



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA**  
Escola Superior de Tecnologia e Gestão

**APLICABILIDADE DAS MICROALGAS NO TRATAMENTO DAS  
ÁGUAS RUÇAS**

**Bruna da Silva Martins**

Dissertação apresentada à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Bragança**  
Para obtenção do grau de Mestre em  
**Energias Renováveis e Eficiência Energética**

**Orientador:**

Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes (ESA, CIMO-IPB)

**Novembro de 2014**

## AGRADECIMENTOS

Com a conclusão desta etapa de estudo não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, que apesar de ser um projeto individual não poderia ter sido efetuado com sucesso por uma só pessoa. De modo particular gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Professora Doutora Conceição Fernandes, do Instituto Politécnico de Bragança – ESA, CIMO, pela orientação e disponibilidade prestada ao longo destes últimos meses de trabalho, pelos ensinamentos transmitidos e pela revisão crítica e atenta do texto. Agradeço ainda a paciência, a preocupação, o apoio mas principalmente o carinho e a amizade que demonstrou neste último ano, muito obrigada!

Tenho de agradecer de forma muito especial à minha amiga e colega de mestrado, Diana Monteiro, pela amizade, carinho e apoio ao longo do nosso período académico mas principalmente pela ajuda e companhia no decorrer desta dissertação. Obrigada pelo incentivo, mesmo nos dias mais cansativos conseguimos manter um sorriso de dever cumprido.

À técnica do laboratório de Agro – Industrias, Maria do Céu Fidalgo, pelo apoio prestado, pelo carinho, pela sua generosidade e amizade que sempre demonstrou.

Aos docentes da ESAB pela disponibilidade prestada no decorrer deste trabalho, com a disponibilidade de materiais e equipamentos.

A todos os colegas do laboratório de Agro – Industrias, não referindo nomes porque são muitos, agradeço o carinho e amizade com que me acolheram, os conhecimentos partilhados, mas principalmente por todos os momentos de boa disposição.

Aos meus pais e à minha irmã pela ajuda e apoio prestado, mas sobretudo pela confiança e orgulho que demonstraram pela concretização de mais uma etapa da minha vida.

*A todos os que contribuíram para este trabalho muito obrigada!*

## RESUMO

Um dos maiores problemas da indústria de produção de azeite está relacionado com a produção em grandes quantidades de águas ruças, resultantes do processamento do azeite. A produção de azeite a nível mundial encontra-se centralizada na bacia do Mediterrâneo, sendo Portugal um dos dez maiores produtores. As águas ruças representam um problema ambiental onde a sua descarga direta em ambientes aquáticos e terrestres pode originar eutrofização dos cursos de água e solos inférteis, no entanto a nível industrial ainda não foi estabelecido um sistema de tratamento eficiente e economicamente viável. O problema deste efluente deve-se à sua composição química, caracterizada por uma elevada carga orgânica, associada a elevados teores de compostos fenólicos e pH ácido, assim como um cheiro característico e coloração escura.

Neste contexto, este trabalho pretende avaliar o potencial das microalgas na diminuição de compostos fenólicos e aumento do pH, nas águas ruças. Para tal, testou-se o efeito da *Chlorella vulgaris* imobilizada na biorremediação de águas ruças de duas e três fases, em culturas *batch*. A eficácia do processo foi também avaliada pela fitotoxicidade, em ensaios de germinação e crescimento da *Lactuca sativa*. Além disso, otimizou-se o processo pela utilização de 2º ciclo e 2º tratamento, pela utilização de inóculos preadaptados, pela redução do tempo de cultura e pela otimização do tipo de reator.

Em função do *screening* de crescimento em meio sólido, os ensaios em *batch* foram efetuados com águas ruças de duas fases à diluição de 35%, 50% e 60% e no caso das águas ruças de três fases a diluição de 20%, em meio Walne modificado. Estes ensaios foram desenvolvidos à temperatura ambiente, com iluminação natural e aerificação contínua. A otimização do reator foi feita por utilização de uma coluna de bolhas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a *C. vulgaris* tem a capacidade de remover os compostos fenólicos e neutralizar o efluente, observando-se uma redução do teor de fenóis entre 20% a 43% no efluente de três fases e de 53% a 73% no efluente duas fases. Em termos fitotóxicos conclui-se que a microalga consegue reduzir a toxicidade das águas ruças, tendo a capacidade de degradar os compostos fenólicos que inibem a germinação e crescimento da *L. sativa*.

**Palavras-chave:** água ruça, biorremediação, *Chlorella vulgaris*, compostos fenólicos, fitotoxicidade, *Lactuca sativa*, índice de germinação.

## ABSTRACT

One of the greatest issues in the industry of olive oil production has to do with the massive production of olive mill wastewaters which result from the processing of olive oil. Worldwide production of olive oil is centered in the Mediterranean basin, and Portugal is one of the world's 10 largest producers. Olive mill wastewaters represent an environmental threat as its direct outflow in aquatic and terrestrial environments may cause the eutrophication of water courses and soils to become infertile. Despite this, an efficient and economically practicable treatment system hasn't yet been established in the industry. The issues brought by this effluent have to do with its chemical composition which consists of a high organic load, associated with high contents of phenolic compounds and acid pH, as well as a characteristic smell and dark colour.

Taking the above into consideration, the aim of this assignment is to assess the potential of microalgae in the decrease of phenolic compounds and increase of pH in olive mill wastewaters. For this purpose, the effect of immobilized *Chlorella vulgaris* in the bioremediation of phase two and phase three olive mill wastewaters has been tested in *batch* cultures. The effectiveness of the process has also been assessed by phytotoxicity, in germination trials and growth of *Lactuca sativa*. Besides that, the process has been optimized through the implementation of a second cycle and second treatment with the usage of preadapted inoculums, with the reduction of culture time and with the optimization of the type of reactor.

According to the *screening* of the growth in solid environment, the *batch* trials have been performed in two phase olive mill wastewaters on a dilution of 35%, 50% and 60% and for the case of olive mill wastewaters of three phases on a dilution of 20% in modified Walne medium. These trials have been performed in room environment with natural light and continuous aerification. The optimization of the reactor has been accomplished through the use of a bubble column.

The results achieved show that the *Chlorella vulgaris* has the ability of removing phenolic compounds and neutralizing the effluent, and a reduction in the content of phenols from 20% to 43% is observed in the effluent of three phases, while a reduction of 53% to 73% is observed in the effluent of two phases. In what regards to phytotoxicity, we can conclude that the microalgae can reduce the toxicity of olive mill wastewaters

having also the ability to degrade the phenolic compounds that inhibit the germination and growth of *Lactuca sativa*.

**Keywords:** olive mill wastewaters, bioremediation, *Chlorella vulgaris*, phenolic compounds, phytotoxicity, *Lactuca sativa*, germination index.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	II
RESUMO .....	III
ABSTRACT .....	IV
ÍNDICE GERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	X

<b>1 ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AZEITE NO MUNDO .....	5
2.1.1 Caracterização da produção de azeite em Portugal .....	5
2.2 SISTEMAS DE EXTRAÇÃO DE AZEITE .....	6
2.2.1 Lagares contínuos de três fases .....	7
2.2.2 Lagares contínuos de duas fases .....	7
2.3 ÁGUAS RUÇAS .....	9
2.3.1 Compostos fenólicos presentes nas águas ruças.....	10
2.4 IMPACTE AMBIENTAL DAS ÁGUAS RUÇAS .....	11
2.5 PROCESSOS DE TRATAMENTO DAS ÁGUAS RUÇAS .....	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 AMOSTRAGEM DAS ÁGUAS RUÇAS.....	14
3.2 MICROALGA SELECIONADA.....	15
3.2.1 <i>Chorella vulgaris</i> .....	15
3.2.2 Manutenção das Culturas.....	15
3.2.3 Avaliação do Crescimento.....	17
3.3 <i>SCREENING</i> DO CRESCIMENTO.....	18
3.4 ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO .....	18
3.4.1 Imobilização de Células.....	18
3.4.2 Desmobilização das Células .....	19
3.4.3 Desenvolvimento das Culturas .....	20
3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	22
3.5.1 Extração.....	22

3.5.2	Quantificação.....	22
3.6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FINAL DOS EFLUENTES.....	23
3.7	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.....	25
3.8	TRATAMENTO DE DADOS.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1	SCREENING DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS.....	28
4.2	ENSAIOS DE BIORREMEDIAÇÃO.....	30
4.2.1	Culturas <i>batch</i> - Três fases.....	30
4.2.2	Culturas <i>batch</i> - Duas fases.....	42
4.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FINAL DOS EFLUENTES.....	53
4.3.1	Ensaio de Germinação.....	53
4.3.2	Ensaio de Crescimento.....	59
4.4	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.....	62
4.4.1	Tratamento do Efluente sem Conservação.....	62
4.4.2	Otimização do Biorreator.....	65
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> - Produção de azeite em Portugal (2003-2014). Adaptado de INE (2014). ...	6
<b>Figura 2.2</b> - Diagrama do processo dos sistemas de extração contínuo de três e duas fases. Adaptado de Aires (2007).....	8
<b>Figura 3.1</b> - Procedimento experimental geral adotado neste trabalho. ....	14
<b>Figura 3.2</b> - Aspeto das culturas de <i>C. vulgaris</i> em meio sólido.....	16
<b>Figura 3.3</b> - Culturas de <i>C. vulgaris</i> em meio líquido.....	17
<b>Figura 3.4</b> - Câmara de Neubauer e detalhe do quadrante considerado nas contagens.	17
<b>Figura 3.5</b> - Imobilização das células: (A) Processo de imobilização; (B) Células imobilizadas de <i>C. vulgaris</i> . ....	19
<b>Figura 3.6</b> - Exemplos de ensaios de biorremediação: (A) Culturas em <i>batch</i> 3 fases; (B) Culturas em <i>batch</i> 2 fases.....	20
<b>Figura 3.7</b> - Metodologia implementada nos ensaios de biorremediação. ....	21
<b>Figura 3.8</b> - Sementes de <i>Lactuca sativa</i> utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade. ....	24
<b>Figura 3.9</b> - Cuvetes agrícolas com <i>Lactuca sativa</i> após a sua transplantação. ....	25
<b>Figura 3.10</b> - Vertentes de otimização do processo de biotratamento, com água ruça de 2 fases. ....	26
<b>Figura 4.1</b> - <i>Screening</i> do crescimento da <i>C. vulgaris</i> em água ruça de 2 fases, ao fim de 14 dias: (A) Placa do controlo e placa do ensaio com diluição de 30%; (B) Placa do controlo e placa do ensaio com diluição de 40%.....	29
<b>Figura 4.2</b> - Perda de compostos fenólicos, em culturas de biorremediação ao longo de 19 dias, PLI (%), série 2, 3 fases. ....	33
<b>Figura 4.3</b> - Perda de compostos fenólicos ao longo de 19 dias, PLI (%), série 2, 2º ciclo, 3 fases. ....	34
<b>Figura 4.4</b> - Perda de compostos fenólicos ao longo de 18 dias, PLI (%), série 3, 3 fases. ....	36
<b>Figura 4.5</b> - Perda de compostos fenólicos PLI (%), série 4, 3 fases: (A) Ensaio de biorremediação sem adaptação; (B) Ensaio de biorremediação com adaptação. ...	38
<b>Figura 4.6</b> - Coloração das amostras de água ruça, 1º ciclo sem adaptação, série 4, 3 fases: (A) amostra inicial do efluente; (B) amostra final do efluente.....	42

<b>Figura 4.7</b> - Perda líquida de compostos fenólicos ao longo de 18 dias, PLI (%), série 1, 2 fases. ....	44
<b>Figura 4.8</b> - Desempenho <i>C. vulgaris</i> na remoção de fenóis, 50% e 60%, 2 fases: .....	48
<b>Figura 4.9</b> - Remoção de fenóis nas culturas de biorremediação 50% e 60% 2 fases: (A) Comparação PLI (%) & PLI Líq.(%); (B) Comparação YE (%) & YE Líq.(%) ...	48
<b>Figura 4.10</b> - Coloração das amostras de água ruça, 1ºciclo, série 3, 2 fases: (A) amostra inicial do efluente; (B) amostra final do efluente. ....	53
<b>Figura 4.11</b> - Resultados dos testes de germinação com os efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases, série 4: (A): Biotratamento sem adaptação; (B): Biotratamento com preadaptação. ....	55
<b>Figura 4.12</b> - Aspeto do desenvolvimento final da <i>L. sativa</i> ao fim de 24 dias de ensaio, 20% de água ruça, 3 fases: (A) Biotratamento sem adaptação; (B) Controlo negativo. ....	60
<b>Figura 4.13</b> - Aspeto do desenvolvimento final da <i>L. sativa</i> ao fim de 24 dias de ensaio, 35% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento de 1ºciclo; (B) Biotratamento de 2ºciclo. ....	61
<b>Figura 4.14</b> - Aspeto do desenvolvimento final da <i>L. sativa</i> ao fim de 24 dias de ensaio, 50% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento; (B) Controlo negativo.....	61
<b>Figura 4.15</b> - Aspeto do desenvolvimento final da <i>L. sativa</i> ao fim de 24 dias de ensaio, 60% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento; (B) Controlo negativo.....	62
<b>Figura 4.16</b> - Otimização do processo - aspeto das culturas com efluente sem conservação a 50%, 2 fases. ....	63
<b>Figura 4.17</b> - Otimização do processo - aspeto dos fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas, 2 fases a 50%.....	65

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> - Características físico-químicas das águas ruças de lagares contínuos de três fases. Adaptado de Ferraz (2012). .....	9
<b>Tabela 4.1</b> - Perfil de crescimento da <i>C. vulgaris</i> obtido no <i>screening</i> inicial, na presença de diferentes diluições de águas ruças de 2 fases. ....	29
<b>Tabela 4.2</b> - Características iniciais e finais das culturas, pré-ensaio, 3 fases. (A e B duplicados).....	30
<b>Tabela 4.3</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 2, 3 fases. ....	31
<b>Tabela 4.4</b> - Teor de compostos fenólicos totais ao longo de 19 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 2, 3 fases. ....	32
<b>Tabela 4.5</b> - Desempenho da <i>C. vulgaris</i> através da análise comparativa entre o 1º e 2º ciclo, série 2, 3 fases. ....	34
<b>Tabela 4.6</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 3, 3 fases. ....	35
<b>Tabela 4.7</b> - Teor de compostos fenólicos ao longo de 18 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 3, 3 fases. ....	35
<b>Tabela 4.8</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 4, 3 fases. ....	37
<b>Tabela 4.9</b> - Teor de compostos fenólicos ao longo do ensaio ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 4, 3 fases. ....	37
<b>Tabela 4.10</b> - Tabela resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de 3 fases. ....	39
<b>Tabela 4.11</b> - Perfil fenólico e respetiva variação após biotratamento durante 13 dias, 3 fases a 20% diluição. ....	41
<b>Tabela 4.12</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 1, 2 fases. ....	43
<b>Tabela 4.13</b> - Teor de compostos fenólicos ao longo de 18 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 1, 2 fases. ....	44
<b>Tabela 4.14</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 2, 2 fases. ....	45

<b>Tabela 4.15</b> - Teor de compostos fenólicos ao longo de 14 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 2, 2 fases. .....	45
<b>Tabela 4.16</b> - Comparação entre o ensaio de 1º ciclo e 2º ciclo a 35%, 2 fases .....	46
<b>Tabela 4.17</b> - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 3, 2 fases. ....	47
<b>Tabela 4.18</b> - Teor de compostos fenólicos ao longo de 8 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 3, 2 fases. .....	47
<b>Tabela 4.19</b> - Tratamento biológico de águas ruças com diferentes tipos de microrganismos. Adaptado de Farshad (2012). ....	50
<b>Tabela 4.20</b> - Tabela resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de 2 fases. .....	52
<b>Tabela 4.21</b> - Resultados da germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> com efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases. ....	54
<b>Tabela 4.22</b> - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases. ....	55
<b>Tabela 4.23</b> - Resultados da germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> com efluentes finais de 35% de água ruça, 2 fases. ....	56
<b>Tabela 4.24</b> - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 35% de água ruça, 2 fases. ....	57
<b>Tabela 4.25</b> - Resultados da germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> com efluentes finais de 50% e 60% de água ruça, 2 fases. ....	58
<b>Tabela 4.26</b> - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 50% e 60% de água ruça, 2 fases. ....	59
<b>Tabela 4.27</b> - Análise comparativa do efeito do biotratamento da <i>C. vulgaris</i> nos efluentes de água ruça, 2 fases, na germinação de <i>L. sativa</i> . ....	59
<b>Tabela 4.28</b> - Comparação entre as culturas de biorremediação de 50%, 2 fases. ....	65
<b>Tabela 4.29</b> - Comparação entre as culturas de biorremediação de 50% (série 3, 2 fases e 50% otimização com biorreator coluna de bolhas). ....	66

# **1 Enquadramento e Objetivos**

---

Nas últimas décadas a produção mundial de azeite sofreu um elevado crescimento associado à mudança dos hábitos alimentar da população, pois o consumo desta gordura vegetal traduz-se em benefícios para a saúde humana. No entanto, a indústria da extração de azeite gera uma elevada quantidade de subprodutos que têm originado graves problemas ambientais, nomeadamente as águas ruças.

As águas ruças para além de se tratarem do principal subproduto da agroindústria da extração do azeite, até ao momento não possuem uma solução de tratamento economicamente viável. Os problemas ambientais deste efluente estão relacionados com o elevado teor poluente e com a produção em grandes quantidades num período muito restrito. Estas águas são caracterizadas pelo pH ácido e pela elevada carga orgânica, nomeadamente compostos fenólicos que apresentam capacidades fitotóxicas e antimicrobianas, capazes de inibir a germinação, pelo que a sua eliminação direta pode poluir ambientes terrestres e aquáticos.

Em Portugal o setor oleícola assume uma importância significativa e a utilização de águas ruças para a rega de terrenos agrícolas está estritamente condicionada, existindo várias limitações e proibições no seu uso. A comunidade científica tem vindo a desenvolver estudos sobre os vários tratamentos, onde o objetivo é encontrar uma solução de tratamento eficiente e economicamente viável de forma de resolver este problema ambiental.

Este trabalho surge na sequência da linha de investigação desenvolvida na Escola Agrária de Bragança, na qual se avalia o potencial das microalgas na diminuição de compostos fenólicos e aumento do pH, nas águas ruças. Assim, neste trabalho testou-se o efeito da *Chlorella vulgaris* imobilizada na biorremediação de águas ruças de duas e três fases. Uma vez que a linha de investigação se prende com a diminuição da fitotoxicidade, foram avaliadas as respostas na germinação e crescimento da *Lactuca sativa* (alface) em condições controladas e em estufa, respetivamente, bem como foram testadas várias soluções de modo a rentabilizar o processo de biorremediação.

Para que fosse possível atingir este objetivo, a presente investigação integrou as seguintes etapas:

- I. Recolha das águas ruças resultantes da campanha 2013/2014, cedidas por olivicultores do nordeste transmontano;

- II. Realização do *screening* de crescimento da *C. vulgaris* em meio sólido, para testar diferentes concentrações de água ruça, de modo a rentabilizar o processo de biorremediação com a microalga;
- III. Realização dos ensaios de biorremediação, em culturas *batch* (com base nos resultados obtidos no *screening*, com a finalidade de avaliar a capacidade de remoção dos compostos fenólicos e aumento de pH, utilizando células imobilizadas de *C. vulgaris*;
- IV. Avaliação da fitotoxicidade do efluente após o biotratamento em ensaios de germinação e crescimento inicial da *Lactuca sativa* (alface), em condições controladas;
- V. Análise do crescimento da *L. sativa*, em estufa, recorrendo à rega com os efluentes após o biotratamento.
- VI. Otimização do processo de biorremediação, testando diferentes concentrações de inóculo, reutilização da biomassa, tratamentos sucessivos e tipo de reator.

A presente dissertação é constituída por cinco capítulos: O primeiro capítulo corresponde ao enquadramento onde é apresentada a problemática do estudo, os principais objetivos e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, no qual se aborda a caracterização do setor oleícola no Mundo e em Portugal, os sistemas de extração usados na produção de azeite, os impactos causados pelos efluentes gerados, bem como uma breve descrição dos processos de tratamento aplicados a este tipo de efluentes. No terceiro capítulo apresentam-se as metodologias utilizadas para a manutenção dos *stocks* e desenvolvimento das culturas de microalgas, do *screening* do crescimento, da preparação dos ensaios de biorremediação, da quantificação dos compostos fenólicos, da avaliação da fitotoxicidade e otimização do processo. No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos e realizada uma discussão dos mesmos, comparando nomeadamente os resultados obtidos com os de outros autores. No último capítulo são feitas as considerações finais, realçando os pontos mais relevantes deste estudo e propostas sugestões para trabalhos de investigação a realizar no futuro. Finalmente apresenta-se a listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

## **2 Revisão Bibliográfica**

---

## **2.1 Caracterização da produção de azeite no Mundo**

O cultivo da oliveira (*Olea europaea L.*) é dos mais antigos do mundo. Estima-se que este tenha surgido há 6000 anos na bacia do Mediterrâneo, tendo-se difundido pelo norte de África, Península Ibérica e sul da Europa (Bacelar, 2006; Luchetti, 2002).

O fruto da oliveira é a azeitona, este fruto é composto maioritariamente por água, açúcar, lípidos, proteínas, ácidos orgânicos, ácidos gordos, entre outros. Sendo que o seu elevado teor em lípidos permite rendimentos em azeite de 14 a 28% do seu peso (Monteiro, 1999).

A produção de azeite a nível mundial está limitada por questões edafo-climáticas, pois a oliveira tem como habitat preferencial regiões com clima de tipo mediterrâneo, caracterizado por verões quentes e secos (Marinho, 2009). A produção de azeite concentra-se essencialmente na região da Bacia Mediterrânea, representando 95% da superfície oleícola. Contudo nos últimos 500 anos a produção estendeu-se a outras regiões com clima Mediterrâneo, como América do Norte e Sul, África do Sul, Austrália, China e Japão (Monteiro, 1999; Connor, 2005).

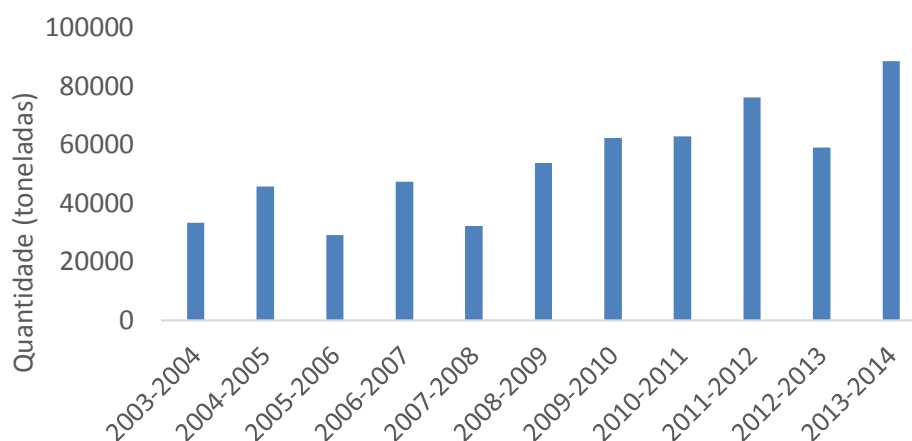
Os países da União Europeia são os maiores produtores de azeite, segundo estimativas da campanha de 2013/2014 são reponsaveís por 76% da produção mundial, num total de 3.104.000 toneladas de azeite. O maior produtor mundial na campanha de 2013/2014 foi a Espanha com 57,02%, seguido da Itália com 11,28%, Grécia 4,35% e por fim Portugal com 2,90% (IOC, 2014).

### **2.1.1 Caracterização da produção de azeite em Portugal**

O facto de Portugal se encontrar entre os principais produtores mundiais de azeite, origina não só um desenvolvimento a nível económico, como também a nível social nas regiões produtoras, pois os olivais são uma mais-valia patrimonial, paisagística e cultural (Marinho, 2009).

O olival português destina-se essencialmente à produção de azeite, de acordo com dados da campanha de 2013/2014, cerca de 98,9% da produção de azeitona destinou-se à produção de azeite e apenas 1,1% deriva para a produção de azeitona de mesa (INE, 2014). De acordo com dados preliminares da última campanha, a produção de azeitona registou um recorde 627 mil toneladas, tendo a produção de azeite superado as 85 mil toneladas.

A cultura do olival encontra-se distribuída por todas as Regiões Agrárias do Continente, com a região de Entre Douro e Minho apresentando a menor produção, e em contrapartida o Alentejo com maior produção, respetivamente 0,46% e 66,84% (INE, 2014).



**Figura 2.1** - Produção de azeite em Portugal (2003-2014). Adaptado de INE (2014).

Segundo o INE (2014), estima-se que os lagares portugueses tenham atingido a produção de 81,3 milhões de toneladas de azeite (Figura 2.1), na campanha de 2013/2014, o que resulta num incremento na produção de azeite de 50% em relação à campanha anterior. Este aumento resulta das condições meteorológicas favoráveis e da produção intensiva de novos olivais.

## 2.2 Sistemas de extração de azeite

Atualmente existem quatro tipos de lagares sendo eles: descontínuos (tradicional de prensas), contínuos de três fases, contínuos de duas fases e lagares mistos, sendo que o processo de laboração só difere na etapa de separação das fases (Peres, 2001). Tendo em conta os efluentes tratados neste trabalho, apenas serão detalhados os sistemas de extração contínuos.

A maior parte dos produtores de azeite dos países mediterrâneos utilizam o sistema de centrifugação contínua, cerca de 90% na Grécia, Itália e Espanha (Marinho, 2009). Em Portugal predominam os sistemas contínuos de duas fases, com cerca de 40,28%, tendo estes mais relevo nas regiões de Trás-os-Montes e Alentejo com 13,89% e 12,30% respetivamente. Os lagares tradicionais de prensas representam 37,90% dos

sistemas de extração, tendo mais relevância na Beira Interior, por sua vez os lagares contínuos de três fases representam 21,83% com mais importância na Beira Litoral (INE, 2014).

Em todos os processos de extração a fase inicial é comum, a azeitona ao chegar ao lagar é submetida a uma operação de limpeza e lavagem de modo a remover objetos grosseiros e terra (Garcia, 2004). Sendo de seguida preparada uma massa de azeitona, onde os frutos são dilacerados e reduzidos a pasta.

### **2.2.1 Lagares contínuos de três fases**

Os lagares contínuos de três fases surgiram no final dos anos 60 e tinham como objetivo substituir os lagares tradicionais (Aires, 2007). Neste sistema são produzidos três frações, sendo eles: o azeite, o bagaço (massa com pouca água com resíduos de polpa e caroço de azeitona) e a água ruça (Marinho, 2009), conforme esquema da figura 2.2

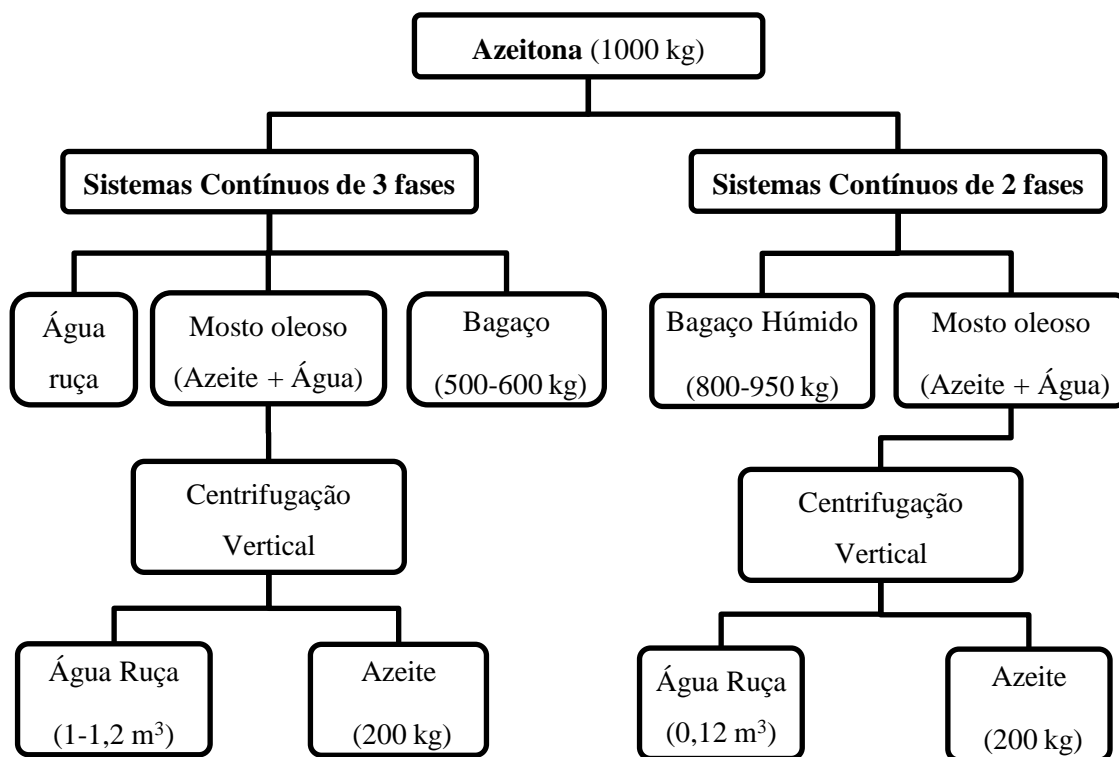
Neste sistema de três fases, a extração do azeite ocorre por força centrífuga que acentua a diferença entre os pesos específicos resultantes da separação da fase sólida da líquida, sendo a separação facilitada com a adição de água quente. Com uma tonelada de azeitona laborada obtém-se aproximadamente um volume de água ruça de 1 a 1,2 m<sup>3</sup> (Aires, 2007). Este tipo de lagar apresenta vantagens comparativamente com o sistema de prensas tais como: possibilidade de automatização, ocupa menos superfície e necessita de menos mão-de-obra, por fim possui elevada capacidade de laboração. Em contrapartida apresentam maior custo de investimento que o lagar tradicional, maior consumo de água, maior produção de água ruça e conseqüente maior perigo de contaminação ambiental (Di Giovacchino, 1991; Leone, 1993; Civantos, 1999; Niaounakis e Halvadakis, 2006).

### **2.2.2 Lagares contínuos de duas fases**

Com o intuito de reduzir a produção de água ruça e por conseguinte reduzir o impacto ambiental por elas provocado, na década de 90 foi desenvolvido um novo sistema de extração por centrifugação, denominado por lagar de duas fases (Borja *et al.*, 2002; Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004; Giannoutsou *et al.*, 2004; Pelillo *et al.*, 2006).

Nos lagares de duas fases, o processo de extração é semelhante ao processo de extração de três fases, no entanto não apresenta necessidade de acrescentar água ao processo reduzindo a geração de águas residuais até 80%. Neste sistema são obtidos dois

produtos, o azeite e o bagaço (formado por cascas, caroços e polpa da azeitona) com água da constituição da azeitona (água ruça), sendo designado habitualmente em Portugal por bagaço húmido (Aires, 2007), conforme esquema da figura 2.2. O bagaço húmido possui um elevado teor de humidade na ordem dos 55 a 70% (Di Giovacchino, 1998). Por cada tonelada de azeitona laborada são produzidos 0,12 m<sup>3</sup> de água ruça (Aires, 2007). Este processo apresenta vantagens como a diminuição das águas ruças produzidas visto que o consumo de água é reduzido, assim como um menor consumo de energia (Albuquerque *et al.*, 2004; Borja *et al.*, 2006; Giannoutsou *et al.*, 2004). A maior desvantagem deste processo está associada ao tratamento do bagaço húmido ser pouco rentável, devido à grande quantidade de água na sua constituição. A pouca rentabilidade do bagaço húmido está relacionada com o transporte desde os lagares até às refinarias, assim como o seu armazenamento deve ser realizado em grandes bacias por longos períodos de tempo (Balis *et al.*, 1996; Arjona *et al.*, 1999).



**Figura 2.2** - Diagrama do processo dos sistemas de extração contínua de três e duas fases. Adaptado de Aires (2007).

Para além dos sistemas contínuos de duas fases existem os sistemas mistos. Estes sistemas reúnem as vantagens dos sistemas contínuos, já que se torna necessário acrescentar uma quantidade de água inferior (0-30L/100 kg de azeitona)

comparativamente com os lagares de três fases. No final do processo obtém-se três fluxos, ou seja, o azeite, o bagaço com 50 a 60% de humidade e água ruça (5-30L) (Di Giovacchino *et al.*, 2002).

### 2.3 Águas ruças

A água ruça é um efluente agroindustrial resultante do processo de extração do azeite. Este efluente apresenta uma coloração (cor vermelha, escura ou preta) muito característica que se deve essencialmente à presença de compostos fenólicos poliméricos (Tsioulpas *et al.*, 2002).

A composição qualitativa e quantitativa das águas ruças é muito variável, variando de acordo com a composição da água da vegetação, do processo de extração do azeite, das condições edafo-climáticas, da variedade da cultivar de azeitona utilizada, do grau de maturação do fruto, da duração e características do armazenamento (Cabrera, 1995; Marinho, 2009).

A nível mundial a produção de água ruça encontra-se concentrada na região do Mediterrâneo, estimando-se que a sua produção seja superior a 30 milhões de metros cúbicos anuais (Jaouani *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2006; De Marco *et al.*, 2007).

Os lagares contínuos de três fases apresentam como subprodutos o bagaço e um efluente líquido com elevada carga orgânica, que é obtido por separação do azeite através de centrifugação (Marinho, 2009).

O efluente recém-produzido é caracterizado pela sua cor acastanhada e pelo seu odor semelhante ao do azeite, no entanto com o armazenamento este fermenta e liberta um odor desagradável e a sua incorporação direta no ambiente acarreta elevados riscos ambientais devido à sua elevada carga poluente (Cabrera, 1995).

**Tabela 2.1** - Características físico-químicas das águas ruças de lagares contínuos de três fases. Adaptado de Ferraz (2012).

pH	Parâmetros			Referências
	Lípidos (g.L <sup>-1</sup> )	Polifenóis (g.L <sup>-1</sup> )	Açúcares (g.L <sup>-1</sup> )	
5,1	9,8	6,2	-	Andreozzi <i>et al.</i> , 1998
5,17	3,1	1,6	8,79	Paredes <i>et al.</i> , 1999
5,3	7	4,1	4,3	El-Abbassi <i>et al.</i> , 2011

De acordo com Asses *et al.* (2009), a água ruça de três fases é constituída essencialmente por água (83-96%), matéria orgânica (3,5-15%) e por fim sais minerais (0,5-2%). Este efluente contém elevadas quantidades de lípidos, açúcares (Tabela 2.1) e compostos com propriedades fitotóxicas e antimicrobianas, como os compostos fenólicos, que inibem a germinação e o crescimento de plantas (Capasso *et al.*, 1995; Paixão *et al.*, 1999; Casa *et al.*, 2003).

As águas ruças resultantes do processo misto de lagares contínuos de duas e três fases apresentam menor carga orgânica, traduzindo-se num efluente com menor teor de compostos fenólicos. No que respeita aos compostos orgânicos, os mais abundantes são os açúcares (3%), ácidos gordos voláteis (1%), poliálcoois (0,2%), proteínas (1,05%), polifenóis (0,2%), entre outros (Borja *et al.*, 2002).

### **2.3.1 Compostos fenólicos presentes nas águas ruças**

Os compostos fenólicos estão presentes nos caroços e na polpa da azeitona, a quantidade destes nas águas ruças depende do cultivo e maturação do fruto, condições climáticas, tempo de armazenamento e processo de extração (Allouche *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006; Kallel *et al.*, 2009). Posto isto, a concentração de fenóis nas águas ruças pode variar entre 0,5 e 24g.L<sup>-1</sup> (Borja-Padilha *et al.*, 1990).

Segundo Niaounakis e Halvadakis (2006) e Aires (2007) os compostos fenólicos presentes nas águas ruças possuem um elevado poder antioxidante, sendo os mais abundantes o hidroxitirosol, tirosol e p-cumárico, entre outros como o ácido cafeico.

De acordo com a literatura, a fração fenólica divide-se em compostos fenólicos monoméricos, compostos de baixo peso molecular, e em compostos fenólicos poliméricos designados vulgarmente por compostos de elevado peso molecular. De acordo com Ramos-Cormenzana *et al.* (1996), Sayadi *et al.* (2000), Casa *et al.* (2003), Sampedro *et al.* (2004) e Ergul *et al.* (2009), aos compostos fenólicos de baixo peso molecular é atribuída a atividade fitotóxica e antimicrobiana, no entanto estes compostos são considerados como biodegradáveis (Assas *et al.*, 2000). Por sua vez, os compostos de elevado peso molecular são responsáveis pela coloração escura do efluente (Tsioulpas *et al.*, 2002), têm um carácter mais recalcitrante e são mais difíceis de degradar, apesar de apresentarem menor toxicidade (Assas *et al.*, 2000).

## **2.4 Impacte ambiental das águas ruças**

A sazonalidade da produção de azeite e a dispersão geográfica dos lagares associadas à composição das águas ruças, contribuem para a natureza recalcitrante deste efluente (Oliveira, 2013). De acordo com Rozzi *et al.* (1996), apesar das águas ruças resultarem do processamento da azeitona e os seus constituintes serem biodegradáveis, os compostos fenólicos e lípidos presentes decompõem-se muito mais lentamente que os restantes constituintes do fruto.

A descarga de águas ruças em cursos de águas provoca a alteração da cor destes devido à presença de compostos fenólicos (Kapellakis *et al.*, 2008), estes compostos têm a capacidade de causar intoxicação em algumas espécies aquáticas. Podendo resultar em fenómenos de eutrofização dos sistemas aquáticos, como o desenvolvimento excessivo de algas devido à elevada concentração de nutrientes (fósforo e potássio), assim como a libertação de odores desagradáveis e emissão de gases com efeito estufa, metano e ácido sulfídrico (Kapellakis *et al.*, 2008; Sampaio, 2011). Por sua vez, a aplicação descontrolada de água ruça nos solos torna-os inférteis, interferindo com a atividade dos microrganismos, causando desequilíbrios nas trocas gasosas e na humidade do solo, reduzindo a fertilidade (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

## **2.5 Processos de tratamento das águas ruças**

Tendo em conta os problemas ambientais apresentados pelas águas ruças, o tratamento destes efluentes tem sido estudado intensamente nos últimos 50 anos (Sampaio, 2011), contudo à escala industrial ainda não foi encontrada uma solução de tratamento eficiente e economicamente viável, já que são produzidos em elevadas quantidades num período de tempo muito restrito, sendo caracterizados pelo seu elevado teor de compostos fenólicos e ácidos gordos (Marinho, 2009).

Os processos de tratamento das águas ruças dividem-se em quatro métodos de tratamento, sendo eles: processos físicos, processos térmicos, processos físico-químicos e processos biológicos. Apesar do elevado número de estudos focalizados em métodos de tratamento físico-químicos e biológicos (Khoufi *et al.*, 2007), na maioria não existe registo de ensaios para determinar a toxicidade das águas ruças antes e após o tratamento, designados por ensaios ecotoxicológicos (Justino *et al.*, 2012).

Na Europa a utilização de lagoas de evaporação (processos térmicos) e a descarga direta nos solos e em cursos de água são técnicas bastante utilizadas, contudo a evaporação em lagoas não reduz nem a carga orgânica, nem a toxicidade do efluente, podendo mesmo originar odores, a emissão de gases com efeito estufa, a proliferação de insetos e a produção de grandes quantidades de lamas (McNamara *et al.*, 2008; Khoufi *et al.*, 2009). Em Portugal, como em outros países da bacia Mediterrânea é muito utilizada a aplicação direta do efluente no solo após a correção prévia do pH, esta prática tem como vantagem a utilização deste recurso para rega de culturas arbóreas ou arbustivas de forma a economizar água potável. Contudo a sua aplicação no solo deve ser efetuada entre os meses de Março e Novembro, não excedendo anualmente os 80m<sup>3</sup>/ha (Pinto, 2003).

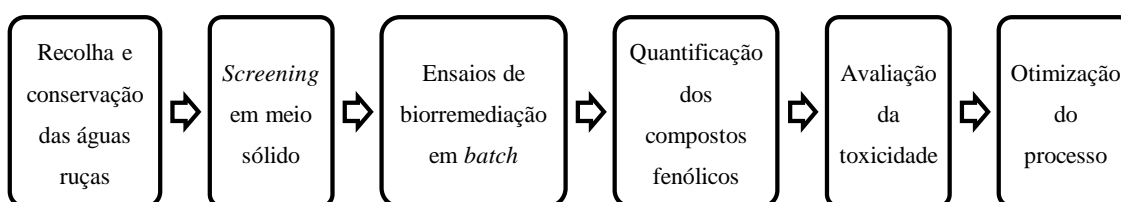
Os processos físico-químicos estão relacionados com a adição de substâncias químicas, que em conjunto com os processos físicos originam a coagulação, precipitação ou destruição da matéria orgânica (Azbar *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006). Este tipo de processos na generalidade são muito dispendiosos e não resolvem o problema ambiental causado pelo efluente, visto que são produzidas lamas que necessitam de tratamento (Paredes *et al.*, 2002).

Os processos biológicos são considerados os mais vantajosos a nível ambiental e com maior viabilidade económica (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005). Os tratamentos aeróbios utilizam microrganismos e são aplicados em efluentes com baixa carga orgânica e/ou concentração de nutrientes, requerendo elevados consumos energéticos. Os tratamentos anaeróbios são utilizados em efluentes com elevada carga orgânica (Niaounakis e Halvadakis, 2004), este apresenta maior rentabilidade pois produz menor quantidade de lamas, apresenta uma redução considerável da carga orgânica e por fim atendendo à sazonalidade da atividade oleícola este processo pode ser reativado após o período de pausa entre as campanhas (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005).

## **3 Material e Métodos**

---

O trabalho experimental foi dividido em várias etapas que de um modo geral podem ser descritas como: (i) recolha e conservação dos efluentes de águas ruças; (ii) *screening* do efeito de diferentes concentrações de água ruça no crescimento das microalgas – utilizando culturas em meio sólido; (iii) em função dos resultados anteriores procederam-se aos ensaios de biorremediação – utilizando culturas *batch*; (iv) quantificação dos compostos fenólicos durante o processo de biorremediação; (v) avaliação da eficácia do processo de biorremediação; (vi) e por fim a otimização do processo. O esquema de trabalho adotado encontra-se esquematizado na figura 3.1.



**Figura 3.1** - Procedimento experimental geral adotado neste trabalho.

### 3.1 Amostragem das Águas Ruças

As amostras de águas ruças utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas por olivicultores do nordeste transmontano. A amostragem foi efetuada durante janeiro de 2014, próximo do final da campanha da azeitona. Foram obtidas águas ruças de lagares contínuos de três fases e de misto de três e duas fases (referido no âmbito deste trabalho como de duas fases), tendo sido as primeiras recolhidas no final do processo e as segundas à saída da centrífuga.

A preparação das amostras teve como objetivo evitar a degradação natural dos compostos fenólicos das águas ruças. No laboratório as amostras foram filtradas para remover possíveis partículas em suspensão e acidificadas até pH 2 (HANNA Instruments HI 8417) usando ácido clorídrico. Após a acidificação as amostras foram distribuídas por garrafas de plástico de 0,5L e congeladas. De referir que o pH foi repostado antes da utilização do efluente nos ensaios em *batch*, utilizando uma solução de hidróxido de sódio.

## 3.2 Microalga Seleccionada

Para o presente estudo foi escolhida a estirpe *Chlorella vulgaris* (CBSC 15-2075), esta microalga foi gentilmente cedida pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto. A escolha desta microalga para este trabalho, tratamento de águas ruças, justifica-se por se tratar de uma espécie amplamente estudada, existindo na literatura muitos estudos referentes às condições de cultivo de forma a maximizar a produção de biomassa, assim como estudos com processos de tratamento de outros efluentes.

### 3.2.1 *Chlorella vulgaris*

A espécie *Chlorella vulgaris* pertence à classe das Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales, família Chlorellaceae e ao género *Chlorella* (AlgaeBase, 1996). A *C. vulgaris* é uma alga unicelular de água doce e as suas células possuem diâmetros entre os 5 e 6 µm. Esta microalga pode acumular pigmentos como clorofila a e b, β-caroteno e xantofilas. A sua principal forma de reserva é o amido, mas possui um elevado potencial de produção de lípidos, chegando até 20% do seu peso seco. Esta microalga é altamente adaptável às mais variadas condições ambientais, multiplicando-se por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual (Russo, 2011; Marinho *et al.*, 2009).

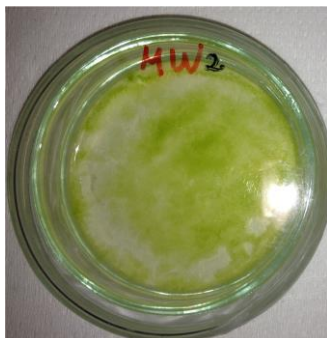
### 3.2.2 Manutenção das Culturas

A manutenção das culturas de microalgas é de elevado interesse neste trabalho, para tal as culturas são mantidas em meio sólido e em meio líquido. De seguida é feita a descrição detalhada destas formas de manutenção.

#### 3.2.2.1 Culturas em Meio Sólido

As culturas em meio sólido têm como objetivo a manutenção de *stocks* viáveis de culturas puras. Os meios são previamente esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121°C (Uniclave 88) assim como todo o material utilizado. Estas culturas são preparadas em placas de Petri com agar sólido (1%) em Bold's Basal Medium (BB) e inoculadas *C. vulgaris* em fase exponencial de crescimento. A inoculação é feita com 160 µL de cultura e semeada com o espalhador devidamente esterilizado à chama. Por fim, as placas de Petri são seladas com parafilme e colocadas em câmara com condições de humidade e temperatura controladas (18±1°C), intensidade luminosa de 4500 lux (lâmpadas

fluorescentes Grolux) e fotoperíodo de 12:12h (luz:escuro). Estas culturas são mantidas através de repicagens periódicas, figura 3.2.



**Figura 3.2** – Aspeto das culturas de *C. vulgaris* em meio sólido.

Para o desenvolvimento das culturas em maiores volumes, as culturas em meio sólido são repicadas mensalmente para tubos de ensaio rolhados, com cerca de 20 mL de meio BB líquido, sempre em condições axénicas. Estas culturas são mantidas nas mesmas condições e agitadas manualmente uma vez por dia. As culturas em tubos são posteriormente transferidas para volumes maiores, quando a densidade celular aumenta, sendo depois tratadas como no subcapítulo seguinte.

### **3.2.2.2 Culturas em Meio Líquido**

As culturas em meio líquido têm como funcionalidade o desenvolvimento da biomassa algal em fase exponencial. Estas culturas desenvolvem-se maioritariamente em pequenos e médios volumes, figura 3.3.

A manutenção das culturas em meio líquido é efetuada com meios de cultura inteiramente sintéticos, meio Walne modificado ou meio BB, previamente esterilizados, bem como todo o material utilizado. Estas culturas são desenvolvidas em balões ou Erlenmeyers de vidro DURAN de 50 a 2000 mL e mantidas em agitação. A agitação é imprescindível para a homogeneização dos nutrientes e para evitar o depósito da biomassa, sendo realizada por aerificadores, do tipo bombas de aquário. O arejamento inclui um sistema de filtração do ar que vai entrar em contato com as culturas, composto por unidades de filtração estéreis de 22 µm e com área de 50 mm (Millex™). Os balões e Erlenmeyers têm rolhas de borracha perfuradas onde são introduzidos dois tubos de vidro de comprimentos diferentes. Um dos tubos não entra em contacto com a cultura, permitindo a saída do ar introduzido pelo segundo tubo do arejamento, este mergulhado na cultura.

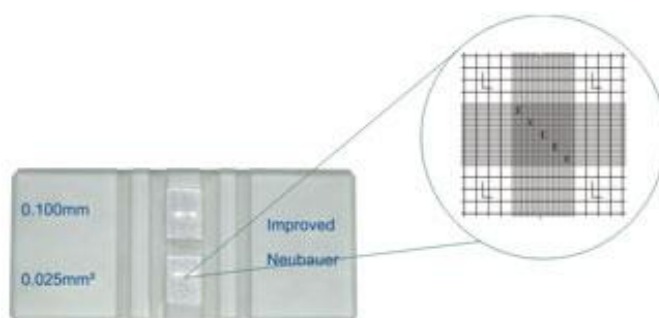


**Figura 3.3** - Culturas de *C. vulgaris* em meio líquido.

As culturas são mantidas numa sala com condições de humidade e temperatura controladas ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), com iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes Grolux), intensidade luminosa de 4500 a 5000 lux, fotoperíodo de 16:8h (luz:escuro) e repicadas quinzenalmente. Para a obtenção de biomassa suficiente para este trabalho, periodicamente (dependendo do desenvolvimento das culturas) era adicionado meio novo até ao volume final de 2L.

### 3.2.3 Avaliação do Crescimento

A densidade celular das culturas em meio líquido é acompanhada por contagens do número de células ao microscópio ótico, utilizando um hemacitómetro, câmara de Neubauer. Para a contagem de células foram considerados os cinco quadrados existentes na diagonal do quadrado central (Figura 3.4) e tido em conta o volume para o cálculo da densidade celular. Os resultados vêm expressos em número de células. $\text{mL}^{-1}$ .



**Figura 3.4** - Câmara de Neubauer e detalhe do quadrante considerado nas contagens.

### 3.3 *Screening* do Crescimento

O efeito das águas ruças nas microalgas foi avaliado pela resposta do seu crescimento na presença de diferentes diluições, utilizando culturas em meio sólido. Neste *screening* inicial, as águas ruças foram testadas em sete diluições sucessivas (10-70% v/v, em água destilada), posteriormente preparadas em agar sólido (1% m/v) e distribuídas por placas de Petri, em condições axênicas. Estes ensaios foram realizados com os efluentes logo à chegada ao laboratório, portanto sem serem congelados. Por cada *set* experimental, foram também preparadas placas de Petri para os controlos de esterilização (não sujeitas a inoculação) e para o controlo de crescimento placas de Petri com meio BB.

De modo a normalizar os ensaios, todas as placas foram inoculadas com 80 µL de cultura de *C. vulgaris* na fase exponencial de crescimento. Por fim, as placas de Petri foram seladas com parafilme e incubadas na sala controlada com condições idênticas às dos ensaios líquidos (22±1°C, intensidade luminosa de 4500 lux e fotoperíodo de 16:8h luz:escuro). Os ensaios foram realizados em triplicado e a avaliação foi feita pela observação do desenvolvimento das microalgas na presença do efluente, comparativamente ao controlo de crescimento ao 5º, 12º e 14º dia após a inoculação.

### 3.4 Ensaio de Biorremediação

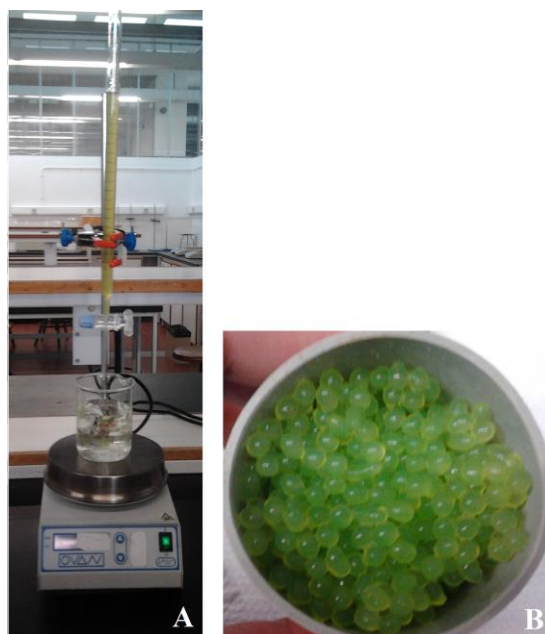
A avaliação da remoção dos compostos fenólicos das águas ruças foi realizada em culturas *batch*, utilizando células imobilizadas de *Chlorella vulgaris*. Estas culturas foram desenvolvidas tendo em conta os resultados do *screening* prévio.

#### 3.4.1 Imobilização de Células

As células de *C. vulgaris* foram imobilizadas em alginato de sódio, a 1,5% (p/v), sendo o método de imobilização empregue sempre o mesmo. A cultura de microalgas a imobilizar estava sempre na fase exponencial de crescimento e a biomassa concentrada através de decantação, sendo sujeita a uma contagem de células e a uma medição do pH.

A solução de alginato de sódio foi preparada em água destilada e esterilizada em autoclave. Posteriormente foi adicionada cultura algal de forma a obter uma solução final de alginato de sódio a 1,5 % (p/v). De modo a poder comparar as microalgas imobilizadas de forma mais precisa, foi ainda efetuada uma contagem de células na solução final de

alginato de sódio. A solução final de alginato de sódio foi colocada numa bureta e deixada gotejar num gobelé com uma solução de cloreto de cálcio a 2% (p/v), sob agitação suave com o auxílio de um magneto, para facilitar a formação das esferas (Figura 3.5). As esferas permaneceram em solução durante 30 minutos até endurecerem por completo.



**Figura 3.5** – Imobilização das células: (A) Processo de imobilização; (B) Células imobilizadas de *C. vulgaris*.

No final as esferas foram lavadas abundantemente com água destilada e colocadas em meio BB durante a noite. Antes de iniciar os ensaios, as células imobilizadas foram novamente lavadas com água destilada. Para o controlo, foram preparadas esferas de alginato de sódio à mesma concentração, usando água destilada em substituição do volume de microalgas.

### 3.4.2 Desmobilização das Células

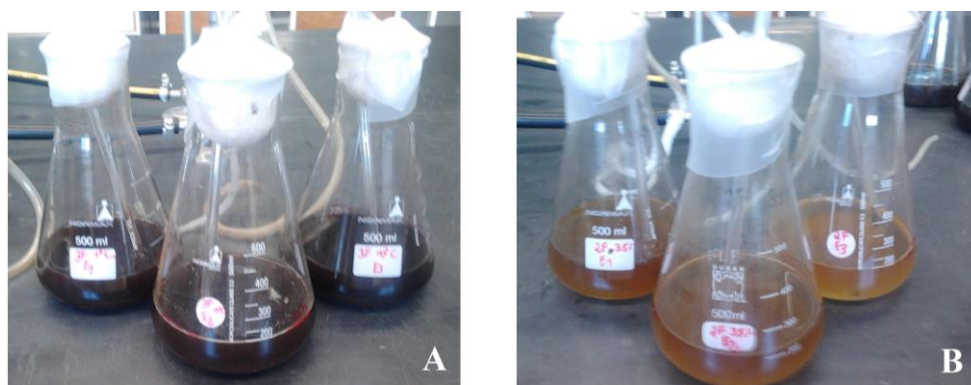
A desmobilização das células de *C. vulgaris* foi efetuada na biomassa resultante de alguns dos ensaios de biorremediação - caso do 1º ciclo do pré-ensaio, sendo posteriormente utilizada essa biomassa para 2º ciclo da série 2. Para a desmobilização das células preparou-se uma solução de citrato de trisódio a 3% (v/v) e colocou-se a solução e as células numa placa de agitação até dissolver, sendo no fim filtrado o conteúdo de forma a reter eventuais resíduos de alginato de sódio e sujidade. De seguida o preparado foi à centrífuga (Hettich Universal modelo 30F) durante 5 minutos a 3000 rpm à

temperatura ambiente, descartou-se o solvente e adicionou-se meio Walne modificado e foi novamente centrifugado. Após a remoção do sobrenadante, as células foram re-suspensas em meio Walne. Antes de imobilizar novamente as células de *C. vulgaris* (para inoculação no 2º ciclo de biotratamento) efetuou-se uma nova contagem da densidade celular.

### 3.4.3 Desenvolvimento das Culturas

Como referido, os ensaios foram preparados de acordo com os resultados do *screening* em meio sólido, pelo que foram testadas concentrações de efluente entre os 20% e os 60% de diluição. A preparação das culturas *batch* dependeu do tipo de efluente a tratar, ou seja, o meio de diluição da cultura variou consoante o efluente. Nas águas ruças de duas fases a diluição foi efetuada com água destilada e nas águas ruças de três fases a diluição foi feita com meio Walne modificado. Esta distinção deveu-se à diferença na resposta do crescimento das microalgas.

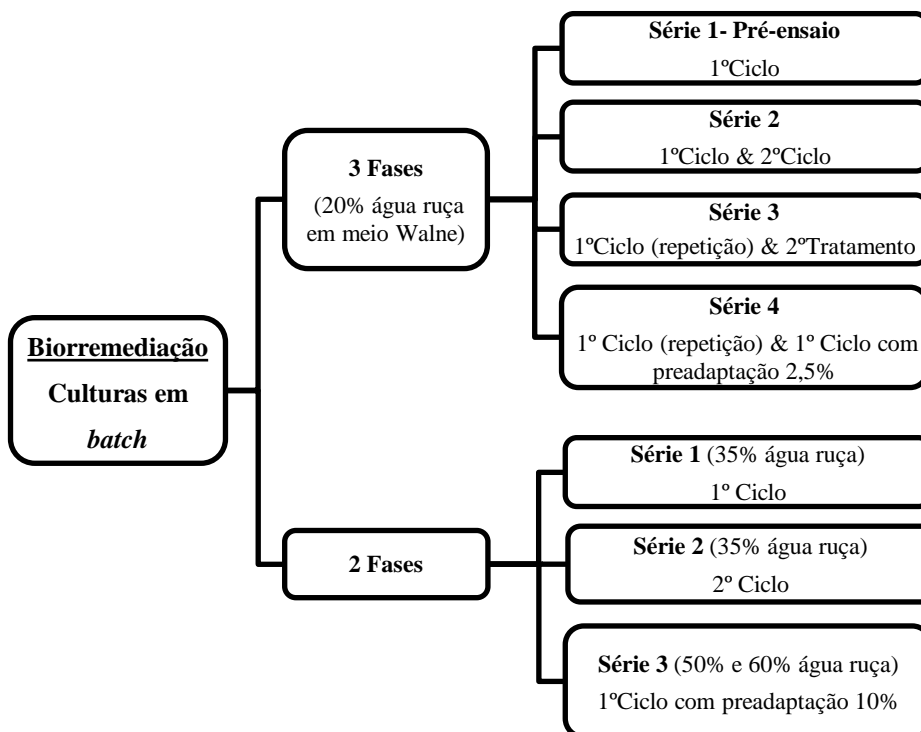
As culturas *batch* foram desenvolvidas em Erlenmeyers de 1L e realizadas sempre em triplicado (Figura 3.6). De salientar que os preparados foram esterilizados antes de iniciar as culturas, assim como foi medido o seu pH. Todas as culturas foram iniciadas com a mesma razão de volume de cultura por volume de células imobilizadas, neste caso a razão adotada foi de 20 (v/v). Foram também realizadas culturas controlo com esferas de alginato de sódio sem microalgas.



**Figura 3.6** – Exemplos de ensaios de biorremediação: (A) Culturas em *batch* 3 fases; (B) Culturas em *batch* 2 fases.

A incubação das culturas decorreu sob condições naturais de iluminação, à temperatura ambiente e com aerificação contínua, em condições não axênicas. Todos os

ensaios foram realizados em triplicado. Durante o tempo de fermentação das culturas foram retiradas periodicamente amostras dos ensaios e dos controlos, para monitorização. O esquema da metodologia implementado nestes ensaios *batch* encontra-se resumido na figura 3.7.



**Figura 3.7** - Metodologia implementada nos ensaios de biorremediação.

Foram também executados vários tipos de processos, para além do ensaio de biorremediação (1ºciclo), nomeadamente 2º ciclo e 2º tratamento. No 2º ciclo foi realizado o tratamento de um novo efluente recorrendo à biomassa algal resultante de ensaios de 1ºciclo, no 2º tratamento fez-se o tratamento sucessivo do mesmo efluente, com a inoculação de novas células imobilizadas.

No tratamento do efluente de três fases foram realizadas quatro séries, sendo que a primeira se tratou de um pré-ensaio. O 2º ciclo foi realizado com a reutilização da biomassa, sendo que neste caso esta foi sujeita a um processo de desmobilização e posteriormente nova imobilização antes do início do novo ciclo (2º ciclo). Por fim, na série 4 foram realizados dois ensaios de 1º ciclo, onde foi comparada a eficácia da biorremediação com inóculo com preadaptação e sem adaptação.

No tratamento do efluente de duas fases foram testadas diferentes concentrações de água ruça de forma otimizar o processo. Para além das culturas de 1º ciclo foi também realizado um 2º ciclo da biomassa, mas aqui a biomassa não foi desmobilizada.

### **3.5 Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais**

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi efetuada a partir das amostras retiradas das culturas *batch*, durante o período de fermentação dos ensaios. Este procedimento foi realizado em duas etapas: a extração de compostos fenólicos e a quantificação de fenóis totais.

#### **3.5.1 Extração**

A extração dos compostos fenólicos das amostras dos ensaios de biorremediação foi realizada através de uma extração líquido-líquido. A extração dividiu-se em duas etapas, numa ocorreu a lavagem das amostras e posteriormente foi realizada a extração propriamente dita dos compostos fenólicos.

A lavagem das amostras teve como função a remoção dos lípidos presentes, neste caso foram realizadas duas lavagens sucessivas. O solvente utilizado nas lavagens foi o n-hexano a 95% (v/v), à razão de 1 hexano:1,2 amostra (v/v). O n-hexano foi adicionado à amostra, de seguida o conteúdo foi agitado e deixado em repouso, de modo a observar-se a separação das fases e o solvente descartado. Posteriormente o conteúdo foi centrifugado (Labofuge 300, Heraeus), a 3000 rpm durante 5 minutos e o solvente remanescente foi descartado. Este processo foi repetido duas vezes.

A extração dos compostos fenólicos foi executada com metanol a 99,9% (v/v) à razão de 1 metanol:1,25 amostra (v/v). Após a adição do metanol as amostras são homogeneizadas, mantidas 10 minutos e posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm. No final, o sobrenadante foi recolhido para doseamento dos fenóis totais.

#### **3.5.2 Quantificação**

O conteúdo dos fenóis totais nos extratos anteriores foi determinado colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999), usando ácido gálico como padrão. A reta padrão é composta por diferentes concentrações de ácido gálico consoante a tonalidade da amostra a analisar (concentração de fenóis totais), desta forma o volume de ácido gálico e água destilada que perfazem as diferentes

concentrações da reta devem ser iguais ao volume de amostra. O volume da toma da amostra depende do tipo de efluente, assim de acordo com o volume da toma é adicionada a mesma quantidade de reagente Folin-Ciocalteu e de solução saturada de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sendo depois preenchido com água destilada.

Após a preparação da reta padrão e das amostras, os tubos foram homogeneizados no vortex e colocados no escuro à temperatura ambiente, durante 90 minutos. Posteriormente procedeu-se à leitura da absorvância a 725 nm (Genesis 10UV, ThermoScientific), contra um branco composto por água destilada em volume igual ao da amostra e pelos restantes reagentes. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

A eficácia de remoção dos compostos fenólicos foi avaliada pelo Índice de Perda de Fenólicos (PLI) e pelo Rendimento de Remoção (YE), de acordo com as seguintes equações:

$$\text{PLI (\%)} = \frac{\text{Phn}_i - \text{Phn}_f}{\text{Phn}_i} \times 100$$

$$\text{YE (\%)} = \frac{\text{Phn}_i - \text{Phn}_f}{n^\circ \text{ dias}} \times 100$$

**Em que:**

Phn<sub>i</sub> - Concentração inicial de fenólicos (µg.mL<sup>-1</sup>); Phn<sub>f</sub> - Concentração final de fenólicos (µg.mL<sup>-1</sup>); N° dias - Número de dias do ensaio.

### **3.6 Avaliação da Toxicidade Final dos Efluentes**

A avaliação da toxicidade dos efluentes, após o processo de biorremediação com *C. vulgaris*, foi dividida em duas componentes: avaliação quantitativa e avaliação qualitativa.

Para a avaliação quantitativa da toxicidade dos efluentes foram utilizadas amostras finais dos ensaios *batch* para testes de germinação. Os testes de germinação foram realizados com sementes de alface (*Lactuca sativa*), incubadas em câmara controlada a 26 °C±1, durante sete dias, no escuro. As sementes utilizadas eram de origem comercial (Vita - Figura 3.8) e foram inicialmente mergulhadas numa solução de lixívia (UltraPro) a 50% durante 7 minutos, sendo de seguida lavadas abundantemente com água destilada.

Os ensaios foram efetuados em placas de Petri, previamente esterilizadas, forradas com círculos de papel de filtro. Com o auxílio de uma pipeta, o papel de filtro foi homogeneamente humedecido com 5 mL do efluente a testar.



**Figura 3.8** - Sementes de *Lactuca sativa* utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade.

Em cada placa foram colocadas dez sementes, igualmente distanciadas entre si, de forma a não interferirem com o crescimento umas das outras. Foram preparadas placas para o controlo positivo usando água destilada e um controlo negativo utilizando o efluente dos ensaios controlo, portanto sem tratamento de microalgas. Foi também realizado um controlo negativo com água ruça descongelada e com pH retificado, sem qualquer outro tipo de tratamento, designado por “branco sujo do momento”. Para cada ensaio foram consideradas 4 placas, num total de 40 sementes. Por fim, as placas foram vedadas com parafilme e postas a incubar. As amostras e os controlos foram realizados em quadruplicado.

Foi verificado o número de sementes germinadas durante as primeiras 24 e 48 horas e após o período total de incubação foram medidos o tamanho da radícula (radícula > 0,3 cm) e caule de cada semente. As medições foram expressas em centímetros (cm).

A atividade fitotóxica das águas ruças após os ensaios de biorremediação foi analisada pelo Índice de Resposta (IR), através da equação:

$$IR = \frac{\text{Test}}{\text{Control}} - 1$$

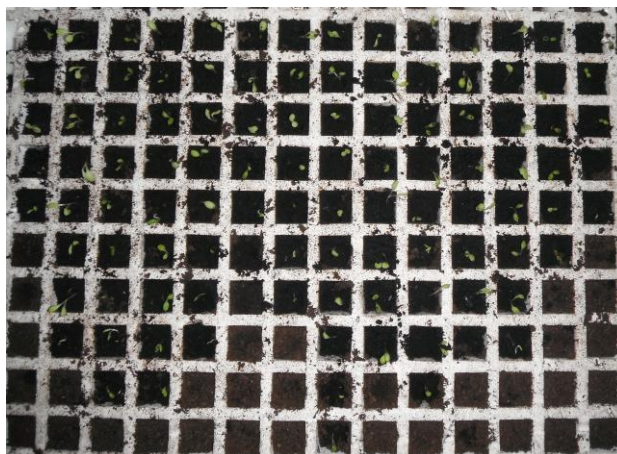
**Em que:**

Test - número total de sementes germinadas nos ensaios de biorremediação ou no controlo negativo; Control - número total de sementes germinadas em água destilada.

De acordo com Williamson e Richardson (1988), se  $-1 <IR> 0$ , então o efeito é classificado como inibitório; se  $0 <IR> 1$ , então o efeito é de estimulação.

Na análise qualitativa fez-se a avaliação comparativa do crescimento da alface, utilizando o mesmo tipo de sementes. Aqui o processo de germinação foi realizado da mesma forma (em placas de Petri) mas sob condições não controladas, isto é à temperatura ambiente. Foram testados os efluentes finais dos processos de biorremediação e para efeitos comparativos foi usado o efluente dos ensaios controle.

Após sete dias as mudas de alface foram transferidas, de forma separada, para cusetes com terra (Figura 3.9) e regadas diariamente com os efluentes. O crescimento decorreu numa estufa durante vinte e quatro dias, onde a temperatura esteve sujeita às condições atmosféricas presentes no mês de agosto do corrente ano. Para cada ensaio foram testadas dez sementes. Neste ensaio verificou-se o comportamento do crescimento da alface, assim como as características relacionadas com a sua textura e tamanho no final dos vinte e quatro dias.



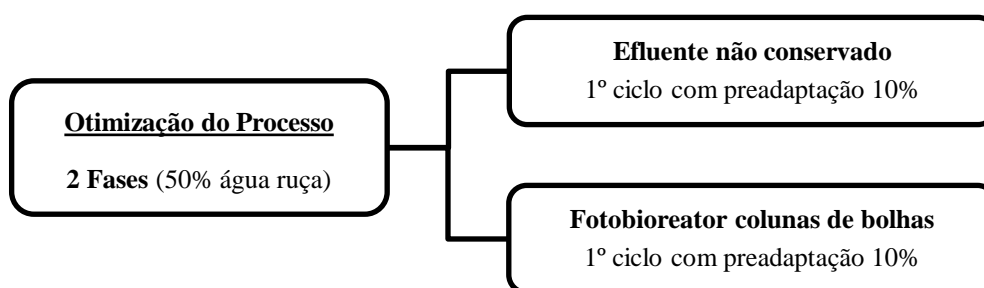
**Figura 3.9** - Cusetes agrícolas com *Lactuca sativa* após a sua transplantação.

### **3.7 Otimização do Processo**

A otimização do processo foi avaliada no decurso dos ensaios em *batch*, nomeadamente pela utilização de 2º ciclo e 2º tratamento, pela utilização de inóculos preadaptados e pela redução do tempo de cultura. Para além disso, a otimização do processo foi realizada em duas vertentes: numa foi analisada a capacidade de biotratamento quando o efluente praticamente não é sujeito a conservação (em oposição

à acidificação e posterior congelação), na outra foi otimizado o tipo de reator (Figura 3.10). Estes ensaios foram realizados durante seis e oito dias, respetivamente, rentabilizando também o período de duração dos ensaios.

Para esse efeito foram construídos fotobiorreatores de colunas de bolhas que foram operados em regime permanente de luz. Na otimização do processo foi utilizado o efluente de duas fases, dada à existência em maior escala deste tipo de lagares, e testada a concentração de 50%.



**Figura 3.10** – Vertentes de otimização do processo de biotratamento, com água ruça de 2 fases.

### 3.8 Tratamento de Dados

O tratamento de dados foi efetuado utilizando o *software* estatístico SPSS 22.0 e um nível de significância de 5%. Os dados dos compostos fenólicos foram analisados usando ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas (Post-Hoc) e recorrendo ao teste de Mann-Whitney quando comparados em paralelo. Os resultados dos ensaios de germinação foram comparados através de um teste T de Student e usando ANOVA e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  DP (Desvio Padrão da média).

## **4 Resultados e Discussão**

---

#### 4.1 *Screening* do Crescimento das Microalgas

A capacidade de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* na presença de efluentes com elevado teor de compostos fenólicos foi avaliada a partir de várias diluições de águas ruças em agar sólido. As diluições testadas estavam compreendidas entre 10 e 70% (v/v), sendo os efluentes de águas ruças caracterizados como duas e três fases.

O *screening* inicial das águas ruças de três fases mostrou ausência total de crescimento da *C. vulgaris* para todas as diluições testadas. Apesar de ter sido usado inóculo numa concentração elevada, 80 µL de cultura na fase exponencial com densidade de  $15 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, não foram observadas células, mesmo após os 15 dias de incubação. De facto, as placas do controlo de crescimento mostraram a formação de colónias ao fim dos primeiros dias de incubação. Estes ensaios foram repetidos mais uma vez, utilizando o mesmo protocolo, verificando-se na mesma ausência de crescimento em todas as diluições. Estes resultados sugerem que estas águas ruças, mesmo quando muito diluídas, têm efeitos tóxicos que inibem o crescimento das microalgas. De facto, as águas ruças de três fases apresentam elevada carga orgânica, bem como a presença de substâncias com capacidades fitotóxicas e antimicrobianas, tais como compostos fenólicos (Capasso *et al.*, 1995; Paixão *et al.*, 1999; Casa *et al.*, 2003).

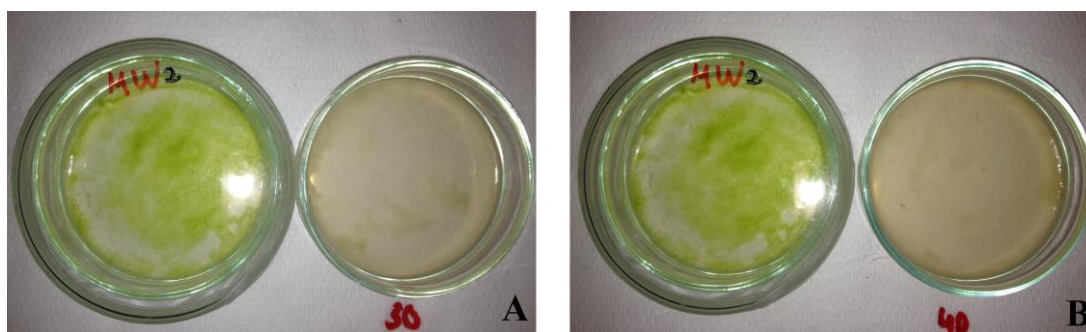
Para o *screening* das águas ruças de duas fases foram usados como inóculo os 80 µL de uma cultura, na fase exponencial e com densidade de  $18 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que a *C. vulgaris* apresentou capacidade de crescer praticamente em todas as diluições testadas. Foram observadas maior densidade de células, bem como maior velocidade de crescimento, nas placas entre 20-40% diluições (Figura 4.1), sendo dependente do tempo para ficarem bastante semelhantes às placas de controlo de crescimento. Comparativamente, as mais baixas densidades de células foram observadas nas placas a 10% e a partir das diluições de 50% (Tabela 4.1). No primeiro caso os resultados sugerem uma limitação do crescimento das microalgas por baixa quantidade de nutrientes, visto que as diluições foram feitas com água destilada. No segundo caso, para as diluições entre 50-70%, os resultados apontam para uma limitação do crescimento pela presença de substâncias tóxicas. De facto, estas águas ruças contêm também um elevado teor de compostos orgânicos tóxicos, tais como compostos fenólicos e ácidos gordos livres, capazes de inibir o crescimento da biomassa algal (Stom e Roth, 1981;

Aruoja *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2013), no entanto em menores concentrações comparativamente às águas ruças de três fases (Borja *et al.*, 2002, 2006).

**Tabela 4.1** - Perfil de crescimento da *C. vulgaris* obtido no *screening* inicial, na presença de diferentes diluições de águas ruças de 2 fases.

Parâmetros	Tempo		
	Dia 5	Dia 12	Dia 14
<b>Controlo de crescimento</b>	+++	+++++	+++++++
10%	+	++/-	++/-
20%	+	++++	+++++/-
30%	++	+++++	+++++++
40%	+	+++	+++++
50%	+	++	+++/-
60%	+	+/-	+/-
70%	-	+/-	+/-

(-) Ausência de crescimento, (+) Crescimento



**Figura 4.1** - *Screening* do crescimento da *C. vulgaris* em água ruça de 2 fases, ao fim de 14 dias: (A) Placa do controlo e placa do ensaio com diluição de 30%; (B) Placa do controlo e placa do ensaio com diluição de 40%.

Face a estes resultados, os ensaios de biorremediação em *batch* foram efetuados com águas ruças de duas fases à diluição de 35% e posteriormente à diluição de 50% e 60%. No caso das águas ruças de três fases, apesar da ausência de crescimento verificada, procederam-se a ensaios de biorremediação com o efluente diluído a 20%, mas utilizando o meio Walne modificado, por substituição da água destilada.

## 4.2 Ensaio de Biorremediação

Dado que os ensaios de biorremediação foram desenvolvidos em diferentes condições, os resultados serão apresentados para cada série. Por outro lado, a biorremediação é um processo que utiliza organismos vivos tais como: fungos, plantas, microalgas ou bactérias com a finalidade de reduzir ou remover contaminações no ambiente. Uma característica importante desta tecnologia é o facto de ocorrer em ambientes abertos e não esterilizados (Silva, 2009). No caso em estudo, apesar destas culturas terem sido realizadas em condições não axênicas, o preparado inicial foi sujeito a uma breve esterilização, de modo a tentar obviar possíveis efeitos de outras populações microbianas presentes nos efluentes.

### 4.2.1 Culturas *batch* - Três fases

#### ▪ Série 1- Pré-ensaio

Inicialmente foi efetuado um pré-ensaio de forma a testar a capacidade de crescimento da microalga na presença do efluente diluído a 20%, em meio Walne modificado. Este pré-ensaio foi efetuado em duplicado, cultura A e cultura B, em volumes de 1000 mL e inoculado com esferas de alginato de sódio à concentração de  $24 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, e com uma relação de volume de efluente por volume de microalgas aproximadamente de 20 (v/v). Estas culturas foram colocadas em aerificação na sala de cultura, com as condições já referidas anteriormente, durante um período de 13 dias. No final do período de fermentação foi medido o pH das culturas e o volume final das células imobilizadas de *C. vulgaris*. Na tabela 4.2 são apresentadas as características iniciais e finais destas culturas.

**Tabela 4.2** - Características iniciais e finais das culturas, pré-ensaio, 3 fases. (A e B duplicados).

	<b>Cultura A</b>	<b>Cultura B</b>
<b>pH inicial</b>	4,11	4,12
<b>pH final</b>	5,01	6,19
<b>Volume Incrementado microalgas (%)</b>	60	88

De acordo com os resultados, observou-se um ligeiro aumento do pH das culturas e um aumento no volume total das esferas com microalgas imobilizadas. Dado que não

houve adição de mais esferas de microalgas imobilizadas, durante a fermentação, o aumento relativo do seu volume poderá indicar um aumento da biomassa algal dentro das esferas. De facto, as células imobilizadas são mais resistentes a condições adversas, uma vez que a matriz (alginato de sódio) de imobilização geralmente resulta em maior proteção a estas células (Canilha *et al.*, 2006).

▪ **Série 2**

Com base nos resultados anteriores, procederam-se a ensaios de biorremediação, mantendo o efluente diluído a 20%, em meio Walne modificado. Nesta série foram também desenvolvidos os controlos que incluíram culturas inoculadas com esferas de alginato de sódio sem microalgas. Esta série incluiu também um 2º ciclo, no qual se procedeu a um novo tratamento utilizando *C. vulgaris* resultante do pré-ensaio. De salientar que as microalgas utilizadas foram desmobilizadas previamente, lavadas, re-suspensas em meio por uma noite e novamente imobilizadas.

Em todos os ensaios a relação de volume de efluente por volume de microalgas foi 20 (v/v) e todos os ensaios foram realizados em triplicado. O 1º ciclo (biorremediação a 20%) foi inoculado com esferas de alginato de sódio à concentração de  $6,7 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e o 2º ciclo com esferas à concentração de  $3,4 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Ambos os ensaios tiveram a duração de 19 dias.

Ao longo do período de fermentação foram realizadas medições de pH das culturas, de modo a verificar se o tratamento do efluente tinha capacidade de transformar uma cultura ácida numa cultura de pH neutro. Na tabela 4.3 apresentam-se os valores de pH da biorremediação de 1º ciclo e 2º ciclo ao longo do tempo de ensaio. Os resultados mostram um ligeiro aumento do pH para todas as culturas, de um modo geral de pH 4,50 para pH 5,80. O maior incremento de pH ocorreu no 2º ciclo, o que pode traduzir o efeito da preadaptação das células de *C. vulgaris*.

**Tabela 4.3** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 2, 3 fases.

(n= 3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 13</b>	<b>Dia 19</b>
<b>1º Ciclo</b>	4,70 ± 0,04	5,03 ± 0,06	5,13 ± 0,15
<b>2º Ciclo</b>	4,27 ± 0,02	5,37 ± 0,01	6,46 ± 0,56

## Fenóis totais

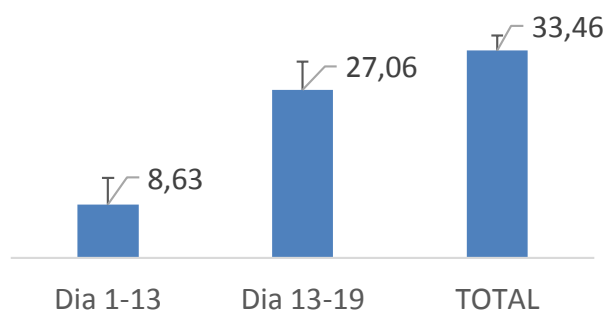
As culturas de 1º ciclo foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de  $24 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,35$  e no final do período de fermentação verificou-se que a microalga imobilizada teve a capacidade de reduzir o conteúdo para  $16 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,80$ , como se pode analisar na tabela 4.4. A eficácia de remoção dos compostos fenólicos, avaliada pelo Índice de Perda de Fenólicos (PLI) e pelo Rendimento de Remoção (YE), mostrou no fim da fermentação que as culturas alcançaram um PLI de  $33 \% \pm 2,37$  e um YE de  $45\% \pm 2,53$ .

**Tabela 4.4** - Teor de compostos fenólicos totais ao longo de 19 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 2, 3 fases.  
(n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 13</b>	<b>Dia 19</b>
<b>1ºCiclo</b>	$24,04 \pm 0,35$	$21,97 \pm 1,05$	$16,00 \pm 0,80$
<b>2ºCiclo</b>	$27,26 \pm 2,09$	$27,13 \pm 0,43$	$19,71 \pm 0,99$

No entanto, as culturas controlo mostraram também perda de fenólicos, tendo sido iniciadas com um teor médio de  $20 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,95$  e chegando aos  $10 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1,34$  no final da fermentação. Comparativamente, as culturas controlo apresentaram maior capacidade de remoção dos compostos fenólicos, alcançando um PLI de  $48\% \pm 8,38$  e um YE de  $54\% \pm 11,57$ . O facto das culturas controlo possuírem maior capacidade de remoção de compostos fenólicos poderá estar associada à presença de consórcios de microrganismos, ou seja, as águas ruças em termos microbiológicos possuem um número considerável de fungos e bactérias capazes de contribuir para a diminuição da toxicidade deste efluente. Segundo Marinho (2009), as águas residuais de lagares de azeite apresentam uma elevada abundância de microrganismos que incluem bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Tendo em conta as propriedades antimicrobianas das águas ruças, muitas bactérias, fungos filamentosos e leveduras são resistentes aos fenóis e conseguem crescer e desenvolver-se na sua presença (Deschamps, 1989; Scalbert, 1991; Bhat *et al.*, 1998). Assim conclui-se que apesar do efluente ter sido sujeito a esterilização breve, parte destes microrganismos podem ter resistido e podem contribuir para a degradação dos compostos fenólicos. Por outro lado, a diferença de remoção de compostos fenólicos nas culturas com *C. vulgaris*, pode ser associada a fenómenos de predação/competição. Ou seja, nas culturas com *C. vulgaris* a capacidade de remoção é menor provavelmente porque a microalga pode competir com os microrganismos pelos

substratos existentes no meio, e/ou podem ocorrer fenómenos de predação dos microrganismos em relação à microalga.



**Figura 4.2** - Perda de compostos fenólicos, em culturas de biorremediação ao longo de 19 dias, PLI (%), série 2, 3 fases.

A eficácia de remoção dos compostos fenólicos variou ao longo do tempo para as culturas com *C. vulgaris*. De acordo com a figura 4.2 verifica-se que nos primeiros treze dias de ensaio o Índice de Perda de Fenólicos (PLI) é menor, comparativamente aos dias subsequentes. Este resultado pode estar associado a uma fase de adaptação da microalga, visto que esta se encontrava antes de inoculada num meio favorável em nutrientes e foi inserida num meio com uma elevada carga de compostos orgânicos tóxicos. Contudo nos últimos dias de ensaio, entre o 13º dia e o 19º dia, o PLI já se encontrava muito próximo do valor total (PLI total de 33%  $\pm$  2,37) o que reforça a fase de adaptação da microalga.

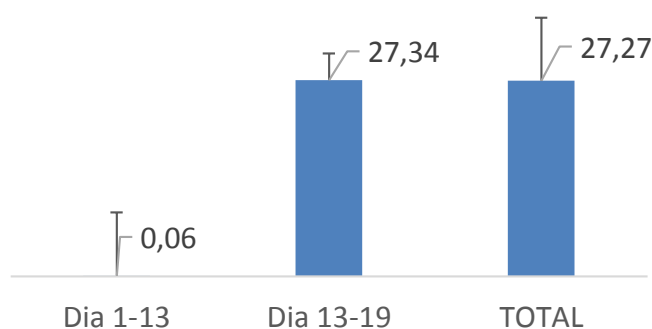
As culturas de 2º ciclo foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de 27  $\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\pm$  2,09 e no final do período de fermentação verificou-se que este valor foi reduzido para 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\pm$  0,99 (Tabela 4.4). O objetivo deste ensaio era verificar se as microalgas apresentavam capacidade para remover os compostos fenólicos quando usadas em mais do que um tratamento sucessivo.

A eficácia de remoção dos compostos fenólicos mostrou alguma variabilidade ao fim de 19 dias de fermentação, com um PLI de 27%  $\pm$  8,01 e um YE de 42%  $\pm$  16,63. Tendo em conta os resultados do 1º ciclo pode-se concluir que o facto de a microalga ter sido sujeita a um segundo ciclo não afetou a sua capacidade de remover os compostos fenólicos, como se pode verificar na tabela 4.5. Contudo é de salientar que a concentração do inóculo nas esferas das culturas de 1º e 2º ciclo foi diferente, já que no 1º ciclo foram  $6,7 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e no 2º ciclo  $3,4 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Estes resultados sugerem que apesar da menor concentração de inóculo, a eficácia de remoção dos compostos fenólicos foi mantida à custa de um fenómeno de preadaptação.

**Tabela 4.5** - Desempenho da *C. vulgaris* através da análise comparativa entre o 1º e 2º ciclo, série 2, 3 fases.

	<b>1º Ciclo</b>	<b>2ºCiclo</b>
<b>PLI (%)</b>	33,46 ± 2,37	27,27 ± 8,01
<b>YE (%)</b>	44,67 ± 2,53	41,97 ± 16,63

Também aqui a eficácia de remoção dos compostos fenólicos variou ao longo do tempo (Figura 4.3). O PLI no início foi muito baixo, o que pode dever-se à baixa densidade celular do inóculo e a possíveis efeitos resultantes da desmobilização do 1º ciclo e imobilização para o 2º ciclo.



**Figura 4.3** - Perda de compostos fenólicos ao longo de 19 dias, PLI (%), série 2, 2º ciclo, 3 fases.

### ▪ **Série 3**

Com base nestes resultados repetiram-se os ensaios de biorremediação, mas com avaliação de teor de fenóis totais em quatro momentos. Além disso, esta série incluiu também um 2º tratamento, ou seja o efluente tratado na série 2 foi novamente submetido a processo de biorremediação. Para este ensaio, foi escolhido aleatoriamente o efluente final resultante do ensaio E3 do 1º ciclo, realizado na série anterior.

Tanto o 1º ciclo (repetição a 20%), como o 2º tratamento, foram inoculados com esferas de alginato de sódio à concentração de  $5,5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Ambos os ensaios tiveram a duração de 18 dias. Após o período de fermentação verificou-se um aumento do pH, chegando no 1º ciclo a valores de  $6,77 \pm 1,33$ . No entanto no 2º tratamento, o valor do pH apresentou uma variação muito reduzida (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 3, 3 fases.

(n=3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	<b>Dia 18</b>
<b>1º Ciclo (repetição)</b>	4,18 ± 0,01	5,81 ± 0,75	6,03 ± 1,00	6,77 ± 1,33
<b>2ºtratamento</b>	4,95 ± 0,02	4,96 ± 0,06	5,09 ± 0,01	5,06 ± 0,57

### Fenóis totais

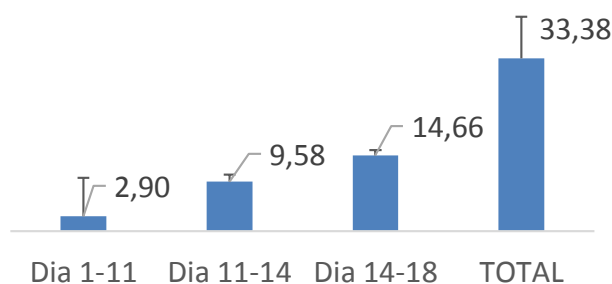
Os ensaios de 1º ciclo tinham como objetivo confirmar os resultados anteriores, ou seja, se as células imobilizadas de *C. vulgaris* tinham uma capacidade de remoção de compostos fenólicos constante, nas mesmas condições. Por outro lado, foi também objetivo comparar a eficácia de um segundo tratamento do efluente. As culturas de 1º ciclo foram iniciadas com um teor de fenóis totais de  $22 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1,52$  e no final o teor de fenóis foi reduzido para  $15 \pm 1,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7** - Teor de compostos fenólicos ao longo de 18 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 3, 3 fases.

(n=3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	<b>Dia 18</b>
<b>1º Ciclo (repetição)</b>	22,12 ± 1,52	21,41 ± 0,79	19,36 ± 0,79	14,67 ± 1,04
<b>2ºTratamento</b>	21,22 ± 0,79	21,74 ± 1,12	19,27 ± 1,54	17,58 ± 1,29

A eficácia de remoção dos compostos fenólicos mostrou que as culturas alcançaram um PLI de  $33\% \pm 8,02$  e um YE de  $44\% \pm 12,69$ . Comparativamente à eficácia de remoção obtida na série anterior conclui-se que estes valores são semelhantes e que aparentemente as diferentes concentrações de inóculo nas esferas de alginato de sódio não influenciam a perda de fenóis. Tal como nos ensaios de 1º ciclo anteriores, a perda de fenóis dependeu do tempo de cultura, provavelmente por adaptação do inóculo (Figura 4.4).



**Figura 4.4** - Perda de compostos fenólicos ao longo de 18 dias, PLI (%), série 3, 3 fases.

O 2º tratamento foi iniciado com um teor de fenóis totais de  $21 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,79$  e após 18 dias de cultura verificou-se uma redução para  $18 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1,29$  (Tabela 4.7). Tendo em conta que o 2º tratamento foi realizado com o efluente do ensaio E3 do 1º ciclo da série 2, verifica-se uma discrepância no teor inicial de fenóis totais, ou seja, seria de esperar que os valores iniciais fossem à volta de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 4.4). Dado que o efluente resultante do ensaio E3 foi sujeito a esterilização, antes do início deste 2º tratamento, a evaporação ocorrida provavelmente contribuiu para o aumento da concentração em fenóis totais.

Aqui a eficácia de remoção dos compostos fenólicos, mostrou ao fim de 18 dias de ensaio, um PLI de  $17\% \pm 8,87$  e um YE de  $21\% \pm 11,91$ . Comparando com os 1ºs ciclos das séries anteriores (série 2 e série 3) verificou-se uma redução para cerca de metade da eficácia de remoção dos compostos fenólicos. Este facto poderá estar associado à degradação inicial de compostos fenólicos simples, ocorrida no 1º ciclo, e à presença de fração fenólica de elevado peso molecular remanescente e mais difícil de degradar pelas microalgas (Tsagaraki *et al.*, 2007; Justino *et al.*, 2012). Assim, os resultados obtidos sugerem uma diminuição da eficácia para biotratamentos sucessivos e por isso de baixa aplicabilidade.

#### ▪ **Série 4**

Na série 4 foram executados dois tipos de ensaios de biorremediação em paralelo: com e sem preadaptação do inóculo. As culturas em *batch* foram realizadas nas mesmas condições, durante 14 dias para as culturas sem adaptação e durante 15 dias para as culturas com adaptação. As culturas sem adaptação foram inoculadas com esferas de alginato de sódio à concentração de  $3,9 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. A preadaptação de *C. vulgaris* foi realizada durante três dias em culturas com 2,5% (v/v) de água ruça de três fases em

meio de Walne, após o período de preadaptação a cultura foi imobilizada, obtendo-se esferas de alginato de sódio à concentração de  $4,3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>.

No decorrer do período de fermentação, um dos triplicados das culturas sem adaptação partiu (E1), pelo que se passou a trabalhar com duplicados. De um modo geral, o pH de todas as culturas aumentou, respetivamente  $6,94 \pm 0,76$  e  $6,87 \pm 0,09$  (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 4, 3 fases.  
(n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	
<b>Sem adaptação</b>	4,20 $\pm$ 0,02	5,69* $\pm$ 0,21	6,94* $\pm$ 0,76	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 15</b>
<b>Com adaptação</b>	4,16 $\pm$ 0,01	5,95 $\pm$ 1,04	7,00 $\pm$ 0,38	6,87 $\pm$ 0,09

(\*) n=2

### Fenóis totais

Esta série foi realizada com o intuito de comparar a eficácia da biorremediação em culturas com as mesmas condições, na presença de células imobilizadas de *C. vulgaris* sem adaptação e com adaptação prévia ao meio. As culturas sem adaptação foram iniciadas com um teor de fenóis totais de  $26 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,69$  e após 14 dias de ensaio o teor foi reduzido para  $20 \pm 0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , por sua vez as culturas com adaptação foram iniciadas com uma concentração de fenólicos totais de  $28 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,29$  e no final do período de ensaio apresentavam um teor médio de  $16 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 2,5$  (Tabela 4.9).

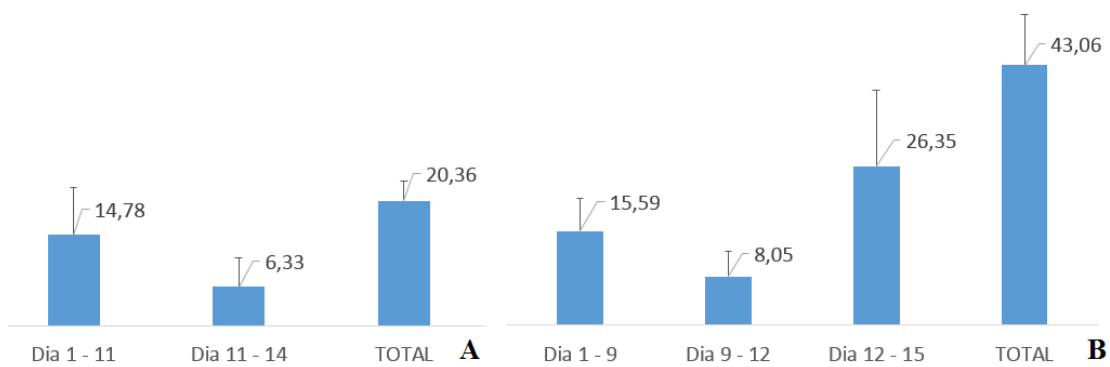
**Tabela 4.9** - Teor de compostos fenólicos ao longo do ensaio ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 4, 3 fases.  
(n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	
<b>Sem adaptação</b>	25,69 $\pm$ 0,69	21,86* $\pm$ 1,14	20,45* $\pm$ 0,05	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 15</b>
<b>Com adaptação</b>	27,89 $\pm$ 0,29	23,53 $\pm$ 1,3	21,62 $\pm$ 1,21	15,90 $\pm$ 2,50

(\*) n=2

Em termos da eficácia de remoção dos compostos fenólicos, a cultura sem adaptação apresentava um PLI de  $20\% \pm 3,22$  e um YE de  $40\% \pm 7,84$ , por sua vez a cultura com preadaptação apresentava um PLI de  $43\% \pm 8,43$  e um YE de  $71\% \pm 13,12$

(Figura 4.5). Verifica-se que a eficácia de remoção dos compostos fenólicos nas culturas com adaptação da microalga é significativamente superior, comparativamente com as culturas sem preadaptação. De facto este aspeto não é de estranhar pois a fase lag correspondente à fase de adaptação fisiológica às condições do novo meio de cultura, pode ser encurtada tendo em conta a concentração e o estado fisiológico do inóculo.



**Figura 4.5** – Perda de compostos fenólicos PLI (%), série 4, 3 fases: (A) Ensaio de biorremediação sem adaptação; (B) Ensaio de biorremediação com adaptação.

Neste ensaio mais uma vez, nas culturas controlo foi observado uma diminuição do teor em fenóis, apresentando estas um PLI de  $32\% \pm 3,75$  e um YE de  $69\% \pm 10,48$ .

Na tabela 4.10 encontra-se o resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de três fases. Analisando os resultados da série 2 verifica-se que a capacidade de remoção dos compostos fenólicos não é afetada pelo facto de a microalga ter sido sujeita a um segundo ciclo. Na série 3 onde foi analisada a viabilidade de dois biotratamentos sucessivos, verifica-se que a eficiência na remoção de compostos fenólicos sofre um decréscimo, provavelmente associado à presença de compostos de elevado peso molecular que possuem um carácter mais recalcitrante na degradação. Por fim, analisando a série 4 verifica-se uma maior eficiência na remoção de compostos fenólicos quando se usa *C. vulgaris* preadaptada. Assim pode-se concluir que no tratamento por biorremediação do efluente de três fases, a preadaptação do inóculo é uma mais-valia.

**Tabela 4.10** - Tabela resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de 3 fases.

(M ± DP)

	<b>Teor Inicial de Fenóis</b> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<b>Inóculo</b> ( $\text{cél.mL}^{-1}$ )	<b>Duração</b> (dias)	<b>PLI</b> (%)	<b>YE</b> (%)	
<b>Série 2</b>	1º Ciclo	24,04 ± 0,35	6,7×10 <sup>6</sup>	19	33 ± 2,37 <sup>a</sup>	45 ± 2,53 <sup>a</sup>
	2ºCiclo	27,26 ± 2,09	3,4×10 <sup>6</sup>	19	27 ± 8,01 <sup>a</sup>	42 ± 16,63 <sup>a</sup>
	Controlo	20,23 ± 0,95	-	19	48 ± 8,38 <sup>b</sup>	54 ± 11,57 <sup>a</sup>
<b>Série 3</b>	1º Ciclo (repetição)	22,12 ± 1,52	5,5×10 <sup>6</sup>	18	33 ± 8,02 <sup>a</sup>	44 ± 12,69 <sup>a</sup>
	2º Tratamento	21,22 ± 0,79	5,5×10 <sup>6</sup>	18	17 ± 8,87 <sup>c</sup>	21 ± 11,91 <sup>b</sup>
<b>Série 4</b>	Sem preadaptação	25,69 ± 0,69	3,9×10 <sup>6</sup>	14	20 ± 3,22 <sup>c</sup>	40 ± 7,84 <sup>a</sup>
	Com preadaptação	27,89 ± 0,29	4,3×10 <sup>6</sup>	15	43 ± 8,43 <sup>b</sup>	71 ± 13,12 <sup>c</sup>
	Controlo	27,90 ± 1,26	-	14	32 ± 3,75 <sup>a</sup>	69 ± 10,48 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias estatisticamente diferentes.

Comparando a capacidade de remoção dos fenóis pela *C. vulgaris*, com as culturas controlo, verificou-se que para 19 dias de fermentação, estas últimas apresentavam uma maior redução, podendo este fenómeno estar associado à presença de microrganismos, por sua vez nas culturas com *C. vulgaris* este efeito não é acumulativo e pode estar associado a fenómenos de predação dos microrganismos pelas microalgas e/ou fenómenos de competição por parte das microalgas e dos microrganismos pelos substratos existentes no meio.

No que respeita à concentração do inóculo verificou-se que esta não interfere com a capacidade de remoção dos compostos fenólicos, na gama testada. De acordo com a literatura, o aumento da concentração celular não interfere linearmente com a taxa

fermentativa, por outras palavras o aumento da densidade celular não simboliza uma maior eficácia na remoção/redução dos compostos fenólicos. Assim o aumento da concentração pode acarretar efeitos nefastos para as células mais internas das esferas, ou seja, devido à saturação das esferas a viabilidade das células será reduzida, podendo até produzir um efeito contrário ao pretendido (Garcez, 2014).

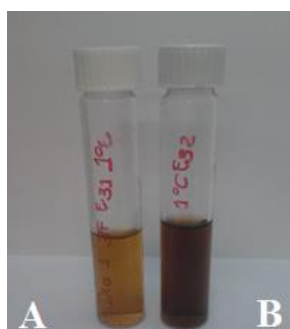
De forma a verificar a variação no perfil dos compostos fenólicos foram realizadas análises de cromatografia ao T1 e T13, para estas culturas (resultados obtidos em trabalho realizado pela equipa de investigação). Do perfil de compostos fenólicos destacam-se seis compostos, como ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido siríntrico, rutina, quercetina e ácido protocatecuico, tendo-se verificado que este último surge com maior concentração (Tabela 4.11). De facto, nas águas ruças já foram identificados mais de trinta compostos fenólicos, no entanto os mais representativos são o hidroxitiroso, tirosol, verbascosídeo, ácido vanílico, ácido cafeico, rutina, luteolina-7-O-glicosídeo, catecol, entre outros (Obied *et al.*, 2005). A partir da análise comparativa entre as culturas de 1º ciclo com a cultura controlo verificou-se que a última apresenta maior redução na concentração dos fenóis totais, tendo-se observado a degradação total da quercetina. Além disso, para todos os tipos de culturas observou-se a degradação total da rutina e ácido protocatecuico. Variações no perfil de fenólicos foram também encontradas por outros investigadores, durante processos de biotratamento (Daâssi *et al.*, 2014). No entanto verificou-se nas amostras do 1º ciclo que a concentração do ácido p-hidroxibenzóico se manteve e aumentou nas culturas de 2º ciclo e principalmente nas culturas controlo. O ácido siríntrico aumentou para todos os tipos de culturas, apesar do menor incremento ter sido observado nas culturas de 1º ciclo. Esta variação poderá ser devida eventualmente a compostos intermediários resultantes das vias de degradação. Comparando as amostras de 1º e 2º ciclo observou-se que as últimas apenas apresentam vantagens na degradação total da quercetina e que analisando o comportamento das resultantes substâncias se verificou um aumento de ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico e ácido siríntrico. Assim conclui-se que a *C. vulgaris* no ensaio de 2º ciclo não apresenta a capacidade de remoção destes fenóis.

**Tabela 4.11** - Perfil fenólico e respetiva variação após biotratamento durante 13 dias, 3 fases a 20% diluição. (n=3, M ± DP)

	Teor Inicial ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Peso seco)			Percentagem de Variação (%)*		
	1ºCiclo	2ºCiclo	Controlo	1ºCiclo	2ºCiclo	Controlo
<b>Ácido gálico</b>	89 ± 1,41	90,74 ± 1,41	59 ± 0,34	-10 ± 0,91	9 ± 3,15	-8 ± 2,13
<b>Ácido p-hidroxibenzóico</b>	30 ± 0,57	33,26 ± 1,56	7 ± 0,47	-0,9 ± 1,83	18 ± 2,65	421 ± 18,39
<b>Ácido protocatecuico</b>	923197 ± 16652	805042 ± 12130,04	687380 ± 2268,33	-100	-100	-100
<b>Ácido siríngico</b>	18 ± 0,36	13,43 ± 0,30	8 ± 0,14	13 ± 2,37	110 ± 3,24	225 ± 6,71
<b>Rutina</b>	4 ± 0,28	4,76 ± 0,54	2 ± 0,04	-100	-100	-100
<b>Quercetina</b>	8 ± 0,23	6,62 ± 0,08	5 ± 0,08	-24 ± 0,88	-100	-100

\* $(\text{teor t13}-\text{teor t1}) / \text{teor t1} * 100$ ; (-) redução

Por último, importa também referir que foram observadas alterações na cor dos efluentes ao longo dos ensaios. De facto, foi notório que inicialmente a coloração das amostras era mais clara comparativamente com a tonalidade no final do período de fermentação, conforme exemplo da figura 4.6. Este facto pode ser atribuído à oxidação dos compostos fenólicos devido ao arejamento das culturas, ocorrendo a polimerização em compostos fenólicos de elevada massa molecular que para além de difícil degradação, está relacionada com a tonalidade escura destes efluentes (Marinho, 2009).



**Figura 4.6** - Coloração das amostras de água ruça, 1º ciclo sem adaptação, série 4, 3 fases: (A) amostra inicial do efluente; (B) amostra final do efluente.

#### 4.2.2 Culturas *batch* - Duas fases

De acordo com os resultados obtidos no *screening* do crescimento de *C. vulgaris* na presença de águas ruças de duas fases, verificou-se que a maior capacidade de desenvolvimento da microalga ocorria nas diluições entre 20 a 40% (v/v). Assim, nas culturas *batch* foi testada a capacidade de remoção de compostos fenólicos pela *C. vulgaris* em diluições de 35%, no entanto também foram analisadas as diluições de 50% e 60% de forma a verificar o comportamento da biomassa inoculada na presença de maior carga poluente.

##### ▪ Série 1

Na série 1 foi analisado o comportamento da biomassa de *C. vulgaris* na presença de 35% de efluente diluído em água destilada. Estes ensaios de biorremediação incluíram também os controlos, com culturas com esferas de alginato de sódio sem microalgas. Em todos os ensaios a relação de volume de efluente por volume de microalgas foi 20 (v/v) e todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo tido a duração de 18 dias. Estes

ensaios foram iniciados com culturas inoculadas com esferas de alginato de sódio à concentração de  $5,35 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>.

Na tabela 4.12 está representada a variação do pH ao longo dos 18 dias de fermentação. Verifica-se que no 1º dia de ensaio os valores de pH são muito próximos, o mesmo não se verifica ao 18º dia de cultura onde se registou uma grande diferença entre culturas. Nas culturas de biorremediação, onde foram inoculadas células imobilizadas de *C. vulgaris*, ocorreu um aumento significativo de pH, no entanto a cultura controlo sofreu pouca variação de pH, continuando com valores reduzidos, ou seja, pH ácido. Atendendo a estes resultados conclui-se que a presença de *C. vulgaris* no tratamento do efluente de duas fases neutraliza o pH da cultura, o que por sua vez pode estar associada à remoção de compostos fenólicos.

**Tabela 4.12** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 1, 2 fases.  
(n=3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	<b>Dia 18</b>
<b>Série 1 - 35%</b>	4,36 ± 0,03	7,38 ± 0,10	7,18 ± 0,12	7,33 ± 0,15
<b>Controlo</b>	4,38 ± 0,01	4,61 ± 0,23	4,72 ± 0,34	4,83 ± 0,23

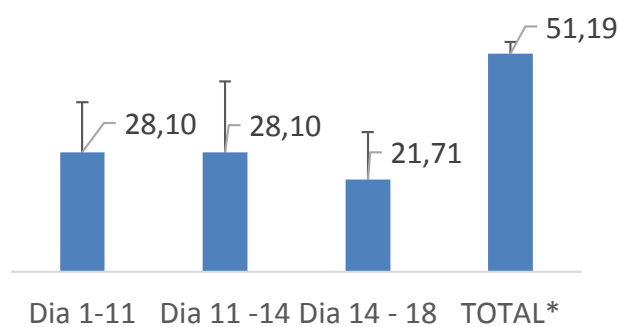
### Fenóis totais

As culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de  $6 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,34$  e após o período de ensaio verificou-se que a microalga imobilizada teve a capacidade de diminuir os fenóis totais para  $1,64 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,10$  (Tabela 4.13). Os valores do PLI e do YE obtidos foram  $73\% \pm 2,82$  e  $26\% \pm 2,46$ , respetivamente. No entanto a cultura controlo viu o seu teor de compostos fenólicos ser ligeiramente reduzido para  $4,96 \pm 0,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 4.13). Este aspeto pode ser justificado por reações de oxidação-redução da fração fenólica dos efluentes, promovidas pelo arejamento das culturas (Justino *et al.*, 2012; Komilis *et al.*, 2005). Este efluente, tal como o efluente de 3 fases, apresenta microrganismos contudo neste caso talvez devido à menor concentração de carga orgânica, o seu número seja mais reduzido. Assim, atendendo que estas culturas também foram sujeitas a esterilização os microrganismos presentes terão sido destruídos, não contribuindo para a remoção dos compostos fenólicos.

**Tabela 4.13** - Teor de compostos fenólicos ao longo de 18 dias ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), série 1, 2 fases.  
(n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 11</b>	<b>Dia 14</b>	<b>Dia 18</b>
<b>Série 1 - 35%</b>	6,11 $\pm$ 0,34	3,91 $\pm$ 0,52	2,61 $\pm$ 0,42	1,64 $\pm$ 0,10
<b>Controlo</b>	6,34 $\pm$ 0,13	5,86 $\pm$ 0,36	5,81 $\pm$ 0,50	4,96 $\pm$ 0,42

Para determinar o efeito exato da *C. vulgaris* imobilizada na redução dos polifenóis, os valores do PLI e do YE foram calculados tendo em conta os valores das culturas controlo. Assim, ao fim de 18 dias de fermentação, verificou-se um PLI líquido de  $51\% \pm 2,82$  e um YE líquido de  $18\% \pm 2,46$  (Figura 4.7).



**Figura 4.7** - Perda líquida de compostos fenólicos ao longo de 18 dias, PLI (%), série 1, 2 fases.  
(\*p < 0,05)

Considerando a variação do valor de PLI ao longo do tempo de tratamento, verifica-se que os valores foram bastante constantes, cerca de 28% (Figura 4.7). No entanto, considerado o período só até aos 14 dias de fermentação, obtém-se um PLI global de  $49\% \pm 6,28$ , e um YE global de  $23\% \pm 3,05$ , estatisticamente idênticos aos resultados obtidos após 18 dias ( $51\% \pm 2,82$  e  $18\% \pm 2,46$ , respetivamente). Assim, fermentações futuras foram desenvolvidas com menor tempo de tratamento.

#### ▪ Série 2

Nesta série foi realizado um 2º ciclo no qual se procedeu a um novo tratamento, em condições idênticas às anteriores, utilizando a *C. vulgaris* dos ensaios de biorremediação anteriores. Aqui, as esferas resultantes dos ensaios E1 a E3 foram homogeneizadas, lavadas e re-suspensas durante a noite em meio Walne modificado, portanto não foram desmobilizadas. Posteriormente foram inoculadas nas culturas de 2º

ciclo. Os ensaios foram realizados em duplicado e com base nos resultados anteriores estas culturas tiveram a duração de 14 dias.

Estas culturas sofreram um aumento dos valores médios de pH de  $4,12 \pm 0,01$  para  $7,02 \pm 0,01$  (Tabela 4.14). Comparativamente, para o mesmo tempo de fermentação, os ensaios da série 1 apresentaram valores de pH idênticos ( $\text{pH} = 7,18 \pm 0,12$ ). Assim pode-se concluir que pelo facto de ser utilizada a mesma biomassa imobilizada em dois tratamentos sucessivos, a capacidade de neutralizar o pH não é colocada em causa.

**Tabela 4.14** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 2, 2 fases.  
(n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 14</b>
<b>2ºCiclo</b> <b>35%</b>	$4,12 \pm 0,01$	$7,20 \pm 0,06$	$7,11 \pm 0,04$	$6,98 \pm 0,09$	$7,02 \pm 0,01$

### Fenóis Totais

Mais uma vez o objetivo deste ensaio foi verificar se as microalgas apresentavam capacidade para remover os compostos fenólicos quando usadas em mais do que um tratamento sucessivo. Estas culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de  $7,19 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,02$  que, após 14 dias, foi reduzido para  $2,16 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,51$  (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15** - Teor de compostos fenólicos ao longo de 14 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 2, 2 fases.  
(n=2, M  $\pm$  DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 6</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 14</b>
<b>2ºCiclo</b> <b>35%</b>	$7,19 \pm 0,02$	$4,95 \pm 0,81$	$3,09 \pm 1,51$	$2,12 \pm 0,59$	$2,16 \pm 0,51$

Aqui os valores do PLI e do YE obtidos foram  $70\% \pm 7,19$  e  $39\% \pm 4,07$ , respetivamente. Tal como anteriormente, para a determinação do efeito exato da *C. vulgaris* na redução do teor de compostos fenólicos do efluente, é utilizada a cultura controlo da série 1, neste caso considerando os valores do dia 14. Assim, foram obtidos um PLI líquido de  $62\% \pm 7,19$  e um YE líquido de  $35\% \pm 4,07$  (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16** - Comparação entre o ensaio de 1º ciclo e 2º ciclo a 35%, 2 fases  
(M ± DP).

	<b>1º Ciclo 35% Dia 18</b>	<b>2º Ciclo 35% Dia 14</b>
Phni ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	6,11 ± 0,34	7,19 ± 0,02
Phnf ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	1,64 ± 0,10	2,16 ± 0,51
PLI (%)	73,03 ± 2,82	69,95 ± 7,19
YE (%)	26,30 ± 2,46	38,70 ± 4,07
<b>PLI*-líquido (%)</b>	<b>51,19 ± 2,82<sup>a</sup></b>	<b>61,64 ± 7,19<sup>a</sup></b>
<b>YE*- líquido (%)</b>	<b>18,18 ± 2,46<sup>a</sup></b>	<b>34,68 ± 4,07<sup>b</sup></b>

Phni - Concentração inicial de fenólicos; Phnf – Concentração final de fenólicos; \* tendo em conta a cultura controlo; letras diferentes na mesma linha correspondem a médias significativamente diferentes

Os resultados sugerem que a utilização das microalgas em 2º ciclo mantem a eficácia na redução dos compostos fenólicos, ou seja os valores de PLI foram idênticos comparativamente aos obtidos no 1º ciclo. Por outro lado, as diferenças obtidas no rendimento poderão ser justificadas pela redução do tempo de tratamento.

### ▪ Série 3

Nesta série foram testadas as diluições de 50% e 60% (v/v) em água destilada. De forma a otimizar estes biotratamentos a cultura algal utilizada foi sujeita a uma preadaptação a 10% de água ruça em meio de cultura durante três dias, até se encontrar em fase exponencial de crescimento. Também a concentração de inóculo foi aumentada, ou seja a relação volume de efluente por volume de microalgas foi 20 (v/v), mas com esferas à concentração de  $14,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. O período de fermentação destas culturas foi de 8 dias. Nos primeiros dias de ensaio, devido a questões relacionadas com evaporação excessiva, verificou-se a perda de três culturas. Deste modo a cultura a 50% e os respetivos controlos só foram analisados em duplicado.

Para todas as culturas foi observado um aumento do pH, de um modo geral de valores à volta de  $4,12 \pm 0,14$  para valores de  $6,43 \pm 0,34$  (Tabela 4.17).

**Tabela 4.17** - Variação dos valores de pH ao longo do tempo de fermentação, série 3, 2 fases.

(n=3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 8</b>
<b>1º Ciclo 50%</b>	4,30 ± 0,03	7,06* ± 0,04	6,91* ± 0,05
<b>Controlo 50%</b>	4,20 ± 0,05	6,59* ± 0,16	6,62* ± 0,04
<b>1º Ciclo 60%</b>	4,00 ± 0,05	7,16 ± 0,09	6,74 ± 0,15
<b>Controlo 60%</b>	4,00	6,47* ± 0,09	6,07* ± 0,35

(\*) Cultura partida, n=2.

### Fenóis Totais

O objetivo desta série foi analisar a capacidade de remoção de fenóis por parte da *C. vulgaris*, na presença de maior quantidade destes compostos, em águas ruças de duas fases. As culturas (50% e 60%) foram iniciadas com a mesma quantidade de biomassa imobilizada  $14,6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, no entanto comparativamente aos outros ensaios a concentração celular foi maior. As culturas de 50% foram iniciadas com um teor de fenóis totais de  $7,73 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,10$  e as de 60% com um teor de fenóis totais de  $10,04 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,20$ . Após 8 dias de ensaio verificou-se que o teor final de fenóis foi reduzido para  $3,36 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,16$  e para  $5,18 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1,00$ , respetivamente. Tal como nos ensaios anteriores, as culturas controlo apresentaram também um decréscimo no teor dos fenóis totais (Tabela.4.18).

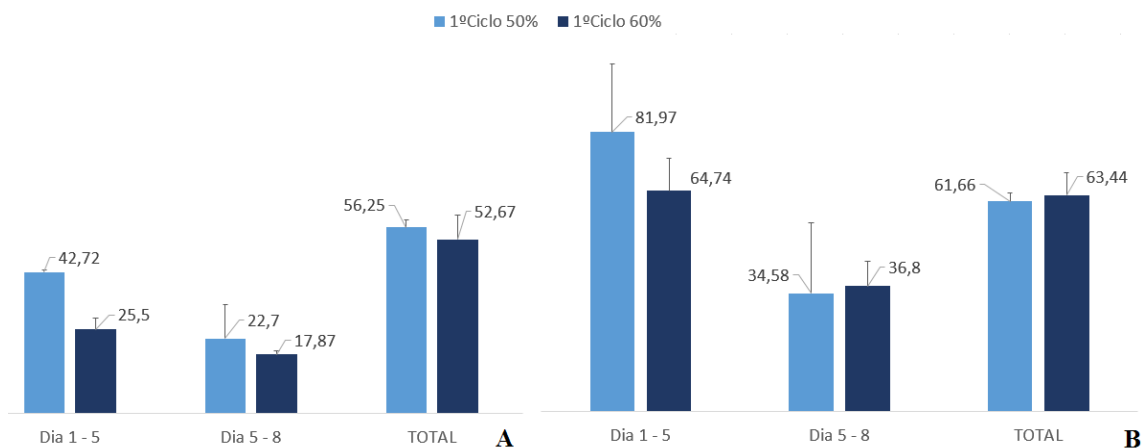
**Tabela 4.18** - Teor de compostos fenólicos ao longo de 8 dias ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), série 3, 2 fases.

(n=3, M ± DP)

	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 8</b>
<b>1º Ciclo 50%</b>	7,73 ± 0,10	4,39* ± 0,78	3,36* ± 0,16
<b>Controlo 50%</b>	7,54 ± 0,17	6,63* ± 0,69	4,57 * ± 1,09
<b>1º Ciclo 60%</b>	10,04 ± 0,20	6,73 ± 1,44	5,18 ± 1,00
<b>Controlo 60%</b>	10,33 ± 0,34	8,97 * ± 0,29	7,33 * ± 0,47

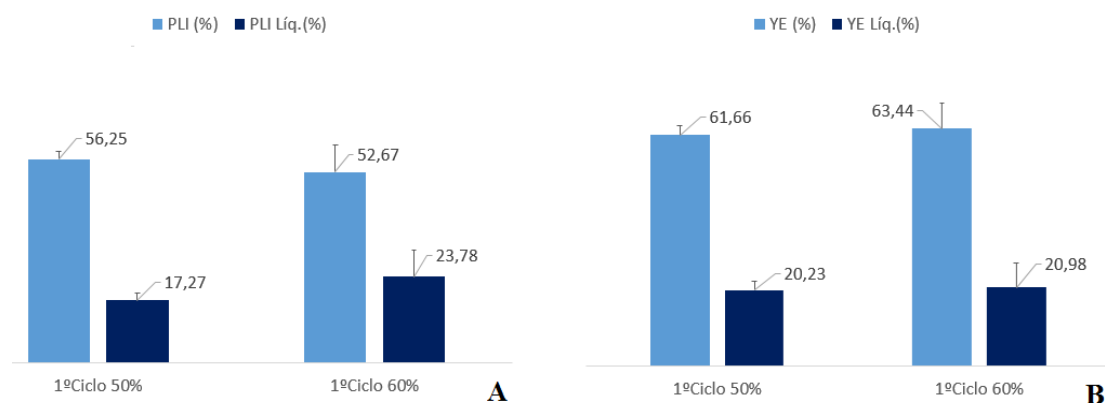
(\*) n=2

Para as culturas de biorremediação com 50% de efluente, os valores do PLI e do YE obtidos respetivamente, foram  $56\% \pm 2,13$  e  $62\% \pm 2,48$ . Por outro lado, para as culturas de 60% de efluente, obteve-se respetivamente  $53\% \pm 7,41$  e  $63\% \pm 6,62$ . (Figura 4.8).



**Figura 4.8** - Desempenho *C. vulgaris* na remoção de fenóis, 50% e 60%, 2 fases:  
(A) PLI (%); (B) YE (%).

Tendo em conta as perdas ocorridas no controlo, obteve-se para as culturas de biorremediação a 50% de efluente, um PLI líquido de  $17\% \pm 2,13$  e um YE líquido de  $20\% \pm 2,48$ . Por outro lado, para as culturas de biorremediação a 60% de efluente, o PLI líquido obtido foi de  $24\% \pm 7,41$  e o YE líquido de  $21\% \pm 6,62$ , não se observando diferenças entre diluições (Figura 4.9).



**Figura 4.9** - Remoção de fenóis nas culturas de biorremediação 50% e 60% 2 fases: (A) Comparação PLI (%) & PLI Líq.(%); (B) Comparação YE (%) & YE Líq.(%).

Na tabela 4.20 encontra-se o resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de duas fases. Analisando os resultados da série 1 e série 2, e tal como para as águas ruças de três fases, verifica-se que a capacidade de remoção dos compostos fenólicos não é afetada pelo facto de a microalga ter sido sujeita a um segundo ciclo. Segundo Hamdy *et al.* (1990), um dos motivos básicos para a aceitação das imobilização das células, encontra-se associada à reutilização do biocatalisador por mais de que um ciclo

fermentativo. Por outro lado, analisando os 1<sup>os</sup> ciclos de todas as séries, observa-se que com o aumento da concentração de fenóis no efluente a tratar, ou seja com a diminuição da diluição, como seria de esperar a capacidade de remoção dos fenólicos é reduzida. De facto, na série 3 a eficácia de remoção dos compostos fenólicos foi a menor, no entanto estes valores também podem estar relacionados com o aumento da concentração do inóculo, já que de acordo com Garcez (2014) a perda da viabilidade das células internas pode ter afetado a rentabilidade das células da periferia. Assim, de acordo com os resultados obtidos nesta série, os ensaios de otimização foram realizados com 50% de efluente e com uma redução da concentração do inóculo. Verificou-se também que o rendimento de remoção de fenólicos é incrementado com a redução dos dias de fermentação, nas gamas testadas.

Analisando o trabalho similar realizado por Pinto *et al.* (2003), onde foi testada a capacidade de remoção de fenólicos em águas ruças utilizando duas estirpes de microalgas resistentes a fenóis, verificam-se rendimentos distintos. De facto, estes autores em fermentações de cinco dias, em condições de ausência de luz, observaram que a *Scenedesmus quadricauda* e a *Ankistrodesmus braunii* conseguiam percentagens de remoção do teor de fenólicos entre 5 a 12%, para concentrações iniciais de 1,5 g fenóis totais/L, diluído a 1:10. Comparativamente, os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que no tratamento das águas ruças de três fases, as percentagens brutas de remoção dos fenóis nos 1<sup>os</sup> ciclos variaram entre 20 a 43%, para concentrações iniciais de fenólicos de 22-28 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4.10). Por outro lado, considerando o tratamento das águas ruças de duas fases as percentagens brutas de remoção dos fenóis nos 1<sup>os</sup> ciclos variaram entre 53 a 73%, para concentrações iniciais de fenólicos de 6-10 µg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 4.20). Ensaio com *C. vulgaris* planctónica, desenvolvidos pela equipa de investigação, mostraram percentagens brutas de remoção dos fenóis (PLI µg/célula) até cerca de 66%, em águas ruças diluídas, no entanto para concentrações iniciais de fenóis totais no meio superiores, comparativamente a este trabalho.

Outros trabalhos mostraram valores de remoção dos fenóis bastante variável. Diferentes processos biológicos e vários microrganismos foram testados (Tabela 4.19) com o intuito de tratar as águas ruças, principalmente para remover a coloração escura e reduzir a carga orgânica. Diferentes bactérias foram testadas, tanto em processos aeróbios, como anaeróbios, incluindo *Azotobacter vinelandii* (Piperidou *et al.*, 2000), *Pseudomonas putida* e *Ralstonia* spp. (Di Gioia *et al.*, 2001), *Lactobacillus plantarum*,

isolado a partir da fermentação de salmoura de azeitona (Lourenço *et al.*, 2003), de um modo geral variando muito a sua eficácia na redução da fitotoxicidade das águas ruças. Uma variedade de fungos tem sido também usado para a biorremediação das águas ruças, tais como *Pleutorus ostreatus* (Aggelis *et al.*, 2003), *Geotrichum candidum* (Assas *et al.*, 2009a), de *Ganoderma applanatum* (Matos *et al.*, 2007). Verifica-se que para além da redução do COD (demanda química de oxigénio) e a remoção de fenóis simples, os fungos também são eficazes na redução da coloração das águas ruças. Tal como os fungos, as leveduras apresentam maior resistência às condições desfavoráveis apresentadas pelas águas ruças, assim foram desenvolvidos vários estudos com géneros de *Candida* (Giannoutsou *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2009; Ben Sassi *et al.*, 2008; Fadil *et al.*, 2003), *Yarrowia* (Lanciotti *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009), *Saccharomyces* (Giannoutsou *et al.*, 2004) e *Trichosporon* (Chtourou *et al.*, 2004), estas apresentam uma significativa redução do COD, no teor de compostos fenólicos e também na coloração do efluente.

**Tabela 4.19** - Tratamento biológico de águas ruças com diferentes tipos de microrganismos. Adaptado de Farshad (2012).

<b>Microrganismos</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Redução 70% COD	Piperidou <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas putida</i> e <i>Ralstonia</i> spp.	Biodegradação dos compostos aromáticos	Di Gioia <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Redução gradual da cor	Lourenço <i>et al.</i> , 2003
<i>Pleutorus ostreatus</i>	Redução de fenóis ( $\approx$ 100%)	Aggelis <i>et al.</i> , 2003
<i>Geotrichum candidum</i>	Redução 60% COD	Assas <i>et al.</i> , 2009a
<i>Ganoderma applanatum</i>	Redução de fenóis e cor	Matos <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida boidinii</i>	Redução de fenóis e cor	Giannoutsou <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida cylindracea</i>	Redução fenóis e COD	Gonçalves <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida holstii</i>	Redução 39% de fenóis	Ben Sassi <i>et al.</i> , 2008

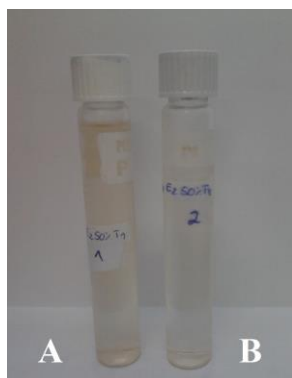
**Tabela 4.19** - Tratamento biológico de águas ruças com diferentes tipos de microrganismos. Adaptado de Farshad (2012). (Continuação)

<i>Candida tropicalis</i>	Redução 62,8% COD; Redução 51,7% de fenóis	Fadil <i>et al.</i> , 2003
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Redução 20-40% COD; <30% fenóis	Lanciotti <i>et al.</i> , 2005
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	Redução 67-82% COD	Wu <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccharomyces</i> spp.	Redução 61% de fenóis	Giannoutsou <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Remoção dos mono/polifenóis	Chtourou <i>et al.</i> , 2004

**Tabela 4.20** - Tabela resumo dos ensaios de biorremediação com água ruça de 2 fases. (M ± DP)

		<b>Teor Inicial de Fenóis</b> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	<b>Duração</b> (dias)	<b>Inóculo</b> (células.mL <sup>-1</sup> )	<b>PLI</b> (%)	<b>YE</b> (%)	<b>PLI Líq.</b> (%)	<b>YE Líq.</b> (%)
<b>Série 1</b>	1º Ciclo 35%	6,11 ± 0,34	18	5,35×10 <sup>6</sup>	73 ± 2,82 <sup>a</sup>	26 ± 2,46 <sup>a</sup>	51 ± 2,82 <sup>a</sup>	18 ± 2,46 <sup>a</sup>
	Controlo	6,34 ± 0,13	18	-	22 ± 5,55 <sup>b</sup>	8 ± 1,99 <sup>b</sup>	-	-
<b>Série 2</b>	2ºCiclo 35%	7,19 ± 0,02	14	5,35×10 <sup>6</sup>	70 ± 7,19 <sup>a</sup>	39 ± 4,07 <sup>c</sup>	62 ± 7,19 <sup>b</sup>	35 ± 4,07 <sup>b</sup>
<b>Série 3</b>	1º Ciclo 50%	7,73 ± 0,10	8	14,6 × 10 <sup>6</sup>	56 ± 2,13 <sup>c</sup>	62 ± 2,48 <sup>d</sup>	17 ± 2,13 <sup>c</sup>	20 ± 2,48 <sup>a</sup>
	Controlo 50%	7,54 ± 0,17	8	-	39 ± 13,17 <sup>b</sup>	41 ± 13,13 <sup>c</sup>	-	-
	1º Ciclo 60%	10,04 ± 0,20	8	14,6 × 10 <sup>6</sup>	53 ± 7,41 <sup>c</sup>	63 ± 6,62 <sup>d</sup>	24 ± 7,41 <sup>c</sup>	21 ± 6,62 <sup>a</sup>
	Controlo 60%	10,33 ± 0,34	8	-	29 ± 1,27 <sup>b</sup>	42 ± 0,06 <sup>c</sup>	-	-

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes



**Figura 4.10** - Coloração das amostras de água ruça, 1º ciclo, série 3, 2 fases: (A) amostra inicial do efluente; (B) amostra final do efluente.

Também aqui foram observadas alterações na cor dos efluentes ao longo dos ensaios, com a tonalidade no final do período de fermentação mais clara, comparativamente ao início, conforme exemplo da figura 4.10. Apesar de eventualmente existir a probabilidade de oxidação dos compostos fenólicos devido ao arejamento das culturas, ocorrendo a polimerização em compostos fenólicos de elevado peso molecular associados à coloração escura (Tsagaraki *et al.*, 2007), as microalgas aparentemente têm capacidade para os degradar, contrariamente ao que se conservou nos efluentes de 3 fases.

### 4.3 Avaliação da Toxicidade Final dos Efluentes

#### 4.3.1 Ensaios de Germinação

A análise quantitativa da fitotoxicidade dos efluentes foi avaliada pelos testes de germinação, tendo em conta a inibição da germinação e do crescimento da radícula e caule da *Lactuca sativa*. Os resultados são apresentados (à semelhança dos ensaios de biorremediação) por tipo de efluente.

##### ▪ Culturas com 20% de água ruça três fases

Para estes ensaios foram considerados os efluentes obtidos dos biotratamentos da série 4, com preadaptação e sem adaptação do inóculo, bem os efluentes finais do 2º ciclo da série 2. Para o controlo negativo foi utilizado o efluente dos ensaios controlo da série 4. Para todos os ensaios foi escolhido aleatoriamente um dos triplicados.

Os resultados das sementes germinadas encontram-se na tabela 4.21. Como seria de esperar as sementes do controlo positivo germinaram quase todas, pelo contrário das

sementes do controlo negativo, bem como do branco sujo do momento, nenhuma germinou. Analisando os ensaios com água ruça resultante dos biotratamentos, verifica-se maior capacidade de germinação no ensaio sem adaptação do inóculo, contrariamente ao que se verificou na quantificação dos fenóis finais, já que a maior redução foi observada quando se fez a preadaptação do inóculo de *C. vulgaris*. Também a capacidade de germinação no ensaio de 2º ciclo foi muito baixa.

Com base nos resultados da análise de cromatografia os compostos fenólicos monoméricos (ácido p-hidroxibenzóico e ácido siríngico), caracterizados pela sua atividade fitotóxica e antimicrobiana (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Sayadi *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2003, Sampedro *et al.*, 2004; Ergul *et al.*, 2009), encontravam-se em maior concentração nas amostras finais do 2º ciclo e controlo (Tabela 4.11). De facto, a toxicidade destes compostos fenólicos foi comprovada pelos ensaios de germinação (Tabela 4.21), onde se verificou ausência de crescimento no controlo negativo (cultura de controlo), sendo esta a amostra que apresentou também maior concentração destes compostos fenólicos, bem como baixa capacidade de germinação no ensaio de 2º ciclo.

**Tabela 4.21** - Resultados da germinação das sementes de *Lactuca sativa* com efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases.

	Nº sementes germinadas (24h)	Nº sementes germinadas (48h)	Nº sementes germinadas (7 dias)	Germinação final (%)	IR
Controlo positivo (água)	38	38	38	95	-
Controlo negativo (sem tratamento)	0	0	0	0	-1
Branco sujo do momento	0	0	0	0	-1
Biotratamento 1º ciclo sem adaptação	1	7	9	22,5	-0,76
Biotratamento 1º ciclo com adaptação	3	4	5	12,5	-0,87
Biotratamento 2º Ciclo	1	1	1	2,5	-0,97

Segundo o critério de Williamson e Richardson (1988), se o Índice de Resposta (IR) se encontrar entre -1 e 0 considera-se que existe efeito inibitório. Neste caso (Tabela

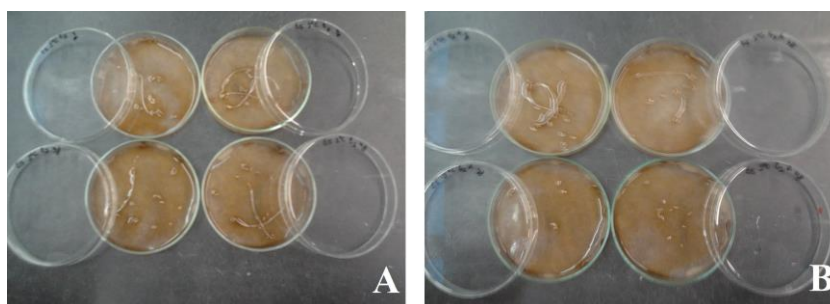
4.21) verifica-se um efeito inibitório por parte dos efluentes de três fases na germinação da *L. sativa*, sendo ele justificado eventualmente pela presença de substâncias com capacidades fitotóxicas e antimicrobianas (Capasso *et al.*, 1995; Paixão *et al.*, 1999; Casa *et al.*, 2003). Apesar disso, observa-se uma tendência de diminuição do efeito inibitório, quando é aplicado o biotratamento com *C. vulgaris*.

Tendo em conta os resultados da germinação, o crescimento médio da radícula e caule foi calculado para alguns dos ensaios (Tabela 4.22 e Figura 4.11). Verifica-se que o comprimento das radículas entre ensaios de águas ruças resultante dos biotratamentos, não é diferente, no entanto é menor comparativamente ao controlo positivo, o que evidencia o carácter tóxico destes efluentes. Por outro lado não se observaram diferenças entre os comprimentos dos caules dos biotratamentos, comparativamente ao controlo, o que sugere que o tratamento das águas ruças de três fases com microalgas tem algum efeito benéfico na toxicidade final deste efluente.

**Tabela 4.22** - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases. (n=40, M ± DP)

	<b>Radícula</b>	<b>Caule</b>
Controlo positivo - água	4,14 ± 1,09 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,82 <sup>c</sup>
Inóculo sem adaptação	1,70 ± 0,54 <sup>b</sup>	3,98 ± 1,28 <sup>c</sup>
Inóculo com adaptação	1,70 ± 0,88 <sup>b</sup>	3,60 ± 0,88 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes.



**Figura 4.11** - Resultados dos testes de germinação com os efluentes finais a 20% de água ruça, 3 fases, série 4: (A): Biotratamento sem adaptação; (B): Biotratamento com preadaptação.

▪ **Culturas com 35% de água ruça duas fases**

Para estes ensaios foram considerados os efluentes obtidos dos biotratamentos de água ruça de duas fases, a 35%, 1º ciclo e 2º ciclo. Para o controlo negativo foi utilizado o efluente dos ensaios controlo da série 1. Para todos os ensaios foi escolhido aleatoriamente um dos triplicados. Os resultados das sementes germinadas encontram-se na tabela 4.23. De um modo geral os resultados mostraram que estas águas ruças, comparativamente às de três fases, são muito menos tóxicas, já que todos os controlos tiveram percentagens de germinação elevadas. Contudo analisando o perfil de germinação, verifica-se no controlo negativo e no branco sujo do momento uma menor capacidade de germinação nas primeiras 24 horas, no entanto no final do período de ensaio esses valores aproximaram-se ligeiramente dos restantes ensaios.

**Tabela 4.23** - Resultados da germinação das sementes de *Lactuca sativa* com efluentes finais de 35% de água ruça, 2 fases.

	Nºsementes germinadas (24h)	Nºsementes germinadas (48h)	Nºsementes germinadas (7 dias)	Germinação final (%)	IR
Controlo positivo (água)	38	38	38	95	-
Controlo negativo (sem tratamento)	32	36	37	92,5	-0,03
Branco sujo do momento	26	33	36	90	-0,05
Biotratamento 1º Ciclo	36	38	38	95	0
Biotratamento 2ºCiclo	33	36	37	92,5	-0,03

O 1º ciclo de tratamento mostrou redução da toxicidade, obtendo-se resultados de IR idênticos à germinação com água, e superiores aos restantes controlos, o que é classificado como efeito de estimulação.

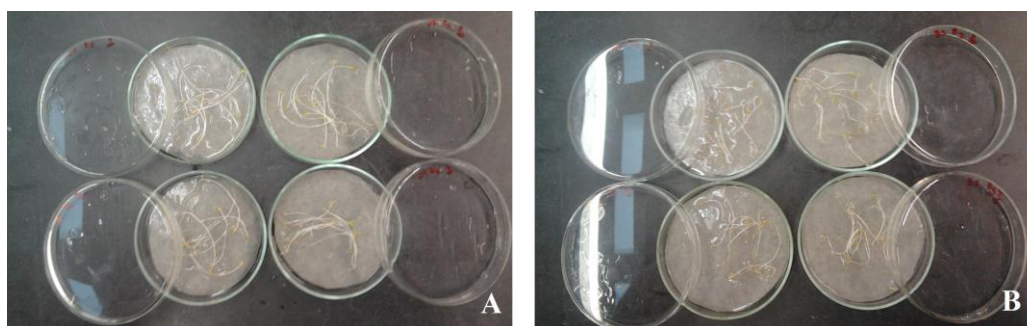
O crescimento médio da radícula e caule para estes ensaios encontra-se na tabela 4.24 e figura 4.12. Aqui o comprimento das radículas entre ensaios não mostrou diferenças, exceto para o controlo negativo. O comprimento do caule do biotratamento de 1º ciclo foi maior, comparativamente aos controlos negativos e ao controlo positivo, o que reforça a diminuição da toxicidade deste efluente, devido ao tratamento com a *C. vulgaris*. Estes resultados confirmam que as microalgas em estudo têm a capacidade de

degradar compostos fenólicos, capazes de inibir a germinação das sementes, e que essa capacidade é mantida, mesmo quando utilizadas em 2º ciclo, embora com ação mais fraca.

**Tabela 4.24** - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 35% de água ruça, 2 fases. (n=40, M ± DP)

	<b>Radícula</b>	<b>Caule</b>
Controlo positivo - água	4,14 ± 1,09 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,82 <sup>c</sup>
Controlo negativo – sem tratamento	6,60 ± 2,12 <sup>b</sup>	3,25 ± 0,86 <sup>c</sup>
Branco sujo do momento	4,33 ± 1,04 <sup>a</sup>	3,68 ± 0,81 <sup>c</sup>
Biotratamento de 1º Ciclo	4,76 ± 0,65 <sup>a</sup>	6,15 ± 1,16 <sup>d</sup>
Biotratamento de 2ºCiclo	5,73 ± 1,61 <sup>a</sup>	4,48 ± 0,94 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes.



**Figura 4.12** - Resultados dos testes de germinação com efluentes finais a 35% de água ruça, 2 fases:  
(A): Biotratamento de 1º Ciclo; (B): Controlo negativo

#### ▪ **Culturas com 50% e 60% de água ruça duas fases**

Os resultados das sementes germinadas com os efluentes obtidos dos biotratamentos de água ruça de duas fases a 50% e 60% encontram-se na tabela 4.25. Aqui os controlos negativos apresentados referem-se a 60% de diluição. Verifica-se que a percentagem de germinação na cultura de biorremediação a 50% é igual à do controlo positivo e maior comparativamente com os controlos negativos, obtendo-se um IR idêntico à germinação com água, portanto de estimulação. Por outro lado, os resultados dos ensaios de germinação com água ruça a 60% mostraram maior percentagem de germinação comparativamente a todos os controlos (positivo e negativos). Neste caso foi obtido um maior efeito de estimulação, com valor de IR=0,03. Estes resultados

confirmam a ideia de que a *C. vulgaris* apresenta capacidade para reduzir os compostos fitotóxicos que inibem a germinação da *L. sativa*, demonstrando igualmente o potencial do biotratamento.

**Tabela 4.25** - Resultados da germinação das sementes de *Lactuca sativa* com efluentes finais de 50% e 60% de água ruça, 2 fases.

	Nºsementes germinadas (24h)	Nºsementes germinadas (48h)	Nºsementes germinadas (7 dias)	Germinação final (%)	IR
Controlo positivo (água)	38	38	38	95	-
Controlo negativo sem tratamento (60%)	32	34	37	92,5	-0,03
Branco sujo do momento (60%)	36	36	36	90	-0,05
Biotratamento 50%	37	38	38	95	0
Biotratamento 60%	39	39	39	97,5	0,03

O crescimento médio da radícula e caule para estes ensaios encontra-se na tabela 4.26. O comprimento das radículas entre ensaios não mostrou diferenças, exceto no caso do biotratamento a 60%, em que os valores médios obtidos foram superiores. Este efeito poderá estar mais uma vez associado à maior percentagem de carga orgânica com capacidade nutritiva, nomeadamente açúcares que estimulam o desenvolvimento da raiz.

Por outro lado, ambos os controlos negativos apresentam maior comprimento do caule do que o controlo positivo. Este facto pode ser justificado pela presença de açúcares nas águas ruças (Borja *et al.*, 2002) que estimulam o crescimento da semente, ou seja um aumento de nutrientes comparativamente com a água. No entanto não significa que estes efluentes (controlo negativo e branco sujo do momento) sejam menos fitotóxicos, como aliás se verifica pelo valor de IR obtido (Tabela 4.25). Comparativamente, o comprimento dos caules dos biotratamentos a 50% e 60% não mostrou diferenças com os controlos negativos, apesar do efeito de estimulação observado.

**Tabela 4.26** - Crescimento médio (cm) da radícula e caule durante a germinação com efluentes finais a 50% e 60% de água ruça, 2 fases. (n=40, M ± DP)

	<b>Radícula</b>	<b>Caule</b>
Controlo positivo - água	4,14 ± 1,09 <sup>a</sup>	3,33 ± 0,82 <sup>c</sup>
Controlo negativo – sem tratamento (60%)	4,22 ± 1,05 <sup>a</sup>	5,69 ± 1,75 <sup>d</sup>
Branco sujo do momento (60%)	4,20 ± 0,73 <sup>a</sup>	5,22 ± 0,65 <sup>d</sup>
Biotratamento 50%	4,29 ± 0,76 <sup>a</sup>	6,53 ± 1,11 <sup>d</sup>
Biotratamento 60%	7,01 ± 1,00 <sup>b</sup>	5,08 ± 0,74 <sup>d</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes.

Em síntese, os resultados sugerem que para as águas ruças de duas fases a *C. vulgaris* apresenta uma relação positiva entre a capacidade para reduzir os compostos fitotóxicos que inibem a germinação da *L. sativa* e a concentração do efluente (pela análise do valor de IR), refletindo-se também num maior crescimento do caule (Tabela 4.27), o que poderá ser uma mais-valia.

**Tabela 4.27** - Análise comparativa do efeito do biotratamento da *C. vulgaris* nos efluentes de água ruça, 2 fases, na germinação de *L. sativa*. (n=40, M ± DP)

	<b>IR</b>	<b>Caule</b>
Controlo positivo - água	-	3,33 ± 0,82 <sup>a</sup>
Biotratamento 35%	0	6,15 ± 1,16 <sup>b</sup>
Biotratamento 50%	0	6,53 ± 1,11 <sup>b</sup>
Biotratamento 60%	0,03	5,08 ± 0,74 <sup>c</sup>

Letras diferentes na mesma coluna correspondem a médias significativamente diferentes.

#### 4.3.2 Ensaio de Crescimento

A análise qualitativa da fitotoxicidade dos efluentes foi avaliada pelo crescimento da *Lactuca sativa*, tendo em conta as características finais do desenvolvimento da planta, tais como textura das folhas/raiz e tamanho. Para estes ensaios foram considerados os mesmos efluentes (biotratamento e controlo) que na análise quantitativa.

##### ▪ Culturas com 20% de água ruça três fases

Aqui o efluente testado foi o obtido das culturas de biotratamento a 20%, com inóculo sem preadaptação. De um modo geral, verifica-se maior capacidade de

germinação e maior desenvolvimento das alfaces submetidas ao efluente resultante da cultura de biotratamento, quando comparadas com as alfaces submetidas ao efluente do controlo (Figura 4.12), confirmando a ação positiva das microalgas. Comparando com os ensaios de germinação anteriores (avaliação quantitativa) onde não se verificou germinação das sementes no controlo negativo, aqui o crescimento observado poderá estar associado à possível oxidação dos compostos fenólicos, ocorrida no tempo de espera para a preparação destes ensaios, resultando assim num efluente menos tóxico.



**Figura 4.12-** Aspeto do desenvolvimento final da *L. sativa* ao fim de 24 dias de ensaio, 20% de água ruça, 3 fases: (A) Biotratamento sem adaptação; (B) Controlo negativo.

#### ▪ Culturas com 35% de água ruça duas fases

Aqui o efluente testado foi o obtido das culturas de biotratamento a 35%, de 1º ciclo e de 2º ciclo. Verifica-se que as alfaces submetidas ao efluente de 1º ciclo, para além de possuírem maior número de plantas germinadas, o tamanho destas é maior, comparativamente com as alfaces submetidas a 2º ciclo (Figura 4.13). Assim conclui-se que apesar da microalga reutilizada possuir capacidade para remover o mesmo teor de compostos fenólicos num menor período de tempo, não consegue reduzir a fitotoxicidade do efluente da mesma forma. De um modo geral, observou-se maior capacidade de germinação e maior desenvolvimento das alfaces submetidas aos efluentes resultantes dos biotratamentos (1º e 2º ciclo), quando comparadas com as alfaces submetidas ao efluente do controlo, confirmando os resultados anteriores.



**Figura 4.13** – Aspeto do desenvolvimento final da *L. sativa* ao fim de 24 dias de ensaio, 35% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento de 1ºciclo; (B) Biotratamento de 2ºciclo.

▪ **Culturas com 50% e 60% de água ruça duas fases**

Os ensaios com efluentes dos biotratamentos com 50% de água ruça, mostraram uma elevada diferença entre o número de plantas que resistiram após o período de ensaio. Inicialmente germinaram nove sementes com o efluente resultante da cultura de biotratamento, já no que diz respeito à cultura controlo verificou-se inicialmente a germinação de oito sementes. No entanto para ambos os casos, o crescimento foi observado em menor número, não se verificando diferenças significativas no seu desenvolvimento (Figura 4.14). O facto de maior número de plantas terem resistido, no ensaio com efluente resultante da cultura de biotratamento, comparativamente ao controlo, reforça a ação positiva da *C. vulgaris* na diminuição da toxicidade das águas ruças.



**Figura 4.14** - Aspeto do desenvolvimento final da *L. sativa* ao fim de 24 dias de ensaio, 50% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento; (B) Controlo negativo.

Os ensaios com efluentes dos biotratamentos com 60% de água ruça foram surpreendentes, já que apesar de se terem obtido maior número de plantas, comparativamente ao controlo, estas apresentavam fraco aspeto (Figura 4.15). Tal como

já foi mencionado, o desenvolvimento das plantas pode estar associado à presença em maior quantidade de açúcares, comparativamente com as restantes diluições, no entanto a consistência mole e fraco aspeto das folhas pode estar relacionado com a toxicidade que embora não tenha inibido a germinação, afetou o seu crescimento.

Estes resultados sugerem, tal como os resultados anteriormente obtidos nos ensaios de germinação, que a *C. vulgaris* apresenta a capacidade para reduzir os compostos fitotóxicos que inibem a germinação da *L. sativa*, no entanto, à medida que aumenta a concentração do efluente a ação das microalgas não é o suficiente para prevenir efeitos negativos no crescimento da planta.



**Figura 4.15** - Aspeto do desenvolvimento final da *L. sativa* ao fim de 24 dias de ensaio, 60% de água ruça, 2 fases: (A) Biotratamento; (B) Controlo negativo.

#### 4.4 Otimização do Processo

No processo de otimização foi utilizado o efluente de duas fases, visto que apresentam uma mais-valia para o ecossistema, já que apresentam menor carga orgânica comparativamente com os lagares de três fases. Todos os ensaios foram realizados com diluições de 50% do efluente em água destilada e tal como já foi referido a otimização do processo foi realizada em duas etapas, numa foi analisada a capacidade de tratamento de um efluente praticamente sem conservação, na outra foi otimizado o biorreator.

##### 4.4.1 Tratamento do Efluente sem Conservação

Neste tratamento o efluente utilizado não foi sujeito ao processo de conservação através da congelação, ou seja, usou-se água ruça de duas fases mantida no frigorífico desde o seu período de recolha. Este procedimento teve como objetivo comparar os resultados anteriores, obtidos em condições laboratoriais controladas, com aqueles que serão mais próximos dos obtidos à escala piloto. De facto, tal como acontece no

tratamento em grande escala, o efluente a tratar não sofreu nenhum processo de conservação, estando neste caso sujeito ao processo natural de degradação dos compostos fenólicos e ao desenvolvimento de microrganismos. Apesar disso, foi feita manutenção no frigorífico de forma a evitar uma proliferação excessiva da microbiota, pois o período decorrido entre a recolha das amostras e estes ensaios foi de cerca 5 meses.

Estes ensaios foram realizados em duplicado e considerando os resultados anteriores, durante um período de fermentação de 8 dias, para efluente de duas fases diluído a 50% e previamente autoclavado. De salientar que a cultura de microalgas utilizada nestes ensaios foi sujeita a uma preadaptação de 10% (v/v) de água ruça de duas fases em meio de Walne modificado, durante 3 dias. As culturas controlo foram realizadas com esferas de alginato de sódio sem microalgas. Todas as culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyers de 3L, invertidos, em volumes de cultura de cerca de 2,5 L (Figura 4.16). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente ( $20^{\circ}\text{C}\pm 2$ ) e com iluminação natural.



**Figura 4.16** - Otimização do processo - aspeto das culturas com efluente sem conservação a 50%, 2 fases.

Os ensaios de biorremediação foram inoculados com esferas à concentração de  $5,85 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ , mantendo a relação de efluente:esferas igual a 20 (v/v). A concentração escolhida prendeu-se com aspetos práticos de obtenção de inóculo no volume necessário, tendo em vista um aumento de escala. Após o período de fermentação verificou-se um aumento dos valores de pH das culturas, de  $5,81 \pm 0,16$  para  $7,31 \pm 0,28$ , não havendo diferenças entre culturas de biorremediação e culturas controlo.

## Fenóis totais

Estas culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de  $6,47 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,38$  e no fim do período de ensaio o teor de compostos fenólicos foi reduzido para  $3,88 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,10$ , o que se traduziu num Índice de Perda de Fenólicos (PLI) de  $40\% \pm 1,93$  e num Rendimento de Remoção (YE) de  $37\% \pm 3,93$ . Também aqui foram tidos em conta as variações do teor de fenólicos totais das culturas controlo, levando a valores de PLI líquido de  $5\% \pm 1,93$ . Estes valores baixos sugerem que o contributo das microalgas na diminuição dos fenólicos nestas condições teve pouco peso. Comparativamente com os resultados obtidos nas culturas de 50%, apresentados anteriormente, verificaram-se valores pouco satisfatórios (Tabela 4.28), contudo estes podem estar associados às condições iniciais da cultura, ou seja, o efluente não sofreu qualquer tipo de conservação de forma a evitar a degradação dos fenóis, tendo sido guardado no frigorífico até ao momento de utilização, verificando-se a existência de fungos, assim como de odor desagradável. Por outro lado a densidade celular do inóculo nestes ensaios era bastante menor. De acordo com o estudo realizado por Justino *et al.* (2009), no qual foi avaliada a degradação de compostos fenólicos deste tipo de efluente por fungos, foi verificado que para a mesma diluição um ano após a produção se registou uma menor redução do teor de fenóis, contrariamente ao verificado no efluente tratado inicialmente. Assim, neste trabalho com *C. vulgaris* verificou-se de forma análoga ao estudo anterior com fungos que para a mesma diluição um período alargado de espera após a produção leva a menor redução do teor de fenóis, contrariamente ao verificado no efluente tratado inicialmente. De facto, durante o período de armazenamento os compostos fenólicos têm tendência a se converterem, por ação de polimerases, em polímeros de elevado peso molecular que são mais difíceis de se degradarem por tratamento biológico (Ayed *et al.*, 2005; Crognale *et al.*, 2006; Justino *et al.*, 2009).

**Tabela 4.28** - Comparação entre as culturas de biorremediação de 50%, 2 fases. (n=3, M ± DP)

	<b>Biorremediação 50%</b>	<b>Otimização biorremediação 50%</b>
PLI (%)	56,25 ± 2,13	40,00 ± 1,93
YE (%)	61,66 ± 2,48	37,00 ± 3,93
<b>PLI*-líquido (%)</b>	<b>17,27 ± 2,13<sup>a</sup></b>	<b>4,69±1,93<sup>b</sup></b>
<b>YE*- líquido (%)</b>	<b>20,23 ± 2,48<sup>a</sup></b>	<b>3,97±3,93<sup>b</sup></b>

(\*) Tendo em conta culturas controlo; Letras diferentes na mesma linha correspondem a médias estatisticamente diferentes.

#### 4.4.2 Otimização do Biorreator

Nesta etapa de otimização optou-se por um reator do tipo coluna de bolhas. Este tipo de reatores permite uma transferência eficaz entre as fases gasosas e líquidas (Teixeira, 2002; Kantarci *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2010) e apresentam uma constituição muito simples. Para esse efeito foram construídos três fotobiorreatores que consistiram em cilindros de vidro com entrada de ar na secção inferior. O ar passava por uma placa perfurada finamente, de modo a formar bolhas de diâmetro reduzido, originando assim um regime homogéneo.

Nos biorreatores construídos, o volume de cultura assumiu uma relação altura/diâmetro duas vezes superior ao diâmetro do fermentador, com um volume total de 200 mL (Figura 4.17). Estes ensaios foram realizados em triplicado, em regime permanente de luz (3800 lux) e à temperatura ambiente (20°C ± 2).



**Figura 4.17** - Otimização do processo - aspeto dos fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas, 2 fases a 50%.

Neste caso também foi otimizado o período do ciclo fermentativo, sendo este reduzido para seis dias. Tal como anteriormente, foi testado o efluente de duas fases diluído a 50% e previamente autoclavado, o inóculo foi sujeito a uma preadaptação de 10% e as culturas controlo foram realizadas com esferas de alginato de sódio sem microalgas. A concentração de *C. vulgaris* neste ensaio também foi otimizada visto que os resultados anteriores com igual diluição do efluente sugeriram que o aumento da densidade celular do inóculo pode ter efeitos negativos, não se traduzindo num aumento da remoção de fenóis. Assim, as culturas de biorremediação foram inoculadas com uma concentração de  $6,05 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, mantendo a relação de efluente:esferas igual a 20 (v/v).

Com base na recolha das amostras dos efluentes testados, verificou-se um aumento dos valores de pH das culturas, de  $4,08 \pm 0,01$  para  $7,30 \pm 0,50$ , não havendo diferença entre as culturas de biorremediação e as culturas controlo.

### Fenóis totais

Estas culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de  $9,14 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,13$  e no final do período de ensaio o teor de compostos fenólicos foi reduzido para  $5,14 \mu\text{g.mL}^{-1} \pm 0,08$ , obtendo-se uma eficácia de remoção dos compostos fenólicos que se traduziu, ao fim de 6 dias de fermentação, num PLI de  $43\% \pm 0,90$  e num YE de  $79\% \pm 1,63$ . Tendo em conta as culturas controlo observaram-se valores líquidos de PLI e YE, respetivamente  $19\% \pm 0,90$  e  $32\% \pm 1,63$  (Tabela 4.29).

**Tabela 4.29** - Comparação entre as culturas de biorremediação de 50% (série 3, 2 fases e 50% otimização com biorreator coluna de bolhas). (n=3, M  $\pm$  DP)

	<b>Biorremediação 50%</b>	<b>Otimização coluna de bolhas 50%</b>
<b>Teor inicial fenólicos (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>	<b><math>7,73 \pm 0,10^a</math></b>	<b><math>9,14 \pm 0,13^b</math></b>
<b>PLI (%)</b>	$56,25 \pm 2,13$	$43,33 \pm 0,90$
<b>YE (%)</b>	$61,66 \pm 2,48$	$78,62 \pm 1,63$
<b>PLI*-líquido (%)</b>	<b><math>17,27 \pm 2,13^c</math></b>	<b><math>19,38 \pm 0,90^c</math></b>
<b>YE*- líquido (%)</b>	<b><math>20,23 \pm 2,48^d</math></b>	<b><math>32,30 \pm 1,63^e</math></b>

(\*) Tendo em conta culturas controlo; Letras diferentes na mesma linha correspondem a médias estatisticamente diferentes.

Comparativamente com as culturas de biorremediação anteriormente realizadas com igual diluição do efluente (série 3), verifica-se que não existem diferenças no PLI-líquido. Mais uma vez a redução do tempo de fermentação, no uso da coluna de bolhas, levou ao aumento do rendimento. Apesar disso, os resultados obtidos sugerem que podem existir vantagens no uso deste tipo de fotobiorreator, já que permitem rentabilizar a perda de fenóis (aumento do YE-líquido) e aumentar a concentração inicial de fenóis a tratar, mantendo a eficácia da sua remoção (manter PLI-líquido). Uma transferência eficaz entre as diferentes fases neste tipo de reatores, poderá contribuir para estes resultados. Por outro lado, estas fermentações ocorreram em regime permanente de luz, o que poderá ter contribuído para os valores de PLI-líquido obtidos. De facto, fermentações com as microalgas *S. quadricauda* e *A. braunii* mostraram maior rendimento de perda de fenólicos quando as culturas ocorreram no escuro, comparativamente à presença de luz (Pinto *et al.*, 2003). Nesse contexto, seria nosso objetivo repetir estes ensaios com a coluna de bolhas sob regime de fotoperíodo, de forma a otimizar o processo de biorremediação.

## **5 Considerações Finais**

---

O trabalho desenvolvido tinha como principal linha de investigação avaliar o potencial da *Chlorella vulgaris* na diminuição de compostos fenólicos e aumento de pH, de modo a resultar numa diminuição da fitotoxicidade do efluente sujeito ao biotratamento. De acordo com os dados obtidos podemos concluir que os objetivos inicialmente propostos foram atingidos, tendo-se verificado uma melhoria na qualidade final das águas ruças tratadas com recurso à microalga.

A partir dos ensaios de biorremediação conclui-se que a presença das microalgas imobilizadas em esferas de alginato de sódio influencia o valor final de pH, tendo-se registado a diminuição da acidez das culturas. Por sua vez, no que respeita à carga orgânica destes efluentes, nomeadamente os compostos fenólicos, verificou-se um decréscimo na sua concentração, no entanto estes resultados não simbolizam uma diminuição da fitotoxicidade. Dos resultados obtidos é possível inferir as seguintes conclusões:

#### **Água ruça de três fases:**

▪ No tratamento destas águas ruças, as percentagens brutas de remoção dos fenóis nos 1<sup>os</sup> ciclos variaram entre 20% a 43%, para concentrações iniciais de fenólicos de 22-28  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Além disso, verificou-se um aumento do pH, registando-se uma cultura neutra no final do biotratamento. No entanto, só se verificou uma redução efetiva do teor de compostos fenólicos nos ensaios de biorremediação onde foi utilizada *C. vulgaris* adaptada. Apesar disso, os ensaios de germinação com alface mostraram que a toxicidade destes efluentes persiste, mesmo após o biotratamento, embora se observasse uma tendência de diminuição do efeito inibitório. A comprovar esta tendência foi o facto de se ter observado maior desenvolvimento das alfices submetidas ao efluente resultante da cultura de biotratamento, quando comparadas com as alfices submetidas ao efluente sem tratamento.

▪ Nas culturas de 2<sup>o</sup> ciclo onde foi analisada a capacidade da *C. vulgaris* efetuar um novo tratamento de efluente, verificou-se que esta apresenta ainda alguma aptidão na remoção dos compostos fenólicos, neste caso apesar da concentração inicial do inóculo ser inferior a capacidade de remoção foi mantida à custa de um fenómeno de preadaptação ocorrido no 1<sup>o</sup> ciclo. Em termos de fitotoxicidade, após o biotratamento o efluente destas culturas apresenta ainda assim carácter mais tóxico comparativamente ao efluente das culturas de 1<sup>o</sup> ciclo.

▪ O efluente sujeito ao 2º tratamento não apresenta vantagens, nas condições testadas, visto que a degradação dos fenóis totais foi muito baixa, eventualmente pela presença de compostos de elevado peso molecular (difícilmente biodegradáveis). Posto isto, aconselha-se em trabalhos futuros a utilização de microalgas e posteriormente de outros microrganismos capazes de degradarem estes compostos, como por exemplo bactérias.

### **Água ruça de duas fases:**

▪ Por outro lado, considerando o tratamento destas águas ruças, as percentagens brutas de remoção dos fenóis nos 1<sup>os</sup> ciclos variaram entre 53% a 73%, para concentrações iniciais de fenólicos de 6-10 µg.mL<sup>-1</sup>. Nestes ensaios de biorremediação, analisando as diferentes diluições testadas, conclui-se que a que apresenta maior capacidade de satisfazer os objetivos inicialmente propostos são as culturas com 35% de efluente (1º e 2º ciclo). Examinando os ensaios executados com esta diluição verificaram-se maiores perdas de compostos fenólicos para o 2º ciclo, concluindo-se que a *C. vulgaris* apresenta capacidade de realizar um novo tratamento de efluente, com aumento da sua rentabilidade. Contudo em termos de fitotoxicidade os resultados foram contraditórios.

▪ Nas culturas de 50 e 60% de efluente, apesar da concentração do inóculo ter sido aumentada, verificou-se que, como seria de esperar, a capacidade de remoção dos fenólicos é reduzida. Apesar disso, em termos de resultados dos ensaios de germinação com estes efluentes, após o biotratamento observou-se um efeito de estimulação. No entanto, com este aumento da concentração do efluente, a ação das microalgas não foi suficiente para prevenir os efeitos negativos observados no crescimento da planta.

▪ Por fim, com base no processo de otimização do efluente sem conservação conclui-se que a rentabilidade deste tratamento é baixa visto que durante o período de armazenamento os compostos fenólicos converteram-se em polímeros de elevado peso molecular que são difíceis de se degradarem, dificultando assim o papel desempenhado pela *C. vulgaris*.

▪ No processo de otimização com o fotobiorreator de colunas de bolhas, apesar de não se observarem diferenças na redução efetiva de fenólicos, comparativamente com anteriores processos de biorremediação a igual diluição do efluente, a redução do tempo de fermentação levou ao aumento do rendimento. Além disso, apresenta também a

vantagem de rentabilizar a perda de fenóis, pelo aumento da concentração inicial a tratar, mantendo a eficácia da sua remoção.

▪ Tal como já foi mencionado com base nos resultados obtidos, propõe-se em investigações futuras realizar estes ensaios, nos reatores de colunas de bolhas, sob o regime de fotoperíodo.

## **6 Referências Bibliográficas**

---

- Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G., Tzagou V. e Papanikolaou S. (2003). Phenolical removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostereus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, **37**: 3987-3904.
- Aires C. (2007). Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extração de azeite em solos agrícolas. Tese de doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa – Lisboa, Portugal.
- Albuquerque J.A., González J., García D. e Cegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, **91**: 195-200.
- Allouche N., Fki I. e Sayadi S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 267-273.
- Andreozzi R., Longo G., Majone M. e Modesti G. (1998). Integrated treatment of olive oil mill effluents (OME): Study of ozonation coupled with anaerobic digestion. *Water Research*, **32**: 2357–2364.
- Arjona R., García A. e Ollero P. (1999). The drying of alperujo a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering*, **41**: 229-234.
- Aruoja V., Sihtmäe M., Dubourguier H.C. e Kahru A. (2011). Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: Comparison with published data and QSARs. *Chemosphere*, **84** (10): 1310-1320.
- Assas N., Marouani L. e Hamdi M (2000). Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering*, **22**: 503-507.
- Asses N., Ayed L., Bouallagui H., Sayadi S., Hamdi M. (2009). “Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*”. *International Biodeterioration and Biodegradation* **63**(4): 407 – 413.
- Asses, N., Ayed L., Bouallagui H., Ben Rejeb I., Gargouri M. e Hamdi M. (2009a). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology*, **100**:2182-2188.

- Ayed L., Asses N., Sayadi S. e Hamdi M. (2005). Involvement of lignin peroxidase in the decolourisation of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology*, **40**: 7-11.
- Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F. e Ozer A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **34**: 209-247.
- Bacelar E.A. (2006). Ecophysiological responses of olive (*Olea europaea* L.) to restricted water availability – limitations, damages and drought resistance mechanisms. Tese de Doutoramento. UTAD – Vila Real, Portugal.
- Balis C., Chatzipavlidis J. e Flouri F. (1996). Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38** (3-4): 169-178.
- Ben Sassi A., Ouazzani N., Walker G. M., Ibnsouda S., El Mzibri M. e Boussaid A. (2008). Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates. *Biodegradation*, **19**:337-346.
- Bhat T. K., Singh B. e Sharma O. P. (1998). Microbial degradation of tannins- a current perspective. *Biodegradation*, **9**: 343-357.
- Borja-Padilla R., Martin A.M. e Fiestas Ros de Ursinos J.A. (1990). Estudio cinetico de la depuracion anaerobia del alpechin en presencia de diversos soportes para inmovilizacion de los microorganismos responsables del processo. *Grasas y Aceites*, **41** (4-5): 347-356.
- Borja R., Rincón B., Raposo F., Alba J. e Martín A. (2002). A study of anaerobic digestibility of two phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. *Process Biochemistry*, **38**: 733-742.
- Borja R., Sánchez E., Raposo F., Rincón B., Jiménez A.M. e Martín A. (2006). A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in an evaporation pond. *Waste Management*, **26**: 477-486.
- Cabrera K. (1995). El alpechin: un problema mediterraneo. – in: A. Conelas e F. Cabrera Capitan. CSIC. – *Geofoma Ediciones*, Logrono, Spain, p. 141-154.
- Canilha L., Carvalho W. e Silva J.B.A. (2006). Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. *BiotecnologiaCiência & Desenvolvimento*, Brasília, **36** (6): 48-57.
- Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A. e Cristinzio G. (1995). Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**: 393-398.

- Casa R., D'Annibale A., Pierucceti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G. e Cascio B.L. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere*, **50**: 959-966.
- Civantos L. (1999). Obtencion del aceite de oliva virgin. Editorial Agricola Espanola, S.A., 2ª ed, Madrid, p. 316.
- Chtourou M., Ammar E., Nasri M. e Medhioub K. (2004). Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**:869-878
- Connor D.J. (2005). Adaptation of olive (*Olea europaeae* L.) to water limited environments. *Australian Journal Agricultural Research*, **56**: 1181-1189.
- Crognale S., D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Quarantino D. e Petruccioli M. (2006). Olive oil mill wastewater valorization by fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **81**: 1547 – 1555
- Daâssi D., Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Belbahri L., Woodward S., Zouari-Mechichi H., Mechichi T., Nasri M. e Segura-Carretero A. (2014). Olive oil mill wastewaters: phenolic content characterization during degradation by *Coriopsis gallica*. *Chemosphere*, **113**: 62-70.
- D'Annibale A., Sermanni G.G., Federici F. e Petruccioli M. (2006). Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. *Bioresource Technology*, **97** (15): 1828-1833.
- De Marco E., Savarese M., Paduano A. e Sacchi R. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104** (2): 858-867.
- Deschamps A. M. (1989). Microbial degrading of tannins and related compounds. *American Chemical Society*, Washington DC, p. 559-566.
- Di Gioia D., Fava F., Bertin L. e Marchetti L. (2001). Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**: 619-626.
- Di Giovacchino L. (1991). Extraccion del aceite de las aceitunas por presion, centrifigacion y percolacion; efectos de las tecnicas sobre los rendimientos en aceite. *Olivae*, **36**: 14-41.

- Di Giovacchino L. (1998). Quimica y Tecnologia del aceite de oliva. Dimitrios Boskov (ed.). – AMV, ediciones, Madrid, p. 25-66.
- Di Giovacchino L., Sestili S. e Di Vincenzo D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**: 587-601.
- Giannoutsou E.P., Meintanis C. e Karagouni A.D. (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability to its fermentation. *Bioresource Technology*, **93**, 301-306.
- El-Abbassi, A., Khayet M. e Hafidi A. (2011). Micellar enhanced ultrafiltration process for the treatment of olive mil wastewater. *Water Research*, **45**(15): 4522–4530.
- Ergül F. E., Sargin S., Öngen G. e Sukan F. V. (2009). Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63** (1): 1-6.
- Fadil, K., Chahlaoui, A., Ouahbi, A., Zaid, A. e Borja, R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51:37-41
- Farshad D. (2012). Microbial Biotechnology in Olive Oil Industry, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions. Dr. Dimitrios Boskou (Ed.), InTech.
- Fernandez-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Heredia A., Guillén R. e Jiménez A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of twophase olive oil processing or alpeorujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 6804-6811.
- Ferraz M. (2012). Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa - Lisboa, Portugal.
- Garcia G.M. (2004). Evolucion temporal del alperujo procedente de almazara.” Escuela Tecnica Sup. de ingenieros agronomos y montes, p.22-74.
- Giannoutsou E.P., Meintanis C. e Karagouni A.D. (2004). Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability to its fermentation. *Bioresource Technology*, **93**: 301-306.
- Gonçalves C., Lopes M., Ferreira J. P. e Belo I. (2009). Biological treatment of olive mil wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, **100**:3759-3763.
- Hamdy M.K., Kim K. e Rudtke C.A. (1990). Continuous ethanol production by yeast immobilized on to channeled alumina beads. *Biomass*, **21**: 189-206.

- Jaouani A., Sayadi S., Vanthourhout M. e Penninckx M.J. (2003). Potent fungi decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**: 802-809.
- Justino C.I., Duarte K., Loureiro F., Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.P. e Freitas A.C. (2009). Toxicity and organic content characterization of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, **172**: 1560-1572.
- Justino C.I., Pereira R., Freitas A.C., Rocha-Santos T., Panteleitchouk T. e Duarte A.C. (2012). Olive oil mill wastewater before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicol*, **21**: 615-629.
- Kallel M., Belaid C., Mechichi T., Ksibi M. e Elleuch B. (2009). Removal of organic load and phenolic compounds from olive mill wastewater by Fenton oxidation with zero-valent iron. *Chemical Engineering Journal*, **150**, 391 – 395.
- Kantarci N., Borak F. e Ulgen O. (2005). Bubble column reactors. *Process Biochemistry*, **40**: 2263-2283.
- Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P. e Crowther J. (2008). Olive oil history, production and by-product management”. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **7**: 1-26.
- Khoufi S., Aloui F. e Sayadi S. (2009). Pilot scale hybrid process for olive mil wastewater treatment and reuse. *Chemical Engineering and Processing*, **48**: 643-650.
- Khoufi S., Feki F. e Sayadi S. (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. *Journal of Hazardous Materials*, **142**: 58-67.
- Komilis P.D., Karatzas, E. e Halvadakis, C.P. (2005). The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pretreatment techniques. *Journal of Environmental Management*, **74**: 339-348.
- Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D. e Guerzoni M.E. (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, **96**:317-322
- Lau R., Mo R. e Sim W.S.B. (2010). Bubble characteristics in shallow bubble column reactors. *Chemical Engineering Research and Design*, **88**:197-203.
- Leone F.C. (1993). Valoraciones economicas sobre las innovaciones tecnológicas problemas medio ambientales del sector oleicola en Italia. *Olivae*, **47**: 15-20.

- Lourenço C., Rafael C., Mello-Sampayo C., Pintado C., Santos T. e Catulo L. (2003). Degradação de compostos fenólicos por estirpes de *Lactobacillus* isoladas de águas Russas. *III Simpósio Nacional de Olivicultura*. Castelo Branco.
- Luchetti F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market – an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104** (9-10): 559-563.
- Mantzavinos D. e Kalogerakis N. (2005). Treatment of olive mill effluents Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes – an overview. *Environment International*, **31**: 289-295.
- Marinho C. (2009). Caracterização físico-química e microbiológica de águas residuais de lagares de azeite. Selecção de leveduras para aplicação ao tratamento de águas ruças. Tese de doutoramento. UTAD – Vila Real, Portugal.
- Marinho Y., Santos A., Santos L., Vasconcelos R., Kalazans N., Nascimento R, Dantas D. e Gálvez A. (2009). Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel. <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0160-2.pdf>
- Matos A.J., Bezerra R.M. e Dias A.A. (2007). *Screening* of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for OMWW decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology*, **45**: 270-275.
- McNamara C.J., Anastasiou C.C., O’Flaherty V. e Mitchell R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **61**:127-134.
- Monteiro A. (1999). A Oliveira. Coleção Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor, p. 155. Mirandela, Portugal.
- Niaounakis M. e Halvadakis C.P. (2004). Olive mill waste management. Literature Review and Patent Survey. Typothito- George Dardanos. Athens, Greece, pp xiv, 430.
- Niaounakis M. e Halvadakis C.P. (2006). Olive processing waste management. Literature review and patent survey. 2ªed, *Elsevier*, p. 498.
- Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K. e Stockmann R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 823-837
- Oliveira L. (2013). Tratamento de águas ruças por fitorremediação com *L. minor* ou por biossorção com cortiça. Tese de mestrado. FCUP - Porto, Portugal

- Paixão S.M., Mendonça E., Picado A. e Anselmo A.M. (1999). Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: a comparative study of three aquatic organisms. *Environmental Toxicology*, **14**: 263-269.
- Paredes C., Bernal M.P., Cegarra J., Roig A. (2002). Biodegradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes". *Bioresource Technology*, **85**: 1-8.
- Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sanchez-Monedero M. A. e Bernal M.P. (1999). Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology*, **67**(2): 111-115.
- Pelillo M., Rincón B., Raposo F., Martín A. e Borja R. (2006). Mathematical modelling of the aerobic degradation of two-phase olive mill effluents in a batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*, **30**: 308-315.
- Peres J.A. (2001). Degradação de ácidos fenólicos por processos de oxidação avançados e pré-tratamento de águas ruças pelo Reagente de Fenton. Tese de doutoramento. UTAD – Vila Real, Portugal.
- Pinto G., Pollio A., Previtera L., Stanzione M. e Temussi F. (2003) Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnology Letters* **25**:1657-1659.
- Pinto L. (2003). Azeite e Ambiente. *Revista Voz da Terra*, p. 5-18.
- Piperidou C., Chaidou C., Stalikas C., Soutli K., Pilidis G. e Balis C. (2000). Bioremediation of olive oil mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **48**: 1941-1948.
- Ramos-Cormenzana A., Juarez-Jimenez B. e Garcia-Pareja M.P. (1996). Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38** (3-4): 283-290.
- Roig A., Cayuela M.L e Sanchez-Monedero M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Water Research*, **26**: 960-969.
- Rozzi A. e Malpei F. (1996). Treatment and disposal of olive mill effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 135-144.
- Russo D. (2011). Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. Tese de mestrado. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal.

- Sampaio M. (2011) Água-ruça: Tratamento anaeróbio e eletroquímico. Tese de mestrado. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal.
- Sampedro I., Aranda E., Martín J., Garcia-Garrido J.M., Garcia-Romera I. e Ocampo J.A. (2004). Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues. *Applied Soil Ecology*, **26**:149-156.
- Sayadi S., Allouche N., Jaoua M. e Aloui F (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, **35**(7): 725-735.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**: 3875-3883.
- Shao J., Renhui L., Lepo J. e Gu J.D. (2013). Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: Problems and prospects. *Journal of Environmental Management*, **125**: 149-155.
- Silva C. (2009). Aplicación directa de residuos de almazaras de dos fases en un olivar con riego localizado: Efectos en las propiedades edáficas y el cultivo. Tese de doutoramento. Universidad de Extremadura - Badajoz, Espanha.
- Singleton V.L., Orthofer R. e Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, **299**:152-178.
- Stom D.I. e Roth R. (1981). Some effects of polyphenols on aquatic plants: I. Toxicity of phenols in aquatic plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **27**: 332-337.
- Teixeira J. (2002). Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, **24**: 36-41.
- Tsagaraki E., Lazarides H.N. e Petrotos K.B. (2007). Olive mill wastewater treatment. In: Oreopoulou V., Russ W. (eds) Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. 133–157, Springer, New York.
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D. e Aggelis G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*, **84**: 251-257.
- Williamson G.B. e Richardson D. (1988). Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls. *Journal of Chemical Ecology*, **14**(1):181-187.

Wu L., Ge G. e Wan J. (2009). Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29. *Journal of Environmental Sciences*, **21**:237-242

**Acessos web:**

AlgaeBase (1996) Algae information <http://www.algaebase.org/>

(accedido em agosto de 2014).

Garcez, A. (2014). Imobilização de células de levedura.

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfhhEAD/imobilizacao-celulas-levedura#>

(accedido em setembro de 2014).

INE (2014). Instituto Nacional de Estatística. <http://www.ine.pt> (accedido em setembro de 2014).

IOC (2014). International Olive Council. <http://www.internationaloliveoil.org/> (accedido em setembro de 2014).