$$V_{\text{CH}_4} = \frac{\text{DQO}_{\text{CH}_4}}{K(T)} e \quad K(T) = \frac{PK}{R(273 + T)} \quad (1)$$

em que,  $V_{\text{CH}_4}$  é o volume de metano produzido, em L; T é a temperatura operacional do reator, em °C;  $K(T)$  é o fator de correção para a temperatura operacional do reator, em  $\text{gDQO}/\text{L}$ ; P é a pressão atmosférica, em atm; K é a DQO correspondente a um mol de  $\text{CH}_4$  (64  $\text{gDQO}/\text{mol}$ ); R é a constante dos gases (0,08206  $\text{atmL}/\text{mol}^\circ\text{K}$ ).

Penna (1994) desenvolveu um teste da AME de um lodo anaeróbio com 25,16  $\text{gSVT}/\text{L}$ , usando um frasco de 0,650 L, a concentração de sólidos voláteis no substrato foi de 2,47  $\text{gSTV}/\text{L}$  e a concentração de DQO testada foi 2,64  $\text{gDQO}/\text{L}$  (Tabela 1).

### Funções sigmoidais

As funções sigmoidais, em forma de “S”, podem ser usadas para descrever a produção cumulativa de metano na avaliação da Atividade Metanogênica Específica de lodos anaeróbios.

Tabela 1 - Produção cumulativa de metano (mL) na avaliação Atividade Metanogênica Específica de lodos anaeróbios (Penna (1994))

Dias	Metano acumulado (mL)	Dias	Metano acumulado (mL)	Dias	Metano acumulado (mL)
0,000	0,0	0,963	81,5	2,480	303,5
0,021	0,0	1,005	86,5	2,911	347,5
0,042	0,0	1,078	97,5	3,036	365,5
0,083	1,5	1,120	102,5	3,161	385,5
0,125	3,5	1,169	109,5	3,349	401,5
0,170	6,0	1,211	116,5	3,453	412,0
0,208	8,0	1,253	121,5	3,880	434,5
0,250	10,5	1,295	126,5	3,932	440,5
0,295	14,5	1,395	140,5	4,015	447,5
0,337	17,5	1,475	152,5	4,098	454,4
0,382	21,0	1,871	201,5	4,202	460,5
0,445	28,0	1,954	214,0	4,306	468,5
0,522	37,0	2,037	227,5	4,667	481,5
0,876	73,0	2,203	257,0		
0,918	77,0	2,286	270,0		

Fonte: Penna (1994)

Como pode ser visto na Figura 2, a função sigmóide é crescente em todo intervalo de variação do tempo. Este tipo de função não possui pontos extremos – máximos e mínimos relativos, mas possui ponto de inflexão – ponto no qual ocorre a taxa máxima de variação da função. Até o ponto de inflexão, o gráfico representativo da função sigmoidal apresenta concavidade para cima – derivada segunda positiva; no ponto de inflexão a função apresenta derivada segunda nula; e daí em diante, apresenta concavidade para baixo – derivada segunda negativa, crescendo assintoticamente, segundo a assíntota horizontal, ou seja  $f(t) = \alpha$ .

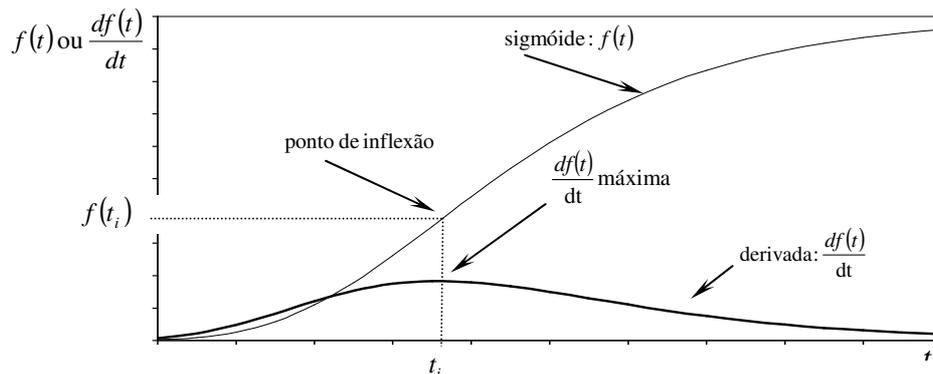


Figura 2 - Representação de uma função sigmoidal  $f(t)$ , de sua derivada  $\frac{df(t)}{dt}$  e do ponto de inflexão  $P(t_i, f(t_i))$  - ponto no qual ocorre a maior taxa de variação da função sigmoidal.

As funções sigmoidais mais comumente utilizadas são: Logística, Gompertz, Richards, Morgan-Mercer-Flodin (MMF) e a função tipo Weibull. Suas expressões matemáticas e as características de cada uma podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2 - Algumas funções sigmoidais de crescimento e suas características

Função	Expressão matemática $f(t), t \geq 0$	Restrições para os parâmetros	$f'(t) = \frac{d}{dt} f(t)$	Coordenadas do ponto de inflexão $(t, f(t))$
Logística	$\frac{\alpha}{1 + \beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha > 0, \beta > 1$ e $\gamma > 0$	$\frac{\alpha \beta \gamma e^{-\gamma t}}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^2}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta, y = \frac{\alpha}{2}$
Gompertz	$\alpha e^{-\beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha > 0, \beta > 1$ e $\gamma > 0$	$\alpha \beta \gamma e^{-\beta e^{-\gamma t}} e^{-\gamma t}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta, y = \alpha e^{-1}$
Richards	$\frac{\alpha}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^{1/\delta}}$	$\alpha > 0, \beta > \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 0$	$\frac{\alpha \beta \gamma M^{(1/\delta - 1)} e^{-\gamma t}}{\delta (M^{1/\delta})^2}$ $M = 1 + \beta e^{-\gamma t}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln(\beta/\delta),$ $y = \frac{\alpha}{(1 + \delta)^{1/\delta}}$
MMF	$\frac{\beta \gamma + \alpha t^\delta}{\gamma + t^\delta}$	$0 < \beta < \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 1$	$\frac{\delta \alpha t^{\delta-1} L - N \delta^{-\delta-1}}{L^2}$ $N = \beta \gamma + \alpha t^\delta$ $L = \gamma + t^\delta$	$t = \left( \frac{\gamma(\delta-1)}{\delta+1} \right)^{1/\delta},$ $y = \frac{\alpha(\delta-1) + \beta(\delta+1)}{2\delta}$
Weibull	$\alpha - (\alpha - \beta) e^{-\gamma t^\delta}$	$0 < \beta < \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 1$	$\gamma \delta (\alpha - \beta) e^{-\gamma t^\delta} t^{\delta-1}$	$t = \left( \frac{\delta-1}{\gamma \delta} \right)^{1/\delta},$ $y = \alpha - (\alpha - \beta) e^{\left( \frac{\delta-1}{\delta} \right)}$
Boltzman	$\frac{\delta}{1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}} + \alpha$	$\alpha > 0, \beta > 0, \gamma > 0,$ $\delta < 0$ e $\alpha > (-\delta)/(1 + e^{-\beta/\gamma})$	$\frac{-\delta e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}}{\gamma \left( 1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}} \right)^2}$	$t = \beta, y = \frac{\delta}{2} + \alpha$

### Modelo de regressão não-linear

Um modelo de regressão não linear é composto de um componente determinístico, ou matemático, simbolizado pela  $f(t; \theta)$ , que neste estudo será representados pelas funções sigmoidais descritas na Tabela 2, e por um componente aleatório, simbolizado por  $e_i$ , equação (2).

$$Y_i = f(t_i; \theta) + e_i \quad (2)$$

em que,  $i$  refere-se a  $i$ -ésima observação,  $Y_i$  são os valores da variável aleatória resposta, ou seja da produção de cumulativa de metano (mL);  $\theta$  é o vetor de parâmetros,  $t_i$  são os valores conhecidos ou pré-fixados do tempo e não correlacionados entre si e os  $e_i$  (componente aleatório) são variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas de modo que  $e_i \sim N(0, \sigma^2)$ , com  $\sigma^2$  constante.

Estudos mais detalhados deste assunto podem ser encontrados em Ratkowsky (1983), Ratkowsky (1989) e Seber&Wild (1989) entre outros.

A proposta deste trabalho, para auxiliar o teste da AME, é determinar a taxa máxima de variação de produção de metano através da estimativa do ponto de inflexão de modelos de regressão não-linear ajustados aos dados observados, pelo método dos mínimos quadrados. Para o ajuste desses modelos foi utilizada a rotina PROC NLP do programa SAS.

### 3 Resultados e discussão

A figura 3 apresenta os ajustes das citadas funções sigmoidais aos dados da tabela 1.

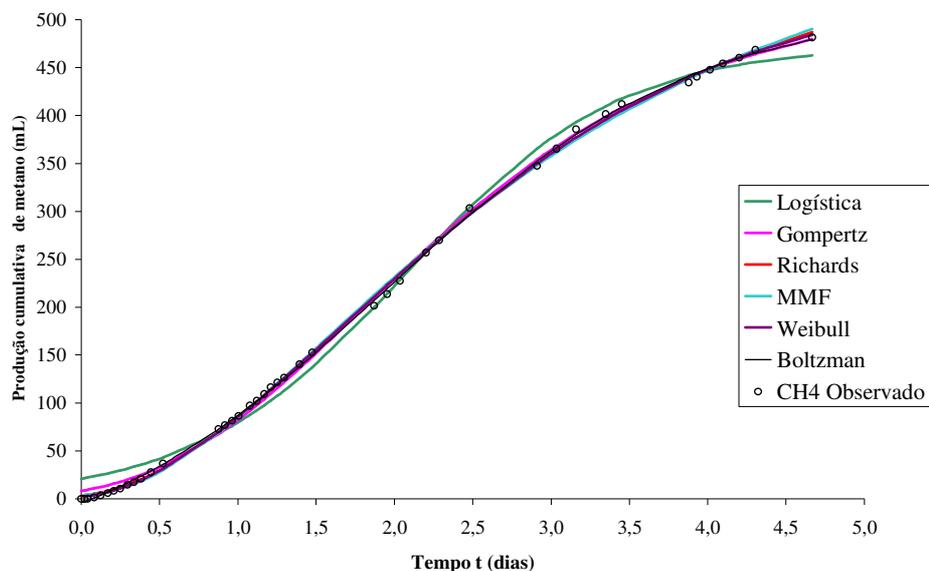


Figura 3 - Ajuste dos modelos estudados aos dados observados.

Na Tabela 3 são apresentadas, as estimativas e erros padrões aproximados para os parâmetros e soma dos quadrados dos resíduos para os modelos de regressão não-linear, ordenados segundo a soma de quadrados dos resíduos.

Tabela 3 - Parâmetros e suas estimativas e erro padrão aproximado para os parâmetros e soma dos quadrados dos resíduos para os modelos de regressão não-linear, ordenados segundo a soma de quadrados dos resíduos

Modelo	Estimativa dos parâmetros	Erro padrão aproximado	Soma de quadrados dos resíduos
Boltzman	$\hat{\alpha} = 515,70$	3,98	399,3
	$\hat{\beta} = 1,95$	0,01	
	$\hat{\gamma} = 0,99$	0,02	
	$\hat{\delta} = -593,50$	8,24	
Weibull	$\hat{\alpha} = 532,40$	7,30	577,2
	$\hat{\beta} = 2,79$	1,40	
	$\hat{\gamma} = 0,17$	0,00	
	$\hat{\delta} = 1,72$	0,03	
Richards	$\hat{\alpha} = 573,30$	11,41	745,7
	$\hat{\beta} = -0,78$	0,07	
	$\hat{\gamma} = 0,60$	0,03	
	$\hat{\delta} = -0,29$	0,05	
MMF	$\hat{\alpha} = 685,00$	20,36	960,10
	$\hat{\beta} = 4,29$	1,80	
	$\hat{\gamma} = 7,44$	0,20	
	$\hat{\delta} = 1,90$	0,05	
Gompertz	$\hat{\alpha} = 529,20$	5,91	1343,4
	$\hat{\beta} = 4,15$	0,08	
	$\hat{\gamma} = 0,80$	0,02	
Logístico	$\hat{\alpha} = 472,90$	7,32	7288,6
	$\hat{\beta} = 21,52$	1,83	
	$\hat{\gamma} = 1,47$	0,06	

Tomou-se a soma dos quadrados dos resíduos como critério de decisão na escolha do melhor ajuste. Portanto, como pode ser observado na Tabela 3, a sigmoide que melhor se ajustou aos dados foi a de Boltzman, expressa por:

$$f(t; \theta) = \frac{\delta}{1 + e^{-\frac{t-\beta}{\gamma}}} + \alpha; \theta' = [\alpha \quad \beta \quad \gamma \quad \delta]$$

em que  $\hat{\delta} = -593,50$   $\hat{\beta} = 1,95$ ;  $\hat{\gamma} = 0,99$  e  $\hat{\alpha} = 515,70$ .

O ponto de inflexão desta curva é (1,95 ; 218,95) ou seja :  $t_i=1,95$  d e  $y = 218,95\text{mL}$ . Portanto a máxima taxa de variação da produção de  $\text{CH}_4$ , é  $\frac{dy}{dt} = 149,87\text{mL}$ . Com isto pode-se estimar a AME em  $\text{mL}_{\text{CH}_4}/\text{gSVT.d}$ :

$$\text{AME} = 93,35 \text{ mL}_{\text{CH}_4} / \text{gSVT.d} .$$

Usando as equações em (1) pode-se fazer a conversão da unidade para  $\text{gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSVT.d}$ :  $0,240 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4}/\text{gSVT.d}$ .

Uma das dificuldades amplamente discutida na literatura sobre a metodologia tradicional do teste de AME, reside na escolha de quais e quantos pontos que serão utilizados no ajuste do modelo de regressão linear, para o cálculo da taxa máxima de variação de produção de metano. Deste modo, a metodologia proposta por este trabalho apresenta uma técnica objetiva, que não leva em conta critérios puramente subjetivos.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro dos órgãos: FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP), CAPES, CNPq, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 09/14901-4) e PROPe (Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP).

FLORENTINO, H. O.; BISCARO, A. F. V.; PASSOS, J. R. S. Sigmoidal functions applied in the determination of specific methanogenic activity - SMA. *Rev. Bras. Biom.*, São Paulo, v.28, n.1, p.141-150, 2010.

- *ABSTRACT* The success of any anaerobic process basically depends on maintaining, in the reactors, a biomass with elevated microbiological activity which is resistant to shocks. For this biomass to be maintained and monitored, techniques need to be developed to evaluate microbial activity. Several methods have already been developed starting with Specific Methanogenic Activity (SMA). Tests were proposed to evaluate the capacity of methanogenic bacteria to convert organic substrate into methane and carbon dioxide. However the importance of this type of test is its ability to evaluate and classify the potential of the biomass in converting soluble substrates into biogas. The objective of this study is to demonstrate the use of mathematical tools that can help SMA evaluation, using sigmoidal models. It is easy to determine inflection point in sigmoidal curves, and
- from this estimate the temperature where maximum variation rate of methane production; this facilitates SME evaluation and helps resolve imprecision problems found in traditional methods.
- *KEYWORDS*: Anaerobic digestion; mathematical model; potential of the biomass.

### Referências

ALVES, L. C.; CAMMAROTA, M. C.; FRANÇA, F. P. Inibição de lodo biológico anaeróbico por constituintes de efluentes de laboratório de controle de poluição. *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v.10, n.3, p.236-242, 2005.

AQUINO, S. F. Caracterização da DQO efluente de sistemas de tratamento biológico. *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v.8, n.3, p.135-144, 2003.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGHIA, L. O. Metodologia para determinação da atividade metanogênica (AME) em lodos anaeróbios. *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p.380-389, 2007.

BERTOLINO, S. M.; CARVALHO, C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização e biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. *Eng. Sanit. Ambient.*, Rio de Janeiro, v.13, n.3, p.271-277, 2008.

CHERNICHARO, C. A. L. *Reatores anaeróbios*. Belo Horizonte: DESA – UFMG, 1997. 246p.

COHEN, A. Effects of some industrial chemicals on anaerobic activity measured by sequential automated methanometry. *Water Sci. Technol.*, Oxford, v.25, n.7, p.11-20, 1992.

COLLERAN, E.; CONCANNON, F.; GOLDEN, T.; GEOGHEGAN, F.; CRUMLISH, B.; KILLILEA, E.; HENRY, M.; COATES, J. Use of methanogenic activity tests to characterize anaerobic sludges, screen for anaerobic biodegradability and determine toxicity thresholds against individual anaerobic trophic groups and species. *Water Sci. Technol.*, Oxford, v.25, n.7, p.31-40, 1992.

DE ZEEUW, W. *Acclimation of anaerobic sludges for UASB reactor start-up*. 1984. Thesis (Ph.D.) – University of Wageningen, Wageningen, 1984.

DOLFING, J.; BLOEMEN, W. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J. Microbiol. Methods*, Amsterdam, v.4, n.1, p.1-12, 1985.

ETCHEBEHERE, C.; ERRAZQUIN, M.I.; CABEZAS, A.; PIANZZOLA, M.J.; MALLO, M.; LOMBARDI, P.; OTTONELLO, G.; MUXÍ, L. Sludge bed development in denitrifying reactors using different inocula-performance and microbiological aspects. *Water Sci. Technol.*, Oxford, v.45, n.10, p.365-370, 2002.

MOSEY, F.E.; FERNANDES, X.A. Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk sugar. *Water Sci. Technol.*, Oxford, v.21, p.187-196, 1989.

PENNA, J.A. Estudo da metodologia do teste de atividade metanogênica específica. São Carlos, 1994. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

RATKOWSKY, D.A. *Nonlinear regression modeling*. New York: Marcel Dekker, 1983. 276p.

RATKOWSKY, D.A. *Handbook of nonlinear regression models*. New York: Marcel Dekker, 1989. 241p.

SEBER, G.A.F.; WILD, C.J. *Nonlinear regression*. New York: John Wiley & Sons, 1989. 768p.

SAS, *Statistical Analysis System for Windows Release 6.12 – SAS System Help*. Cary, North Carolina, USA, 1996.

SANZ, J.L.; RODRIGUEZ, N.; AMILS, R. Effect of chlorinated aliphatic hydrocarbons on the acetoclastic methanogenic activity of granular sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Heidelberg, v.47, n.3, p.324-328, 1997.

SOTO, M.; MENDEZ, R.; LEMA, J. M. Characterization and comparison of biomass from mesophilic and thermophilic fixed bed anaerobic digesters. *Water Sci. Technol.*, Oxford, v.25, p.203-211, 1992.

SOTO, M.; MENDEZ, R.; LEMA, J.M. Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set-up. *Water Res.*, New York, v.27, n.8, p.1361-1376, 1993.

VALCKE, D.; VERSTRAETE, W. A practical method to estimate the acetoclastic methanogenic biomass in anaerobic sludges. *J. Water Pollut. Control Fed.*, Alexandria, v.55, n.9, p.1191-1195, 1983.

Recebido em 18.10.2009.

Aprovado após revisão 26.02.2010.