

**VALORIZAÇÃO DE BIOMASSA ALGAL RESULTANTE DE
PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO**

Diana Aurora Moreira Monteiro

Dissertação apresentada à **Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança** para obtenção do Grau de Mestre em **Energias Renováveis e Eficiência Energética.**

Orientado por
Professora Doutora Conceição Fernandes (ESA, CIMO-IPB)

Novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes em primeiro lugar por ter aceite a orientação desta tese, pelo apoio e ensinamentos, pela amizade e dedicação, estando sempre disponível para esclarecer as minhas dúvidas e tecer palavras de incentivo, agradeço também pelos bons comentários e sugestões que me facultou durante todas as fases desta dissertação.

Aos meus pais Artur e Aurora agradeço tudo o que sempre me proporcionaram, a dedicação e preocupação constantes, o carinho e amor diário, a confiança que sempre depositaram em mim e o incentivo que nunca me fez olhar para trás.

Agradeço ao meu irmão Hélder por todo o tempo que dispensou para mim, pelo apoio incondicional, pela preocupação, carinho e amizade.

Ao meu namorado Luís pelo apoio sempre demonstrado e sobretudo pelo seu amor e paciência.

Aos meus primos e tios por todo o apoio e incentivo, amizade e carinho que sempre demonstraram.

A todos os meus colegas de laboratório pelo apoio que sempre me prestaram, em especial à Bruna que foi a minha companheira de luta, um muito obrigada pelo carinho e amizade.

A todos os meus amigos que pela amizade, carinho, e por me ouvirem e me terem ajudado sempre que precisei.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese, o meu obrigado.

RESUMO

A biorremediação de efluentes através de microalgas ganha cada vez mais relevo, dada a comprovada eficácia do processo. Porém, a biorremediação, por norma, tem como objetivo remediar o efluente, obstante das transformações que resultam na biomassa. Assim, a possibilidade de obter biomassa utilizando efluentes com elevada carga orgânica e concomitantemente efetuando um processo de biorremediação, insere-se nas diretrizes atuais de gestão de resíduos que permitem minimizar o impacto ambiental, promovendo mais-valias.

Neste contexto surge o objetivo principal deste trabalho que visa caracterizar e comparar, do ponto de vista físico-químico e toxicológico, a biomassa resultante de processo de biorremediação de águas ruças de duas (AR-2) e três fases (AR-3). Os ensaios foram desenvolvidos em culturas *batch* utilizando células imobilizadas de *Chlorella vulgaris*, tendo-se avaliado a biomassa resultante de diferentes concentrações de AR (35%, 50% e 60% nas AR-2; 20% nas AR-3). Nos ensaios com AR-2 foi ainda avaliada a biomassa resultante de dois tratamentos sucessivos (2º ciclo da biomassa) e a resultante da otimização do processo, quer pelo uso de fotobiorreator de coluna de bolhas, quer pelo biotratamento do efluente sem preservação, por oposição à conservação por acidificação e congelação. Nos ensaios com AR-3 foi ainda avaliada a biomassa resultante de um segundo tratamento do efluente (2º tratamento).

A caracterização físico-química da biomassa foi realizada, comparativamente com os controlos (T0 e controlo negativo), pela variação do volume de esferas inoculadas e pelos teores de clorofila total, clorofila *a* e *b* (Chl *a* e Chl *b*), carotenoides, e proteínas totais. A variação dos compostos fenólicos foi avaliada na biomassa e no efluente (Folin-Ciocalteu e HPLC). Também os testes de ecotoxicidade foram realizados na biomassa e no efluente, respetivamente com a *Daphnia magna* (biomassa) e *Artémia salina* (efluente).

Os resultados mostraram que a biomassa resultante das biorremediações apresenta potencialidade para futuras utilizações, em especial as resultantes dos ensaios realizados em AR-2 (35% 2º ciclo e 50% com uso de coluna de bolhas). Estas séries apresentaram aumentos, quer a nível proteico, quer a nível de pigmentos, com especial destaque para os carotenoides. Os ensaios com AR-3 (20%) não se mostraram convidativos no que respeita ao teor de pigmentos, contudo o incremento do seu teor de proteínas apresenta potencial.

Ao nível dos compostos fenólicos registou-se uma diminuição no efluente após a biorremediação, demonstrando o potencial das microalgas para este efeito e a não incorporação destes compostos na biomassa final. Os resultados obtidos na ecotoxicidade vêm de acordo com os anteriores, uma vez que após a biorremediação, o efluente diminuiu a sua toxicidade e a biomassa aumenta a sua. Apesar da biomassa resultante apresentar alguma toxicidade, tal não inviabiliza a sua valorização.

Assim, esta biomassa apresenta-se com um enorme potencial de utilizações, porém com necessidade de um estudo mais aprofundado.

Palavras-chave: Biorremediação; Microalgas; *Chlorella vulgaris*; Valorização da Biomassa; Ecotoxicidade.

ABSTRACT

The Bioremediation of wastewater using microalgae has gained increasing importance, given the proven effectiveness of the process. However, the bioremediation normally, aims to remedy the effluent, regardless the transformations that result in biomass. Thus, the possibility of obtaining biomass using wastewater with high organic load and concurrently performing a bioremediation process is part of the current guidelines for waste management that minimize the environmental impact, promoting benefits.

In this context arises the main objective of this work is to characterize and compare the physico-chemical and toxicological point of view, the resulting biomass bioremediation process of two phases olive mill wastewater (AR-2) and three phases olive mill wastewater (AR-3). The assays were developed in batch cultures using immobilized cells of *Chlorella vulgaris*, having evaluated the resulting biomass of different concentrations of olive mill wastewater (35%, 50% and 60% in AR-2, and 20% in AR-3). In assays with AR-2 was further evaluated the biomass from two successive treatments (2nd cycle of biomass) and the resulting optimization of the process or by use of a bubble column photobioreactor or by biotreatment of wastewater without preservation, as opposed conservation by acidification and freezing. In tests with AR-3 was further evaluated biomass from the a second treatment of effluent (2nd Treatment).

The physico-chemical characterization of biomass was carried out, compared with controls (T0 and negative control), the variation of the volume of inoculated balls and the levels of total chlorophyll *a*, chlorophyll *b* (Chl *a* and Chl *b*), carotenoids, and total protein. The variation in phenolic compounds was evaluated in the biomass and effluent (Folin-Ciocalteu and HPLC). Also ecotoxicity tests were performed in the biomass and effluent, respectively with *Daphnia magna* (biomass) and *Artemia salina* (effluent).

The results showed that the resulting biomass from assays has potential for future uses, particularly those resulting from assays on AR-2 (35% 2nd cycle and 50% using a bubble column). This series showed increases both the protein level or the level of pigments, with special focus on carotenoids. Assays with AR-3 (20%) were not inviting as regards the pigment content, but the increase of their protein content presents potential.

At the level of phenolic compounds was registered a decrease in the effluent after bioremediation, demonstrating the potential of microalgae for this purpose and the non-incorporation of these compounds in the final biomass. The results obtained from

ecotoxicity tests according to the above, since after bioremediation the effluent decreased its toxicity and biomass its increased. Despite the resulting biomass present some toxicity, this does not invalidate its valorization.

Thus, this biomass is presented with a huge potential uses, but in need of further study.

Keywords: Bioremediation; Microalgae; *Chlorella vulgaris*; Valorization of biomass; Ecotoxicity.

ÍNDICE GERAL

| | |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| AGRADECIMENTOS | ii |
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT | v |
| ÍNDICE GERAL | vii |
| ÍNDICE FIGURAS..... | ix |
| ÍNDICE TABELAS..... | xi |
| 1. ENQUADRAMENTO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 Biorremediação..... | 3 |
| 2.2 Caracterização das águas ruças..... | 4 |
| 2.3 Microalgas | 5 |
| 2.3.1 Cultivo de microalgas com foco na biorremediação | 6 |
| 2.3.2 Caracterização da <i>Chorella vulgaris</i> | 7 |
| 2.4 Testes de toxicidade..... | 8 |
| 2.5 Objetivos..... | 10 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 3.1 Preparação e manutenção da <i>Chlorella vulgaris</i> | 11 |
| 3.2 Recolha e conservação das amostras de águas ruças..... | 12 |
| 3.3 <i>Screening</i> do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> | 13 |
| 3.4 Ensaios de biorremediação | 14 |
| 3.4.1 Desenvolvimento das culturas de biorremediação..... | 15 |
| 3.4.2 Imobilização das microalgas..... | 16 |
| 3.4.3 Preparação dos controlos | 17 |
| 3.5 Tratamento da biomassa após biorremediação | 18 |
| 3.6 Parâmetros Avaliados | 18 |
| 3.6.1 Avaliação Físico-Química | 19 |
| 3.6.1.1 Avaliação do Volume | 19 |

| | | |
|---------|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.1.2 | Clorofila Total | 19 |
| 3.6.1.3 | Pigmentos Fotossintéticos | 21 |
| 3.6.1.4 | Proteínas Totais | 22 |
| 3.6.1.5 | Compostos Fenólicos | 23 |
| 3.6.2 | Avaliação Toxicológica | 25 |
| 3.6.2.1 | Testes de ecotoxicidade da biomassa com <i>Daphnia magna</i> | 25 |
| 3.6.2.2 | Teste de ecotoxicidade do efluente com <i>Artémia salina</i> | 26 |
| 3.7 | Tratamento Estatístico de Dados | 28 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 4.1 | <i>Screening</i> do crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> | 29 |
| 4.2 | Ensaio de biorremediação | 30 |
| 4.2.1 | Crescimento das microalgas em AR-2 | 31 |
| 4.2.1.1 | Variação do volume de esferas | 31 |
| 4.2.1.2 | Pigmentos | 33 |
| 4.2.1.3 | Proteínas | 40 |
| 4.2.2 | Crescimento das microalgas em AR-3 | 44 |
| 4.2.2.1 | Variação do volume | 44 |
| 4.2.2.2 | Pigmentos | 44 |
| 4.2.2.3 | Proteínas | 47 |
| 4.3 | Compostos Fenólicos..... | 49 |
| 4.4 | Identificação dos compostos fenólicos | 51 |
| 4.5 | Avaliação Toxicológica | 54 |
| 4.5.1 | Testes de ecotoxicidade da biomassa com <i>Daphnia magna</i> | 54 |
| 4.4.2 | Teste de ecotoxicidade do efluente com <i>Artémia salina</i> | 58 |
| 5. | CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 63 |
| 6. | BIBLIOGRAFIA | 65 |

ÍNDICE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.1 – Aspeto das culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> | 11 |
| Figura 3.2 – Locais de recolha das águas ruças à saída da centrífuga..... | 12 |
| Figura 3.3 – Etapas do <i>screening</i> | 13 |
| Figura 3.4 – Esquema representativo dos ensaios de biorremediação realizados com AR-2 e AR-3. | 14 |
| Figura 3.5 – Etapas do processo de imobilização das microalgas..... | 16 |
| Figura 3.6 – Aspeto dos controlos da biomassa utilizados nos ensaios de biorremediação | 17 |
| Figura 3.7 – Aspeto das amostras durante o doseamento das proteínas totais | 22 |
| Figura 3.8 – Aspeto dos componentes do <i>kit Daphtoxkit FTM magna</i> | 25 |
| Figura 3.9 – Observação dos testes à lupa..... | 26 |
| Figura 3.10 – Testes de ecotoxicidade com artémia..... | 27 |
| Figura 4.1 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de <i>C. vulgaris</i> após a fermentação em <i>batch</i> em 35% AR-2..... | 31 |
| Figura 4.2 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de <i>C. vulgaris</i> após a fermentação em <i>batch</i> em 50% AR-2 com efluente não preservado | 32 |
| Figura 4.3 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de <i>C. vulgaris</i> após a fermentação em <i>batch</i> em 50% AR-2 com otimização do reator..... | 32 |
| Figura 4.4 – Variação de cor da biomassa de <i>C. vulgaris</i> na fermentação com AR-2 a 35% | 33 |
| Figura 4.5 – Variação da cor da biomassa de <i>C. vulgaris</i> na fermentação com AR-2 a 50% e 60% | 34 |
| Figura 4.6 – Variação de cor da biomassa de <i>C. vulgaris</i> na fermentação com AR-2 a 50%..... | 34 |
| Figura 4.7 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 35% AR-2, 1º ciclo da biomassa..... | 37 |
| Figura 4.8 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 35% AR-2, 2º ciclo da biomassa..... | 37 |
| Figura 4.9 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2. | 38 |
| Figura 4.10 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 60% AR-2. | 39 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.11 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado. | 39 |
| Figura 4.12 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2, utilização da coluna de bolhas. | 40 |
| Figura 4.13 – Variação de cor da biomassa de <i>C. vulgaris</i> após fermentação 20% AR-3, com e sem pré-adaptação: inóculo inicial sem pré-adaptação. | 45 |
| Figura 4.14 – Variação de cor da <i>C. vulgaris</i> após fermentação 20% AR-3 2º tratamento do efluente. | 45 |
| Figura 4.15 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 20% AR-3. | 46 |
| Figura 4.16 – Variação dos pigmentos na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 20% AR-3, 2º tratamento do efluente. | 47 |
| Figura 4.17 – Sobrevivência e mobilidade da <i>Daphnia magna</i> quando exposta à biomassa resultante do ensaio 35% AR-2 ao longo do tempo. | 55 |
| Figura 4.18 – Sobrevivência e mobilidade da <i>Daphnia magna</i> quando exposta à biomassa resultante do ensaio 35%, 2º ciclo da biomassa AR-2 ao longo do tempo. | 56 |
| Figura 4.19 – Sobrevivência e mobilidade da <i>Daphnia magna</i> quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 ao longo do tempo. | 56 |
| Figura 4.20 – Sobrevivência e mobilidade da <i>Daphnia magna</i> quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 com utilização do efluente não preservado ao longo do tempo. | 57 |
| Figura 4.21 – Sobrevivência e mobilidade da <i>Daphnia magna</i> quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 com otimização do biorreator ao longo do tempo. | 57 |
| Figura 4.22 – Sobrevivência da <i>Artémia salina</i> quando exposta a água destilada ao longo do tempo. | 59 |
| Figura 4.23 – Sobrevivência da <i>Artémia salina</i> quando exposta aos efluentes resultantes dos ensaios de biorremediação com AR-2 ao longo do tempo. | 60 |
| Figura 4.24 – Sobrevivência da <i>Artémia salina</i> quando exposta aos efluentes resultantes dos ensaios de biorremediação com AR-3 ao longo do tempo. | 61 |

ÍNDICE TABELAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 4.1 – Crescimento da <i>C. vulgaris</i> na presença das águas ruças em meio sólido após 14 dias de incubação..... | 29 |
| Tabela 4.2 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> em fermentação a 50% e 60% AR-2..... | 35 |
| Tabela 4.3 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado e coluna de bolhas. | 36 |
| Tabela 4.4 – Variação do teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 35% AR-2, 1º e 2º ciclos da biomassa..... | 40 |
| Tabela 4.5 – Variação do teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2 e 60% AR-2..... | 41 |
| Tabela 4.6 – Variação do teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado e coluna de bolhas. | 42 |
| Tabela 4.7 – Parâmetros físico-químicos resultantes dos ensaios realizados em AR-2. | 43 |
| Tabela 4.8 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 20% AR-3, com e sem pré-adaptação e 2º tratamento do efluente..... | 46 |
| Tabela 4.9 – Variação do teor de proteínas na ($\mu\text{g/mL}$) na <i>C. vulgaris</i> após fermentação em 20% AR-3, com e sem pré-adaptação e 2º tratamento do efluente..... | 48 |
| Tabela 4.10 – Parâmetros físico-químicos resultantes dos ensaios realizados em AR-3. | 48 |
| Tabela 4.11 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 35% AR-2, 1º e 2º ciclos da biomassa. | 49 |
| Tabela 4.12 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 50% e 60% AR-2. | 49 |
| Tabela 4.13 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 50% AR-2 com efluente não preservado e otimização do biorreator..... | 50 |
| Tabela 4.14 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 20% AR-3, biomassa com e sem adaptação e segundo tratamento do efluente..... | 51 |
| Tabela 4.15 – Variação do perfil de compostos fenólicos ($\mu\text{g.g-1}$ peso seco) em 35% AR-2. | 52 |
| Tabela 4.16 – Variação do perfil de compostos fenólicos ($\mu\text{g.g-1}$ peso seco) em 20% AR-3 sem pré-adaptação. | 53 |

Tabela 4.17 – Ecotoxicidade da biomassa e do efluente AR-2 e AR-3 após o biotratamento..... 62

1. ENQUADRAMENTO

As microalgas apresentam-se cada vez mais como uma excelente fonte de compostos biologicamente ativos, tais como pigmentos, lípidos, vitaminas e proteínas entre outros, com interesse não só nutricional mas também farmacêutico e energético. O aumento do interesse comercial destas culturas deve-se também à sua elevada eficácia na produção destes compostos, comparativamente com as culturas vegetais terrestres.

Atualmente a massificação do cultivo de microalgas exige um elevado investimento em meios de crescimento sintéticos. Assim surge o interesse na pesquisa de meios de cultura alternativos, com o fim de minimizar os custos deste tipo de produção. Nesse contexto, o crescimento de microalgas em processos de biorremediação, terá seguramente vantagens. As águas ruças são o principal resíduo da indústria de extração do azeite e a sua eliminação direta, sem qualquer tipo de tratamento, pode poluir ambientes terrestres e aquáticos. No Laboratório de Agro-Indústrias da Escola Superior Agrária, IPB, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar a diminuição dos compostos fenólicos nas águas ruças quando sujeitas a processos de biorremediação utilizando *Chlorella vulgaris*.

Assim, o objetivo geral desta dissertação visa estudar o cultivo da *C. vulgaris* em diferentes concentrações e tipos de águas ruças e caracterizar a respetiva formação da biomassa no final do processo, de forma a avaliar o seu potencial de valorização.

A dissertação encontra-se organizada em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento do estudo realizado, bem como ao principal objetivo proposto e à descrição geral da organização da tese escrita. No segundo capítulo apresenta-se uma breve revisão bibliográfica, no qual se aborda a biorremediação, são caracterizadas as águas ruças (2 e 3 fases), bem como a microalga em estudo, *Chlorella vulgaris*. Neste capítulo é feita ainda uma breve referência aos testes de toxicidade, nomeadamente tipos e importância, bem como são detalhados os objetivos específicos deste trabalho. No capítulo 3, encontram-se referidos de forma resumida, os materiais e métodos utilizados na preparação e manutenção da biomassa, nos ensaios de biorremediação e nas avaliações e testes realizados à biomassa algal após os ensaios e ao efluente. No capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos e é feita a consequente discussão dos mesmos. No capítulo 5, são sintetizadas as principais considerações

alcançadas neste estudo e finalmente é apresentada à listagem da bibliografia utilizada para a realização deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorremediação

A biorremediação é definida como um processo de degradação de contaminantes no ambiente por processos biológicos, utilizando o potencial metabólico dos microrganismos para degradar uma grande variedade de compostos orgânicos tóxicos (Scragg, 2005). A biodegradação realiza-se através do aproveitamento dos contaminantes pelos microrganismos como fonte de carbono, o que permite aos biorremediadores produzirem novas células (Martins et al., 2003).

Este processo apresenta assim grande importância na diminuição ou eliminação de substâncias contaminantes, uma vez que por último mineraliza os poluentes e liberta apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono e água (Li et al., 1997; Wise et al., 2000). Esta diminuição ou eliminação dos compostos tóxicos oferece vantagens à biorremediação quando comparada com outras técnicas usadas. Técnicas como o transporte ou a contenção dos contaminantes que apenas movem o problema de local ou forçam a sua monitorização em vez de o solucionarem (Vidali, 2001).

Existem duas modalidades de biorremediação: *in-situ* e *ex-situ*. Ou seja quando a biorremediação é realizada no próprio local falamos numa biorremediação *in-situ*, quando os efluentes estão sujeitos a transporte referimo-nos a uma biorremediação *ex-situ*. A biorremediação *ex-situ* permite uma superior monitorização e controlo de variáveis do que a *in-situ* e é largamente utilizada no tratamento de águas residuais (Metcalf e Eddy, 2003).

Como biorremediadores podem ser utilizadas bactérias (Guo et al, 2010), fungos (Singh, 2006), plantas (Vidali, 2001), algas (Olguín, 2003) e até organismos geneticamente modificados (Ezezika e Singer, 2010) porém quando o objetivo é remediar uma massa de água, as algas ganham uma maior relevância (Hermann et al., 2013).

A utilização das microalgas como agentes biorremediadores tem sido alvo de estudos graças aos baixos custos do processo, à elevada eficiência e obtenção de biomassa passível de ser utilizada. Esta biomassa pode ser utilizada na fertilização dos solos, como suplemento alimentar animal ou na obtenção de biocombustíveis (Tam e Wong, 2000; Bastos et al., 2004; Queiroz et al., 2007).

Na biorremediação de efluentes *in-situ* a utilização de microalgas, por exemplo, tem como principal contrapartida o elevado custo de recolhas das mesmas, após o processo (Olguín, 2003). A solução para este problema passa pela imobilização das algas (Jeanfils et al., 1986).

2.2 Caracterização das águas ruças

Os países da União Europeia são os maiores produtores de azeite, com cerca de 75% da produção mundial. O maior produtor é a Espanha com 46%, seguido de Itália com 15%, Grécia com 11% e Portugal com 2% (IOOC, 2010). Embora a produção de azeite seja uma atividade económica importante para estes países, tem um impacto ambiental significativo devido à utilização de elevadas quantidades de água e subsequente produção de águas ruças. Este impacto é variável, pois depende não só do consumo de água mas também da composição química das águas ruças, que por sua vez dependem da espécie de azeitona e respetivo cultivo, o grau de maturação do fruto e o tipo de processo de extração (Yay et al., 2012).

Atualmente são utilizados essencialmente os métodos de extração contínua. A extração contínua pode dividir-se numa extração de três ou duas fases. As principais diferenças nestes métodos residem na forma de separação de fases (sólida e líquida). Nas extrações de três fases a separação de fases é feita por centrifugação com adição de água razoavelmente quente com o intuito de facilitar a centrifugação (Fernandez et al., 1991). Na extração de duas fases a separação de fases é realizada com um *decanter* cujo funcionamento não necessita de água (Di Giovacchino, 1998). Da extração de três fases resulta azeite, bagaço e águas ruças de três fases (AR-3), daí a designação de três fases face ao número de frações resultantes.

Por outro lado, na extração de duas fases resulta azeite e um bagaço húmido, onde se incluem as águas de vegetação da azeitona (Morillo et al., 2008). Os efluentes líquidos resultantes destes lagares integram as águas de lavagem da azeitona e a água de constituição do fruto. Este sistema têm assim a vantagem de gerar menor volume de efluente líquido, com um consumo de água e energia inferior ao do sistema de três fases (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

Contudo existe ainda um sistema “misto” que integra o sistema de 3 fases e o de 2 fases, no qual é usada menor quantidade de água (comparativamente à de 3 fases), originando assim também água ruça (Di Giovacchino et al., 2002).

De uma forma genérica, as águas ruças são ácidas, de alta condutividade e com diversas substâncias dissolvidas e em suspensão. Regra geral o efluente é constituído por cerca de 83-94% de água, 4-16% de matéria orgânica (gorduras, açúcares, substâncias azotadas, ácidos orgânicos, polialcoois, pectinas, taninos e compostos fenólicos) e 0,4-2,5% sais minerais (essencialmente por potássio, sódio, carbonatos e fosfatos) (Ramos-Cormenzana et al., 1996). Destaca-se ainda a sua cor, vermelha escura ou preta, esta coloração deve-se fundamentalmente à presença de compostos fenólicos poliméricos (Tsioulpas et al., 2002).

Os compostos fenólicos que estão presentes nos caroços e na polpa da azeitona tendem a ser mais solúveis na fase aquosa, sendo desta forma transmitidos para as AR. Atualmente já se encontram identificados mais de 30 compostos fenólicos nas AR (McNamara et al., 2008). São normalmente divididos em três categorias: derivados de ácido cinâmico, derivados de ácido benzóico e derivados de tirosol (Justino et al. 2011). Estes compostos têm tendência durante o armazenamento a converter-se, por ação de polimerases, em polímeros de elevado peso molecular, os quais são compostos particularmente difíceis de degradar (Ayed et al. 2005; Crognale et al. 2006; Justino et al., 2009).

Considerando que a extração industrial de azeite origina elevada quantidade de resíduos e sub-produtos e que em particular as AR geradas têm alto poder contaminante, importa minimizar o seu impacto ambiental através duma gestão adequada.

2.3 Microalgas

As microalgas caracterizam-se por serem organismos pequenos (microscópicos), unicelulares (embora formem colónias com diferenciação celular) e coloridos (atividade fotossintética e presença de pigmentos). Quase todas as espécies de microalgas são fotoautotróficas e filogeneticamente podem ser eucarióticas ou procarióticas (Olaizola, 2003). Esta diversificação de características torna as microalgas um grupo extremamente heterogéneo, sendo que se podem encontrar exemplares em todo o mundo, principalmente

em ambientes aquático. Embora sejam por norma organismos de vida livre, existem espécies que vivem em associação simbiótica com outros organismos (Tomaselli, 2004).

A classificação das microalgas tem sido realizada, para além dos critérios citológicos e morfológicos, quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química das reservas e os constituintes da parede celular (Tomaselli, 2004). Uma das principais mais-valias destes organismos é a sua elevada eficiência fotossintética na conversão de energia solar, quando comparados com plantas de superfície. Esta mais-valia é exclusiva das microalgas eucarióticas que graças a sua estrutura celular simples e grande superfície volumétrica, conseguem absorver maior quantidade de nutrientes. O facto de crescerem essencialmente em suspensão aquosa aumenta a eficiência no acesso a água, CO₂ e outros nutrientes (Khan et al., 2009).

2.3.1 Cultivo de microalgas com foco na biorremediação

O estudo e cultivo das microalgas atualmente assentam em três vertentes de interesse para o ser humano e ambiente. A primeira vertente está direccionada na suplementação alimentar animal e humana (Benemann, 1990). As microalgas permitem a extração de compostos de elevado valor nutricional como ácidos gordos polinsaturados, carotenoides, polissacarídeos, vitaminas e compostos bioactivos naturais, entre outros (Derner et al., 2006; Harun et al., 2010; Spolaore et al., 2006).

A segunda vertente está direccionada para a área dos biocombustíveis, desde há vários anos têm-se realizado estudos que visam a produção de hidrogénio, metano e etanol através desta matéria-prima (Harun et al., 2010; Wen e Jonhson, 2009). Mais recentemente iniciaram-se estudos na produção também de biodiesel com a otimização da acumulação de lípidos nas microalgas (Chisti, 2007; Rodolfi et al., 2008). A diversidade bioquímica (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) das espécies de microalgas está diretamente relacionada com a natureza da espécie, fatores ambientais e meio de cultivo. A variação dos dois últimos fatores permite a mesma espécie gerar subprodutos diferentes, permitindo consequentemente a produção de diferentes biocombustíveis.

Por último, a terceira vertente de interesse das microalgas reside na sua utilização como agente de mitigação de problemas ambientais, particularmente no tratamento de efluentes e águas residuais (Jacob-Lopes et al., 2008).

As três vertentes encontram-se interligadas quando pensamos no tratamento de águas residuais como um meio de cultivo para as microalgas. Esta solução permite o tratamento do efluente e simultaneamente a produção de biomassa enriquecida a um custo reduzido (Rodolfi et al., 2008; Xin et al., 2010). A biomassa resultante deste processo (biorremediação) terá como destino a produção de biocombustível (Li et al, 2011; Rawat et al, 2011), a produção de complementos alimentares, fertilizantes agrícolas, produtos farmacêuticos e cosméticos, entre outros (Mallick, 2002) mediante as suas características físico-químicas e toxicológicas no final do processo.

Para o crescimento das microalgas em geral é necessário um meio de cultivo com nutrientes, como carbono, nitrogénio, fósforo e enxofre (Wang et al., 2008). Estes nutrientes são comumente encontrados em efluentes agro-industriais, sugerindo assim o crescimento destes microrganismos nestas águas. A absorção é o principal mecanismo de remoção de nutrientes pelas microalgas, existindo uma relação direta entre a velocidade específica de crescimento dos microrganismos e a remoção de nutrientes. Desta forma o nitrogénio e o fósforo poderão ser utilizados para o crescimento celular e removidos de forma eficiente, contudo o efluente deve apresentar uma relação N/P (N – azoto; P – Fosforo) apropriada (Xin et al., 2010). A avaliação da influência da quantidade e qualidade de nutrientes na *Chlorella vulgaris*, utilizando meio sintético e um efluente digerido de suinicultura foi realizada por Kumar et al. (2010). Estes autores verificaram que não existiam diferenças entre meios, no que respeita à produção da microalga, e que o elevado crescimento pode ser alcançado em pouco tempo desde que haja quantidade suficiente de nutrientes.

Assim, a possibilidade de crescimento de microalgas em efluentes gerados durante a extração do azeite poderá ser uma estratégia vantajosa.

2.3.2 Caracterização da *Chlorella vulgaris*

A microalga que foi testada neste trabalho foi a *Chlorella vulgaris* e a escolha desta espécie teve por base a sua fácil manutenção em laboratório, o seu potencial de aplicação e a vasta bibliografia escrita sobre a mesma.

A *C. vulgaris* pertencente à classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales e família Chlorellaceae (Guiry e Guiry, 2014). É uma microalga verde, eucariótica que cresce em água doce, (Queiroz et al, 2008) que em condições normais apresenta uma

forma de vida unicelular, mas em condições adversas têm tendência para formar agregados ou colónias. A reprodução pode ser feita por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual (Ohse et al., 2008). A principal forma de reserva desta microalga é o amido e pode acumular pigmentos como a clorofila *a* e *b*, e carotenoides (Bertoldi et al., 2008; Ohse et al., 2008, Queiroz et al, 2008).

2.4 Testes de toxicidade

A toxicidade debruça-se sobre o estudo do potencial de uma substância em causar um efeito danoso a um organismo vivo. Depende fortemente da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo vivo é exposto, assim como do tempo de exposição (Ribo, 1997).

Nesta ordem surgem os testes de toxicidade que resultam de ensaios laboratoriais, realizados sobre condições específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade, por exemplo, de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais. Estes ensaios laboratoriais decorrem com a exposição de organismos-teste a diferentes concentrações de amostra, decorrendo com a observação e quantificação dos efeitos tóxicos (Ribo, 1997; Ronco et al., 2004). Do estudo do efeito de agentes químicos na dinâmica de populações e comunidades integrantes de um ecossistema definido nasce a ecotoxicologia (Kendall et al., 2001; Ronco et al., 2004). Neste contexto surge a ecotoxicologia aquática que apresenta como principal objetivo a avaliação do efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático (Gherardi-Goldstein et al., 1990). Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados, uma vez que os ecossistemas aquáticos são os recetores finais de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos de água por meio das descargas de efluentes, ou de forma indireta como a sua deposição no solo (Gherardi-Goldstein et al., 1990; Kendall et al., 2001).

Organismos-teste são espécies mantidas em laboratório e cujos conhecimentos da sua biologia são suficientes para que possam ser utilizados como indicadores a substâncias tóxicas e cujos resultados sejam passíveis de serem interpretados (Arizon et al., 2011). Em princípio, qualquer espécie aquática pode ser utilizada em testes de toxicidade (Van Leeuwen, 1988) contudo, as espécies utilizadas devem apresentar as seguintes características: sensibilidade comprovada aos contaminantes, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade de seu nível trófico, significado ambiental em relação à área de estudo e facilidade de cultivo e de adaptação às condições

de laboratório (Range et al., 1995; APHA,1998; Ronco et al., 2004). Sempre que possível é recomendável que para a mesma amostra serem realizados testes com mais do que uma espécie aquática, com o fim de melhorar a avaliação do impacto do contaminante (Gherardi-Goldstein et al., 1990), contudo razões práticas e económicas muitas vezes impossibilitam a prática desta recomendação (Ribo, 1997).

Os testes de toxicidade podem ser do tipo agudo ou crónico. Os ensaios de toxicidade aguda avaliam a capacidade do efluente, por exemplo, em causar danos (em geral morte ou imobilidade) aos organismos-teste, após um curto período de exposição à amostra (normalmente inferior a 96 horas). Se a amostra de efluente apresentar toxicidade aguda, significa que esta é suficientemente tóxica para matar o organismo-teste num curto espaço de tempo. Nos ensaios de toxicidade crónica os organismos-teste são expostos à amostra durante um intervalo de tempo mais significativo, tendo em conta o seu ciclo de vida (em geral, superior a 72 horas). Nestes são avaliadas alterações na reprodução e no crescimento. Quando a amostra avaliada apresenta toxicidade aguda, a morte dos organismos-teste impossibilita a observação dos efeitos crónicos. Normalmente são realizados os ensaios de toxicidade aguda e, caso esta não ocorra mortalidade na amostra, realizam-se então os ensaios de toxicidade crónica (Arizon et al., 2011).

Os testes de toxicidade surgem assim como um complemento as análises físico-químicas realizadas tradicionalmente. As análises físico-químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. As primeiras por si só não são capazes de distinguir entre substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente, não sendo assim suficientes para avaliar o potencial risco ambiental dos contaminantes. Assim os testes de toxicidade apresentam uma enorme importância na avaliação da qualidade das águas e a carga poluente de efluentes (Costa et al., 2008). Contudo os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada substância apresenta para o ser humano, dada a elevada dificuldade em extrapolar resultados de toxicidade, obtidos nos organismos em laboratório, para os seres humanos (Costa et al., 2008).

2.5 Objetivos

A possibilidade de crescimento de microalgas em efluentes e concomitantemente efetuar um processo de biorremediação, insere-se nas diretrizes atuais de gestão de resíduos que visam minimizar o impacto ambiental e que promovam mais-valias. Neste contexto, pretendem-se usar as águas ruças (AR) como meio de cultivo para a *Chlorella vulgaris*, promovendo a sua biorremediação. Será testado o crescimento da *Chlorella vulgaris* imobilizada em águas ruças de duas e três fases, sendo que uma das principais características destas águas é a presença dos compostos fenólicos. Posteriormente, a biomassa algal resultante do processo de biorremediação poderá ser usada em diferentes aplicações, em função das suas características físico-químicas e toxicológicas. Assim, foram objetivos específicos deste trabalho:

- * Avaliar o potencial de crescimento da *C. vulgaris* nas AR;
- * Avaliar a composição físico-química da biomassa algal resultante;
- * Avaliar a eficiência de remoção dos compostos fenólicos nas AR;
- * Avaliar a toxicidade da biomassa algal resultante;
- * Avaliar a toxicidade do efluente final tratado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação e manutenção da *Chlorella vulgaris*

Para a biorremediação foram utilizadas culturas monoalgais de *Chlorella vulgaris* estirpe CBSC 15-2075 - Carolina Biological Supply Co., Burlington, USA (CBS). A manutenção de *stocks* e o desenvolvimento de culturas em pequenos e médios volumes é realizada em meio de Bold Basal Modificado. As culturas *stock* são mantidas em meio sólido (1,5% agar m/v), com cerca de 10 mL de meio de cultura, em ambiente controlado a $18^{\circ}\text{C}\pm 1$, intensidade luminosa de 2390-3000 lux, proveniente de lâmpadas fluorescentes (Gro-Lux) e com fotoperíodo 12h/12h luz/escuro.

As culturas em meio líquido de *C. vulgaris* (Figura 3.1) são rotineiramente desenvolvidas no mesmo meio e agitadas continuamente por fluxo de ar, utilizando filtros estéreis de 0,2 μm e diâmetro de 50 mm (Millex™). As culturas são mantidas à temperatura ambiente, com iluminação de 4500 lux e com fotoperíodo de 16h/8h luz/escuro. Para estimular a fase exponencial era adicionado meio novo até ao volume final de 2L. Os meios de cultura e o material de vidro utilizado são previamente esterilizados em autoclave (AJC Uniclave 88).



Figura 3.1 – Aspeto das culturas de *Chlorella vulgaris*.

3.2 Recolha e conservação das amostras de águas ruças

A recolha das amostras de águas ruças (AR) foi feita nos dias 27 e 28 de janeiro de 2014. Foram obtidas águas ruças de lagares mistos de 2 e 3 fases (referidas no âmbito deste trabalho como de 2 fases -AR-2) e de 3 fases (AR-3).

Ambas as amostras foram recolhidas no distrito de Bragança, GPS 41.540738, -6.965350 e GPS 41.825285, -6.731902, respetivamente. As amostras foram recolhidas em garrações plásticas de 5 litros, num total de 10 litros para cada fase. Os lagares onde foram recolhidas as amostras ainda se encontravam em laboração (Figura 3.2).

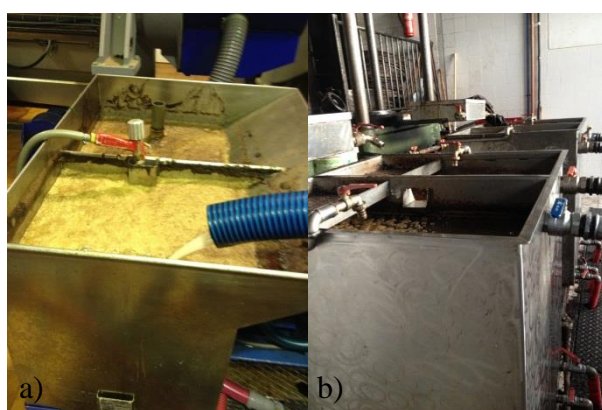


Figura 3.2 – Locais de recolha das águas ruças à saída da centrífuga; a) AR-2; b) AR-3.

A preparação das AR foi realizada no laboratório, no dia que seguiu à recolha, e consistiu numa filtração, para remoção de possíveis partículas em suspensão, e posterior acidificação até pH 2 (ácido nítrico), de 4 dos 10 litros recolhidos de cada AR, que foram em seguida congelados. O restante volume de AR foi armazenado no frigorífico sem acidificação.

3.3 *Screening* do crescimento da *Chlorella vulgaris*

Para a avaliação do potencial crescimento da *C. vulgaris* nas AR, foram testadas diferentes diluições do efluente em culturas em meio sólido. Neste *screening* inicial, as águas ruças foram testadas em sete diluições sucessivas (10-70% v/v, em água destilada), utilizando os efluentes logo à chegada ao laboratório, ou seja sem serem congelados. Assim, as diferentes diluições foram preparadas em agar sólido (1,5 % m/v), autoclavadas (AJC Uniclave 88) e posteriormente distribuídas por placas de Petri (50 x 13 mm) em condições axénicas. O controlo de crescimento foi preparado com meio Bold Basal Modificado. As placas foram inoculadas à chama com 80 μ L de cultura na fase exponencial, conforme Figura 3.3. Foi ainda utilizado um controlo de esterilização, apenas com meio Bold Basal Modificado.



Figura 3.3 – Etapas do *screening*: a) preparação das diluições de efluente com agar; b) e c) inoculação das placas.

As placas de Petri foram seladas com parafilm e incubadas em câmara controlada com as seguintes condições: $21^{\circ}\text{C}\pm 1$, intensidade luminosa 4500 lux (lâmpadas fluorescentes Gro-LUX) e fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro). O crescimento da *C. vulgaris* na presença dos efluentes foi avaliado por comparação com o controlo do crescimento, após 5 e 14 dias de incubação. Para cada diluição de AR, e respetivos controlos, foram testadas 4 réplicas.

3.4 Ensaios de biorremediação

A remoção dos compostos fenólicos das águas ruças e a avaliação da biomassa algal resultante do processo de biorremediação foi realizada em culturas em meio líquido, utilizando células imobilizadas de *Chlorella vulgaris*. Para testar o efeito de diferentes concentrações e tipos de AR na biomassa algal, foram realizadas várias séries de ensaios, conforme esquema da Figura 3.4, tendo em conta os resultados do *screening* prévio.

Nas águas ruças de duas fases (AR-2) foram testadas diluições do efluente a 35%, 50% e 60%, em água destilada. Para a diluição de 35% foi testado, para além do 1º ciclo, um 2º ciclo da biomassa, isto é, a biomassa resultante da fermentação do primeiro ciclo foi posteriormente inoculada para novo tratamento do efluente.

A diluição de AR-2 a 50% foi ainda utilizada nos ensaios de biorremediação com o efluente não preservado e na otimização do biorreator. Os primeiros tiveram como objetivo comparar os resultados anteriormente obtidos, com o efluente preservado por congelação, com os obtidos com o efluente meramente mantido no frigorífico. Os segundos tiveram como objetivo comparar os resultados anteriormente obtidos com os obtidos com fermentações a decorrerem num reator do tipo coluna de bolhas.

Exceto para as culturas diluídas a 35% (a primeira série a ser realizada) todos os restantes ensaios foram efetuados com pré-adaptação das culturas ao efluente.

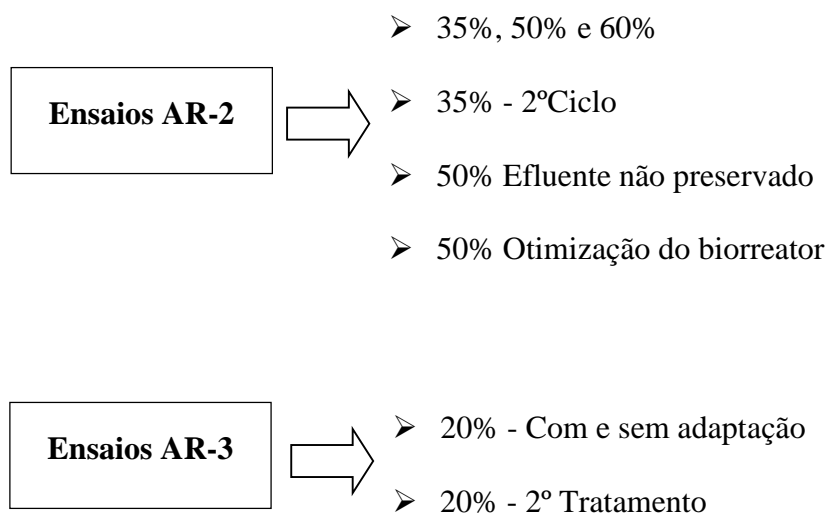


Figura 3.4 – Esquema representativo dos ensaios de biorremediação realizados com AR-2 e AR-3.

No que diz respeito as águas ruças de 3 fases (AR-3) apenas foi testada a diluição de 20%. Contudo, esta diluição não foi realizada com água destilada (como as AR-2) mas sim com meio de cultura Bold Basal Modificado. Nesta concentração de AR-3 foram testadas três vertentes: ensaio com biomassa com e sem pré-adaptação e um segundo tratamento do efluente. O segundo tratamento do efluente foi realizado da seguinte forma: ao efluente resultante da fermentação de 20% (não adaptada) foi inoculada nova biomassa sem pré-adaptação.

A pré-adaptação foi executada desenvolvendo as culturas em meio líquido, com AR diluídas em meio Bold Basal Modificado, nomeadamente a 10% em AR-2 e a 2,5% em AR-3. As diluições foram previamente autoclavadas (AJC Uniclave 88). Todos os ensaios foram inoculados com as culturas em fase exponencial, avaliada por contagem do número de células em câmara de Neubauer.

3.4.1 Desenvolvimento das culturas de biorremediação

A preparação destas culturas iniciou-se com a diluição do efluente nas concentrações pretendidas. Conforme referido, em função da diferente resposta do crescimento das microalgas, obtida no *screening* prévio, as diluições foram realizadas em meio Bold Basal Modificado para as AR-3 e em água destilada para as AR-2. Em ambos os casos, as amostras de AR utilizadas na diluição foram previamente descongeladas, homogeneizadas à temperatura ambiente e repostos o valor inicial do pH utilizando hidróxido de sódio.

Os ensaios decorreram em *batch*, sendo apenas e quando necessário, repostos os níveis de cultura devido à evaporação, com água destilada autoclavada. As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyers, em condições não axénicas, apesar dos efluentes à diluição pretendida terem sido autoclavados, e utilizando sempre a razão de 20 (v/v) de volume de cultura por volume de células imobilizadas. Em todos os ensaios o volume de esferas, inoculado era contabilizado.

Os ensaios foram realizados com aerificação constante, à temperatura ambiente $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e com iluminação natural (exceção na série 50% AR-2 otimização do biorreator que se realizou em regime permanente de luz 3800 lux). Todas as séries foram realizadas à escala laboratorial. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.4.2 Imobilização das microalgas

No crescimento de microalgas em efluentes oriundos de águas residuais surge o problema relacionado com a separação da biomassa após o processo de biotratamento. Assim como forma de colmatar esta dificuldade a utilização das microalgas imobilizadas pode ser a solução. Para além disso a imobilização ajuda a manter a quantidade de biomassa para posteriores processos (Jeanfils et al., 1983). Neste contexto os ensaios realizados neste trabalho foram feitos com as microalgas imobilizadas.

A imobilização da *C. vulgaris* foi feita numa solução de alginato de sódio a 1,5% (m/v). Inicialmente foi preparada uma solução de alginato de sódio a 3%, previamente autoclavada, à qual foi posteriormente adicionado igual volume de cultura de microalgas, em ambiente não asséptico, até se obter uma concentração final de 1,5% de alginato de sódio. A solução anterior (microalgas+alginato de sódio) é extraída para uma bureta e deixada gotejar para uma solução de cloreto de cálcio a 2% previamente preparada, sob agitação suave com o auxílio de um magneto (Figura 3.5).



Figura 3.5 – Etapas do processo de imobilização das microalgas: a) Gotejamento da solução de microalgas em alginato de sódio; b) Aspeto das esferas de microalgas em alginato de sódio na solução de cloreto de cálcio.

As esferas foram mantidas durante 30 minutos na solução de cloreto de cálcio para endurecerem. Depois do endurecimento as células imobilizadas foram lavadas abundantemente com água destilada e ficaram a incubar *overnight* em meio Bold Basal Modificado para posteriormente serem inoculadas nos ensaios de biorremediação. Foram preparadas do mesmo modo, para as culturas controlo, esferas de alginato de sódio, nas

quais o volume de cultura de microalgas foi substituído por igual volume de água destilada.

3.4.3 Preparação dos controlos

Em todas as séries de ensaios, para a biomassa algal imobilizada, foram utilizados controlos negativos e positivos. Os controlos negativos consistiram em culturas sem biomassa algal, isto é culturas inoculadas com esferas de alginato de sódio sem microalgas (Figura 3.6). Este controlo permite-nos, à partida, verificar se o aumento do volume das esferas no final das séries se deve ao crescimento celular ou a fatores externos.

Para controlo positivo foram guardadas amostras do tempo zero (T0) da cultura imobilizada e inoculada em cada ensaio das séries de biorremediação. Este controlo permite-nos, através da comparação, verificar as alterações físico-químicas e toxicológicas a que a biomassa algal está sujeita quando submetida a novos meios de cultura não convencionais, como as AR.

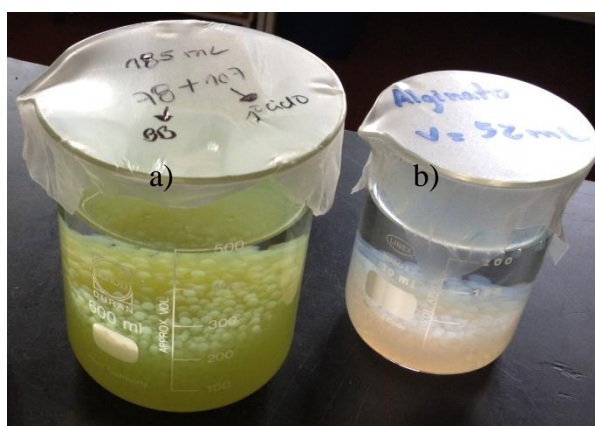


Figura 3.6 – Aspeto dos controlos da biomassa utilizados nos ensaios de biorremediação: a) Esferas de alginato de sódio com biomassa imobilizada ao T0; b) Esferas de alginato de sódio com água destilada.

3.5 Tratamento da biomassa após biorremediação

No final do processo de biorremediação, para cada ensaio, as células imobilizadas foram recolhidas, lavadas com água destilada e foi medido o seu volume final, utilizando uma proveta. Posteriormente, as células foram desmobilizadas numa solução de citrato de tri-sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) a 3-6% numa relação de 1:1,5 (células:solução). Para promover a rápida desmobilização foi utilizado o agitador eletromagnético (P-Selecta – Agimatic-E).

A solução de células desmobilizadas resultante foi filtrada (50 μm) e centrifugada 5 min a 3000 rpm (Hettich Universal 30 RF), utilizando tubos de Falcon. O sobrenadante foi descartado e seguiram-se 3 lavagens sucessivas. A cada lavagem esteve inerente a seguinte metodologia: descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 35 mL de água destilada autoclavada, homogeneizou-se no vortex (Nahita 681) e voltou à centrifuga (5min/3000rpm). No final as microalgas foram ressuspensas em água destilada autoclavada e retiraram-se 5 mL para a extração da clorofila total e avaliação do teor de proteínas. O restante volume foi novamente centrifugado (5min/3000rpm) e o *pellet* resultante foi congelado e posteriormente liofilizado (ScanVac CoolSafe).

As amostras resultantes do controlo positivo e do tempo zero (T0) não sofreram processo de lavagem, ou seja, após a desmobilização das células, as soluções foram centrifugadas e o *pellet* resultante diretamente ressuspensas em água destilada autoclavada e posteriormente sofreu o mesmo processo.

3.6 Parâmetros Avaliados

Para a caracterização da biomassa algal resultante do processo de biorremediação foram tidas em conta duas principais componentes: a avaliação físico-química e a avaliação toxicológica. Por sua vez, na avaliação físico-química foram considerados quatro principais parâmetros: a variação do seu volume, o perfil em pigmentos, o teor em proteínas totais e o perfil em compostos fenólicos. Por outro lado, a fim de avaliar a toxicidade da biomassa e do efluente foram utilizadas amostras em testes de ecotoxicidade utilizando *Daphnia magna* e *Artémia salina*, respetivamente.

3.6.1 Avaliação Físico-Química

3.6.1.1 Avaliação do Volume

Esta avaliação consistiu na medição e registo do volume inicial e final das esferas inoculadas em cada ensaio. No início e no final do processo de biorremediação as esferas foram lavadas com água destilada e foi medido o seu volume com o auxílio de uma proveta e do volume de água deslocado. Este processo foi também realizado no controlo negativo. Assim foram calculadas as variações de volumes em percentagem com a seguinte fórmula:

$$\text{Variação Volume (\%)} = \frac{V_{t_i} - V_{t_f}}{V_{t_i}} \times 100$$

Em que:

V_{t_i} = Volume do inóculo inicial (mL)

V_{t_f} = Volume registado após a biorremediação (mL)

A subtração da variação do volume do controlo negativo ao volume de microalgas imobilizadas, para cada série de ensaios permitiu calcular o volume efetivo resultante da biorremediação (Biorre-efe).

3.6.1.2 Clorofila Total

A quantificação da clorofila total foi feita em biomassa fresca final (desmobilizada), resultante dos ensaios de biorremediação e, nos respetivos controlos.

Para a quantificação da clorofila total utilizou-se o método espectrofotométrico. Resumidamente retiram-se 5 mL de amostra, leva-se à centrífuga a 3500 rpm, 15 min (Labofuge 300 Heraeus) e adiciona-se 4 mL de acetona (90% (v/v)) ao precipitado. Os tubos são tapados com papel de prata e parafilme para evitar a degradação da cor e a evaporação da acetona. As soluções são homogeneizadas no vortex (Nahita 681) seguido do ultrassom (Elma Sonic S60H). As amostras ficaram a repousar no frigorífico durante aproximadamente 16 horas, após o que se recolhe o sobrenadante, obtido por centrifugação, e se procede a leitura da absorvância (Genesis 10 UV). A absorvância do

extrato é lida a 665 nm (pico da clorofila *a*) e 750 nm (representa o valor da turbidez) antes e depois da adição de 12 µL de HCl a 0.5M. Todas as quantificações foram feitas em duplicado. Para o cálculo das concentrações de clorofila total utilizou-se a equação (Lorenzen, 1967):

$$\text{Chl total } (\mu\text{g/mL}) = \frac{11,4 \times K \times [(A_{663} - A_{750}) - (A_{645A} - A_{750A})] \times V_1}{V_2 \times P} \times \frac{Q_1}{Q_2}$$

Em que:

K = fator que uniformiza a redução na absorvância para a concentração inicial da clorofila após acidificação = $R/(R-1) = 2,43$

A₆₆₅ = Absorvância a 665 antes da acidificação

A₇₅₀ = Absorvância a 750 antes da acidificação

A_{665A} = Absorvância a 665 depois da acidificação

A_{750A} = Absorvância a 750 depois da acidificação

V₁ = volume de acetona utilizado na extração (mL)

V₂ = volume utilizado de amostra (mL)

P = 1 (percurso ótico da cuvete, cm)

Q₁ = Volume final de células imobilizadas (mL)

Q₂ = Volume de água utilizado para ressuspender as microalgas após lavagem (mL)

Para efeitos de comparação foi ainda calculada a percentagem de variação da clorofila total para cada ensaio, a variação foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Variação Chl total (\%)} = \frac{\text{Chlt}_i - \text{Chlt}_f}{\text{Chlt}_i} \times 100$$

Em que:

Chlt_i = Concentração de clorofila total do inóculo inicial, T0 (µg/mL)

Chlt_f = Concentração de clorofila total registada após a biorremediação (µg/mL)

3.6.1.3 Pigmentos Fotossintéticos

A quantificação dos pigmentos foi feita em biomassa final liofilizada, resultante dos ensaios de biorremediação, utilizando-se métodos espectrofotométricos. Para esse efeito, foram feitas duas extrações sucessivas com metanol (90%). Primeiramente procedeu-se à pesagem das amostras e adição de metanol a 90% à razão de aproximadamente 1:0,172 (v/m). Posteriormente seguiu-se a seguinte sequência: homogeneização no vortex, banho-maria a 20min, 70°C (P Selecta Precistern), ultrassom durante 20seg-pausa-20seg-pausa20seg-pausa (Elma Sonic S60H), banho-maria novamente (20min/70°C), ultrassom (20seg-pausa-20seg-pausa20seg-pausa) e por fim centrifugação durante 10 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de ensaio e tapados com parafilm. Posteriormente, ao *pellet* resultante, foi feita nova extração com metanol a 90%, à razão de 1:0,130 (v/m), repetindo-se a sequência de vortex, banho-maria, ultrassom, banho-maria, ultrassom e centrifugação já descrita. O sobrenadante foi transferido para os tubos de ensaio onde já se encontrava o conteúdo da primeira extração.

As absorvâncias das amostras foram lidas aos comprimentos de onda 750 nm, 663 nm, 645 nm e 480 nm num espectrofotômetro Hitachi U-200. As quantificações foram feitas em duplicado. Para o cálculo da clorofila *a* e clorofila *b* (Jeffrey & Humphrey, 1975), bem como dos carotenoides (Parson and Strickland, 1963), utilizaram-se as seguintes equações:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/g peso seco)} = \frac{[11,93 \times (A_{663} - A_{750})] - [1,93 \times (A_{645} - A_{750})] \times V_1}{P \times P_1}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/g peso seco)} = \frac{[20,36 \times (A_{663} - A_{750})] - [5,5 \times (A_{645} - A_{750})] \times V_1}{P \times P_1}$$

$$\text{Carot (}\mu\text{g/g peso seco)} = \frac{[10 \times (A_{480} - A_{750})] \times V_1}{2,5 \times P}$$

Em que:

A_{665} = Absorvância a 665 nm

A_{750} = Absorvância a 750 nm

A_{480} = Absorvância a 480 nm

V_1 = Volume de metanol utilizado nas extrações (mL)

P = Peso da amostra liofilizada (μg)

P₁ = 1 (percurso ótico da cuvete, cm)

3.6.1.4 Proteínas Totais

A quantificação das proteínas totais foi feita em biomassa fresca final (desmobilizada) resultante dos ensaios de biorremediação e respetivos controlos, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Resumidamente, ao *pellet* resultante da extração para a quantificação da clorofila total, foram adicionados 5 mL de NaOH/0,5 M, após o que as amostras foram para o banho-maria durante 20 min a 100°C, depois de arrefecerem foram centrifugadas durante 15 minutos à 3500 rpm. Do sobrenadante foi retirado 1,5 mL para novos tubos de ensaio e adicionados 2 mL de solução Bradford (Figura 3.7). A leitura a 595 nm foi realizada no espectrofotómetro Genesis 10 UV. A concentração de proteínas totais foi feita considerando uma curva de calibração, utilizando albumina de soro bovino como padrão. As quantificações foram feitas em duplicado e os resultados expressos em $\mu\text{g/mL}$.

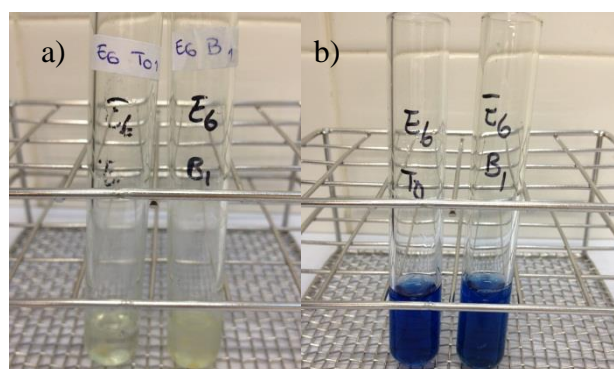


Figura 3.7 – Aspeto das amostras durante o doseamento das proteínas totais: a) Sobrenadante resultante da centrifugação; b) Amostra pronta a leitura no espectrofotómetro.

Para efeitos de comparação foi ainda calculada a percentagem de variação da proteína total para cada ensaio, através da seguinte fórmula:

$$\text{Variação Proteína total (\%)} = \frac{\text{Prt}_i - \text{Prt}_f}{\text{Prt}_i} \times 100$$

Em que: **Prt_i** = Concentração de proteína total do inóculo inicial, T0 ($\mu\text{g/mL}$)

Prt_f = Concentração de proteína total registada após a biorremediação ($\mu\text{g/mL}$)

3.6.1.5 Compostos Fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos compreendeu a quantificação dos fenólicos totais e a identificação e quantificação de compostos fenólicos individuais por HPLC.

Fenólicos Totais

A quantificação dos fenólicos totais foi efetuada nos ensaios de biorremediação, utilizando amostras retiradas no início e no fim do processo. A extração dos compostos fenólicos foi realizada através de uma extração líquido-líquido, em que inicialmente se fez uma 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 e foi realizada com 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, a 3000 rpm durante 5 minutos e o solvente remanescente foi novamente descartado. Este processo foi repetido duas vezes.

A extração dos compostos fenólicos foi feita com metanol a 99,9% à razão de 1 metanol:1,25 amostra (v/v). Após a adição do metanol as amostras foram homogeneizadas, mantidas 10 minutos e posteriormente centrifugadas durante 5 minutos a 3500 rpm. No final, o sobrenadante foi recolhido para doseamento dos fenóis totais, utilizando o método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) e o ácido gálico como padrão. As quantificações foram feitas em duplicado e os resultados expressos em µg/mL. A eficácia de remoção dos compostos fenólicos foi avaliada pelo Índice de Perda de Fenólicos (PLI) de acordo com a seguinte equação:

$$PLI (\%) = \frac{Phn_i - Phn_f}{Phn_i} \times 100$$

Em que:

Phn_i - Concentração inicial de fenólicos (µg/mL);

Phn_f - Concentração final de fenólicos (µg/mL);

Fenólicos Individuais

Em função dos resultados anteriores, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos individuais foi realizada nos ensaios de biorremediação e em amostras de biomassa final liofilizada. Para os ensaios de biorremediação foram utilizados os extratos anteriores (extratos para fenóis totais). Para a biomassa final liofilizada os compostos foram extraídos com metanol, conforme metodologia descrita no ponto *3.6.1.3 Pigmentos Fotossintéticos*.

Em ambos os tipos de extratos, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes foi feita utilizando um sistema HPLC-MS (LCQ Advantage Max, ThermoFinnigan). Resumidamente procedeu-se primeiro à eliminação dos açúcares das amostras, através de hidrólise ácida com HCl e hidrólise com MeOH, água e TBHQ (tert-butilhidroquinona, antioxidante) Assim, para microtubos com tampa retiraram-se 200 µL de cada extrato e procedeu-se à sua evaporação com azoto gasoso. Após a completa evaporação, adicionou-se 200 µL de HLC a 2M em metanol a 50% (água: metanol, v/v) e 200 µL de uma solução de 50% de metanol (água: metanol, v/v) e TBHQ. Os microtubos foram colocados em bloco de aquecimento a 80°C, durante 2h e de seguida centrifugados (model 2-16 K, Sigma, Osterode), recolhendo-se o sobrenadante para análise.

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de fase reversa com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, do tipo C18, com enchimento Spherisorb ODS2 de 5 µL (Phase Separations WATERS). A fase móvel consistiu em água ultrapura com 1% (v/v) de ácido tricloroacético (TFA) (solvente A) e acetonitrilo com 1% TFA (solvente B). A eluição foi realizada a um fluxo de solvente de 1 mL/minuto, com gradiente a começar com 100 % de A, sendo o volume de injeção de 10 µL.

Os cromatogramas foram registados a 280, 320, 370 e 520 nm. A identificação dos compostos fenólicos individuais foi feita por comparação com padrões comerciais externos (Extrasynthese, França), através dos respetivos tempos de retenção e espectros UV. A quantificação foi feita utilizando parâmetros como o volume de extração, volume de injeção, área do padrão interno, área do composto em questão. O HPLC-MS/MS foi utilizado para confirmar os resultados.

Para efeitos de comparação foi ainda calculada a percentagem de variação de cada composto fenólico identificado, através da seguinte fórmula:

$$\text{Variação Composto Fenólico (\%)} = \frac{\text{CFt}_i - \text{CFt}_f}{\text{CFt}_i} \times 100$$

Em que:

CFt_i = Concentração do composto fenólico ao T0 (µg.g-1 peso seco)

CFt_f = Concentração do composto fenólico após a biorremediação (µg.g-1 peso seco)

3.6.2 Avaliação Toxicológica

A avaliação toxicológica dos produtos finais resultantes do processo de biorremediação compreendeu, para efeitos comparativos, a toxicidade dos efluentes e a toxicidade da biomassa algal.

3.6.2.1 Testes de ecotoxicidade da biomassa com *Daphnia magna*

A avaliação da ecotoxicidade da biomassa algal resultante dos ensaios de biorremediação foi efetuada com *Daphnia magna*, utilizando o kit *Daphtoxkit FTM magna* (Figura 3.8). A biomassa a testar encontrava-se previamente liofilizada. Embora este kit seja comumente utilizado para avaliar a toxicidade de efluentes, foi utilizado no âmbito deste trabalho para avaliar a toxicidade da biomassa, alimentando as dáfnias com a mesma. Assim, toda a metodologia de incubação utilizada foi a recomendada pelo fabricante.



Figura 3.8 – Aspeto dos componentes do kit *Daphtoxkit FTM magna*: a) Exterior do kit utilizado; b) Interior do kit utilizado.

A incubação dos ovos de *Daphnia magna* demorou entre 3 a 5 dias, em condições de 5000 lux, com fotoperíodo de 12h:12h, e à temperatura de 20-21°C. As dáfnias foram

recolhidas para os ensaios até três dias após a eclosão e os ensaios decorreram nas placas de teste fornecidas no *kit* (Figura 3.8b). Para esse efeito, foram colocadas 8 a 11 dáfrias por poço, num total de 3 réplicas por cada teste.

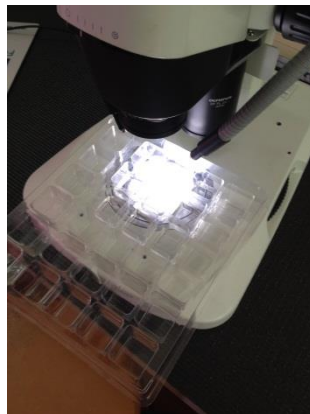


Figura 3.9 – Observação dos testes à lupa.

Num *ependorf* com 1,5 mL de água destilada autoclavada colocou-se uma microespátula da biomassa liofilizada a testar e homogeneizou-se. Este procedimento foi feito para cada série de biomassa algal, resultante de ensaios de biorremediação. A cada poço foi adicionado 4 mL de meio de incubação, de acordo com o *kit*, e 4 gotas (usando pipeta Pasteur) de solução de biomassa a testar. O controlo destes testes foi realizado com dáfrias alimentadas com *C. vulgaris* liofilizada obtida por crescimento rotineiro em meio Bold Basal Modificado, utilizando neste caso 4 réplicas.

Os resultados foram avaliados por observação à lupa (Olympus – SZX2-ILLT) ao tempo 12h (T12), 24h (T24) e 36h (T36) de incubação (Figura 3.9).

3.6.2.2 Teste de ecotoxicidade do efluente com *Artémia salina*

A avaliação da ecotoxicidade do efluente final resultante dos ensaios de biorremediação foi efetuada com náuplios de artémia. Para esse efeito foram adquiridos quistos de *Artémia salina* (Sera, Artemia-mix - Great Salt Lake, EUA) numa casa de aquariofilia. Antes do início do teste de ecotoxicidade procedeu-se à incubação dos quistos de artémia, de acordo com as instruções da embalagem. Assim, num Erlenmayer com água destilada foi adicionado o preparado da embalagem, à razão de 50:1,8 (v/m), homogeneizado e em seguida foi ainda adicionado cloreto de sódio até à salinidade de 35‰ (Figura 3.10). A incubação, a $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ e a 4500 lux com fotoperíodo de 12h:12h,

decorreu aproximadamente durante 48h, sendo que nas primeiras 24h sem aerificação já que os quistos se encontram a hidratar, e as restantes 24 horas com aerificação até a eclosão.



Figura 3.10 – Testes de ecotoxicidade com artémia: a) Aspecto da embalagem comercial utilizada; b) Hidratação dos quistos de artémia.

Os ensaios foram realizados em microplacas, utilizando os náuplios de artémia logo após a eclosão. Para esse efeito foram distribuídos 5 náuplios por poço, num total de 4 réplicas por cada teste. Em todos os poços, teve-se o cuidado de retirar a água de incubação dos quistos de artémia (ficando os náuplios momentaneamente a seco) e de seguida foi adicionado 1 mL do efluente a testar por poço. Os efluentes foram previamente centrifugados durante 7 min a 7600 rpm (Eppendorf centrifuge 5415R) e o sobrenadante usado nos ensaios.

O controlo positivo foi realizado com água destilada e o controlo negativo com AR à mesma diluição, mas sem ter sofrido o processo de biotratamento. Os ensaios foram realizados sob as mesmas condições de temperatura e luz da incubação.

Os resultados foram avaliados por observação à lupa (Olympus – SZX2-ILLT) ao tempo zero (T0), após 6h (T6) e 12h (T12) de incubação. Conforme referido, para cada concentração e controlos foram testadas 4 réplicas.

3.7 Tratamento Estatístico de Dados

O tratamento de dados foi efetuado utilizando o *software* de folha de cálculo *Microsoft Excel*. Nesta folha foram aplicadas as fórmulas descritas anteriormente e os resultados foram expressos como valores médios \pm DP (Desvio Padrão da média).

A análise estatística foi efetuada usando o *software* estatístico SPSS 19.0 (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA) com um nível de significância de 5%. Os resultados da variação de volume das esferas, teores em pigmentos, proteína e compostos fenólicos foram analisados recorrendo ao teste de Mann-Whitney. Os resultados dos testes de ecotoxicidade foram comparados também através do teste Mann-Whitney.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* do crescimento da *Chlorella vulgaris*

O presente estudo foi iniciado com a avaliação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, em meio sólido de agar, na presença de diferentes diluições de águas ruças. O resultado deste *screening* encontra-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Crescimento da *C. vulgaris* na presença das águas ruças em meio sólido após 14 dias de incubação.

| Diluição de AR | AR-2 | AR-3 |
|-----------------|--------|------|
| 10% | ++/- | - |
| 20% | +++/- | - |
| 30% | +++/- | - |
| 40% | ++ | - |
| 50% | + | - |
| 60% | +/- | - |
| 70% | - -/+ | - |
| Controlo | ++++++ | |

(-) Ausência de crescimento; (+++) crescimento notório; (++++++) Crescimento abundante.

Para ambos os tipos de águas ruças, AR-2 e AR-3, foram usados como inóculo 80 μL de uma cultura na fase exponencial, com densidade de $15-18 \times 10^6$ células. mL^{-1} . Apesar disso, os resultados mostram que em geral a *C. vulgaris* tem capacidade de crescer nas diferentes diluições das águas ruças de duas fases (AR-2), no entanto o seu crescimento é inibido na presença de águas ruças de 3 fases (AR-3), qualquer que seja a diluição testada. A maior densidade de células, bem como maior velocidade de crescimento, foi observada entre os 20-40% de AR-2. Com o decorrer do tempo de incubação, estas placas apresentaram um especto bastante idêntico ao do controlo positivo.

Dos resultados apresentados pode-se concluir que a concentração ótima de AR-2 para o crescimento da *C. vulgaris* se encontra entre os 30% e os 40%. Porém, a concentração de 50% não foi excluída, uma vez que existe algum crescimento, ainda que inferior comparativamente às concentrações de 30 e 40%. Estes resultados sugerem que a diluição excessiva de AR-2 em água destilada (10%) impede o crescimento por falta de

nutrientes e uma concentração superior, acima de 50% de diluição, terá efeitos inibitórios no crescimento, eventualmente devido à maior concentração de substâncias tóxicas. De facto as águas ruças são caracterizadas pela presença de grandes quantidades de compostos fitotóxicos e de compostos com efeito anti-algal, como os compostos fenólicos (Niaounakis e Halvadakis, 2006; Stom e Roth, 1981; Wang et al., 2008; Aruoja et al., 2011; Shao et al., 2013). No entanto, algumas espécies de algas podem degradar ou absorver os compostos fenólicos quando a sua concentração é baixa (Al-Khalid e El-Naas, 2012; EI-Sheekh et al., 2012) conforme foi observado neste trabalho a 20-40% AR-2.

A ausência de crescimento da *C. vulgaris* nas AR-3 poderá ser devida à alta concentração de compostos fenólicos neste tipo de efluentes, comparativamente às AR-2. Embora o *screening* com AR-3 tenha sido repetido duas vezes, praticamente não se observou crescimento das microalgas nas diluições testadas.

Assim, baseado nestes resultados, os ensaios de biorremediação em *batch* foram realizados com águas ruças de duas fases à diluição de 35, 50 e 60%. No que respeita as águas ruças de três fases os ensaios foram realizados com 20% de diluição em meio de cultura, numa tentativa de suportar o crescimento das microalgas.

4.2 Ensaio de biorremediação

A biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou microrganismos, são utilizados tecnologicamente num tratamento para reduzir ou eliminar poluentes ambientais (Gaylarde et al., 2005). Este trabalho foca-se essencialmente nos efeitos da biorremediação na biomassa utilizada no processo. A biorremediação no contexto deste trabalho, como referido anteriormente, utilizou as microalgas imobilizadas como inóculo e as águas ruças diluídas, de 2 e 3 fases, como meio. Assim, a caracterização físico-química da biomassa final, após o processo de tratamento, é um dos objetivos primordiais. Estas avaliações tiveram como base os resultados da recolha ao tempo zero (T0), comparativamente com a biomassa recolhida no final do processo de biorremediação, bem como com os resultados do controlo negativo.

4.2.1 Crescimento das microalgas em AR-2

4.2.1.1 Variação do volume de esferas

À variação do volume total de esferas inoculadas está inerente o crescimento ou definhamento da cultura no meio em que se encontra. O crescimento da *C. vulgaris* é condicionado, nas condições destes ensaios, principalmente pela natureza e concentração inicial dos compostos presentes no meio de cultura. Por outro lado existem fatores externos ao processo de biorremediação como a temperatura e o pH. Estes fatores não foram controlados ao longo da fermentação, podendo desta forma condicionar o crescimento da cultura.

Na Figura 4.1 são apresentados os resultados da série de 35% AR-2. Estes ensaios tiveram a duração de 18 dias e verificou-se que após esse período o volume médio de *C. vulgaris* imobilizada aumentou 27%, no entanto tendo em conta a variação do volume do controlo, pode dizer-se que o seu incremento efetivo foi de 12%. Tendo em conta o elevado desvio padrão observado considera-se que praticamente não houve incremento do volume efetivo das microalgas inoculadas.

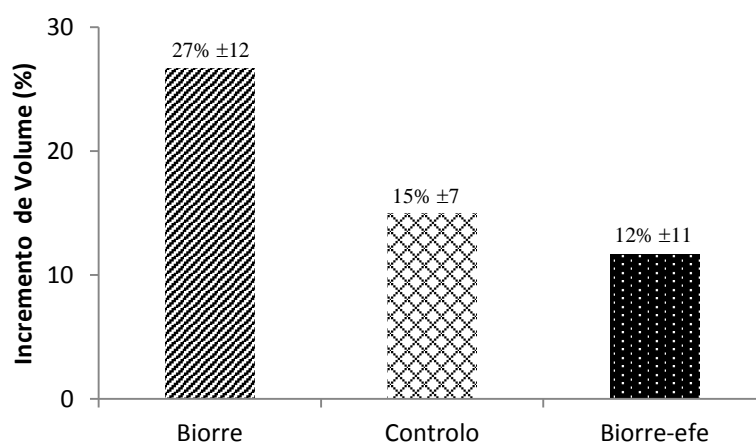


Figura 4.1 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de *C. vulgaris* após a fermentação em batch em 35% AR-2. (Biorre – Incremento do volume após biorremediação; Controlo – Incremento do volume do controlo; Biorre-efe – Incremento do volume após biorremediação tendo em conta o volume do controlo). n=3.

No segundo ciclo 35% de efluente não foi avaliado o volume porque para este não foi feito o controlo negativo. As séries de biotratamentos de 50 e 60% AR-2 tiveram a duração de 16 dias e nestas verificou-se que não houve variação do volume efetivo das microalgas inoculadas. Ou seja, o pequeno incremento de volume observado no final da fermentação foi praticamente idêntico ao observado no controlo. No entanto quando a

fermentação a 50% AR-2 foi efetuada com efluente não preservado e menor tempo de fermentação, 8 dias, observou-se um incremento efetivo das células inoculadas de 23%, (Figura 4.2).

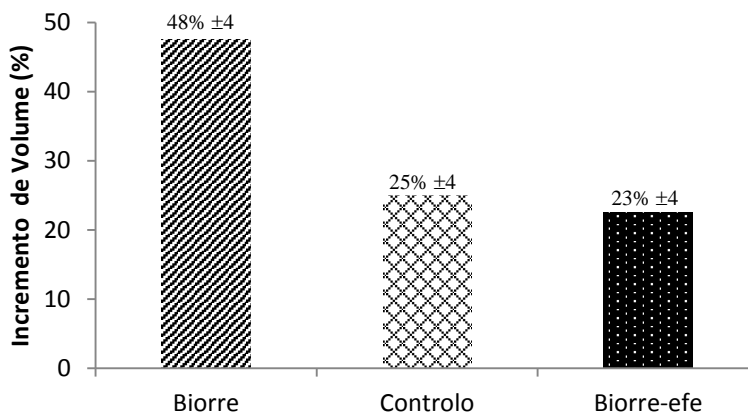


Figura 4.2 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de *C. vulgaris* após a fermentação em batch em 50% AR-2 com efluente não preservado. (Biorre – Incremento do volume após biorremediação; Controlo – Incremento do volume do controlo; Biorre-efe – Incremento do volume após biorremediação tendo em conta o volume do controlo; n=2.)

Quando o processo de biorremediação foi feito tendo em conta a otimização do fermentador, ou seja, utilização da coluna de bolhas para AR-2 a 50%, verifica-se que o incremento efetivo da biomassa inoculada, após os 8 dias de ensaio, foi de 37% (Figura 4.3). De facto, foi nestas condições que se obteve o maior incremento do volume inoculado inicialmente, o que sugere que foi nestas condições que ocorreu o maior o crescimento celular.

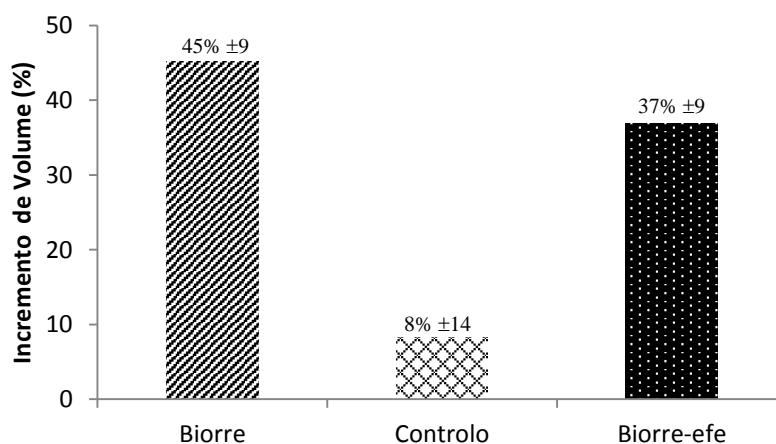


Figura 4.3 – Incremento do volume médio de células imobilizadas de *C. vulgaris* após a fermentação em batch em 50% AR-2 com otimização do reator. (Biorre – Incremento do volume após biorremediação; Controlo – Incremento do volume do controlo; Biorre-efe – Incremento do volume após biorremediação tendo em conta o volume do controlo; n=3.)

4.2.1.2 Pigmentos

A *C. vulgaris* é uma espécie de alga verde e esta característica deve-se à acumulação de pigmentos como a clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides e principalmente clorofila *a* (Chl *a*) através de processos fotossintéticos (Guiry e Guiry, 2014; Queiroz et al., 2008). A produção destes pigmentos geralmente traduz um crescimento da cultura, quando expresso em peso por volume de cultura. Neste trabalho, para além da análise à densificação celular através da quantificação de clorofila total (extração com acetona a 90%), foi também avaliada a composição em clorofila *a*, *b* e carotenoides na biomassa final. Para este efeito foram utilizados os resultados da extração dos pigmentos da biomassa seca final com metanol.

Avaliação macroscópica

A análise aos pigmentos da biomassa inicia-se com uma avaliação macroscópica (a olho nu) da variação da cor após o processo de biorremediação. Para isso foi escolhido aleatoriamente um dos triplicados, previamente liofilizado.

Na Figura 4.4 encontram-se exemplos da coloração da biomassa, obtidos nas culturas de biorremediação com AR-2 a 35%, para o 1º e 2º ciclo. A análise desta figura permite-nos verificar que comparativamente com o inóculo inicial existe um degradé da cor verde da biomassa após a fermentação, quer para o 1º ciclo, quer para o 2º ciclo de tratamento, sugerindo perda da clorofila. Por outro lado, a comparação da cor da biomassa entre 1º e 2º ciclo de tratamento, sugere uma ligeira recuperação da cor verde durante o 2º ciclo. Este aspeto poderá estar relacionado com a pré-adaptação ocorrida durante o 1º ciclo de tratamento.

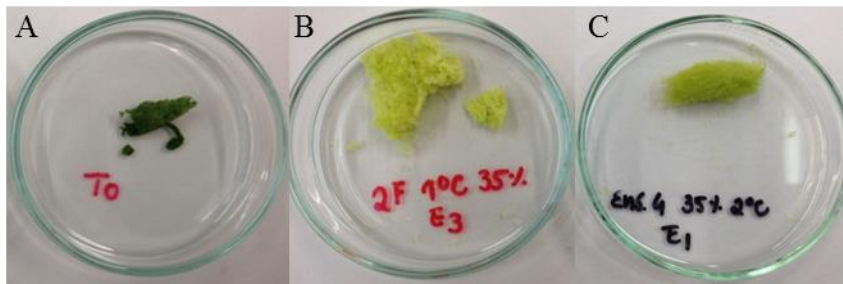


Figura 4.4 – Variação de cor da biomassa de *C. vulgaris* na fermentação com AR-2 a 35%: inóculo inicial, T0 (A); 1º ciclo (B); 2º ciclo (C).

Quando são utilizadas AR-2 a 50% e a 60% de diluição (Figura 4.5), não se verificam diferenças significativas da cor da biomassa entre concentrações de AR-2, porém, comparativamente com a inoculada (T0) verifica-se um aclaramento de tom. Apesar destas fermentações se realizarem com uma maior concentração do efluente, a biomassa resultante da fermentação a 50% e 60% diluição apresenta um verde ligeiramente mais expressivo que a dos ensaios a 35% (1º ciclo). Este facto poderá ser devido mais uma vez à prévia adaptação do inóculo. De facto, nos dias antecedentes à imobilização, as microalgas utilizadas nos ensaios AR-2 a 50% e 60% foram pré-adaptadas em meio de cultura (Bold Basal Modificado) suplementado com AR-2 a 10%.

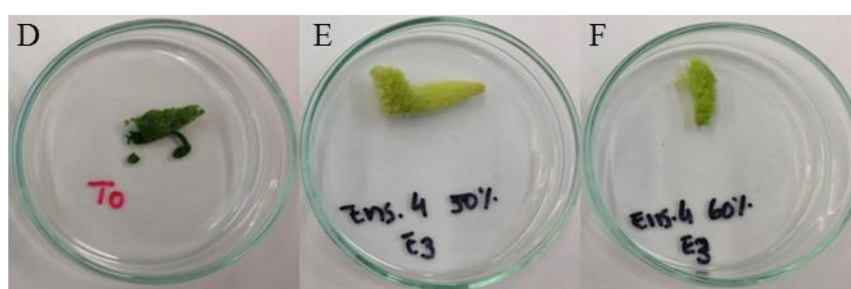


Figura 4.5 – Variação da cor da biomassa de *C. vulgaris* na fermentação com AR-2 a 50% e 60%: inóculo inicial, T0 (D); 50% diluição (E); 60% diluição (F).

A Figura 4.6 apresenta a variação da cor da biomassa obtida nas fermentações AR-2 50% com utilização de efluente não preservado e com otimização usando coluna de bolhas. É possível observar que comparativamente com o T0 (inóculo), a cor das microalgas imobilizadas após a fermentação diminui ligeiramente nos ensaios com efluente não preservado. Por outro lado, quando é usada a coluna de bolhas, no final da fermentação as microalgas apresentam uma cor aproximadamente igual à do inóculo.

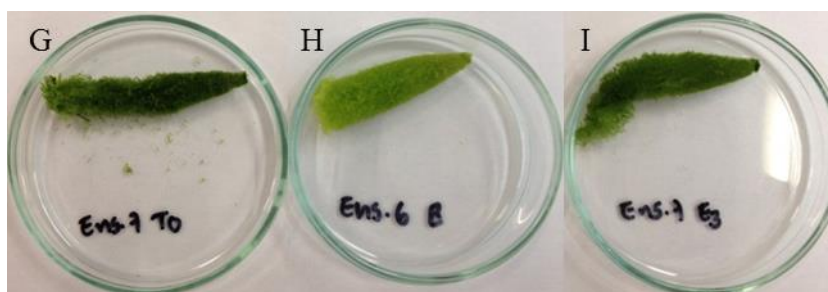


Figura 4.6 – Variação de cor da biomassa de *C. vulgaris* na fermentação com AR-2 a 50%: inóculo inicial, T0 (G); utilização de efluente não preservado (H); otimização do biorreator (I).

Comparativamente com os ensaios AR-2 50% (Figura 4.5) estes ensaios AR-2 a 50%, quer com efluente não preservado, quer com coluna de bolhas, apresentam uma tonalidade muito semelhante à do inóculo inicial (Figura 4.6). Apesar de serem utilizadas as mesmas diluições de AR-2 e de os inóculos terem sido submetidos a pré-adaptação, as diferenças observadas poderão ser devidas ao tempo de fermentação e qualidade das AR. De facto, os primeiros ensaios AR-2 50% foram realizados durante 16 dias e os ensaios com o efluente não preservado e a coluna de bolhas decorreram apenas durante 8 dias. Provavelmente o aumento no tempo de fermentação traduziu-se em maior efeito negativo das AR na maquinaria fotossintética, uma vez que vários compostos fenólicos mostraram atividades anti-algal, incluindo diminuição no teor de clorofila (Stom e Roth, 1981; Megharaj et al.,1992). Por outro lado o facto de as AR não terem sido preservadas por acidificação e posterior congelação, mas sim terem permanecido no frigorífico por cerca de 5 meses, poderá ter contribuído para a decomposição de certos compostos tóxicos potenciais, tais como os polifenóis.

Avaliação da Clorofila Total

Para os ensaios a 35% de efluente não foi feita a determinação da clorofila total. Na Tabela 4.2 estão apresentados os resultados da variação da clorofila total em AR-2 diluídas a 50% e 60%. Verificou-se que após 16 dias de fermentação houve um decréscimo da clorofila total acima dos 51%. Por outro lado, não se verificaram diferenças em termos da variação do teor de clorofila total entre biotratamentos a 50% e 60%.

Tabela 4.2 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* em fermentação a 50% e 60% AR-2.

| | E1 | E2 | % Variação (M\pmDP) |
|-------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------------|
| Inicial | 20,44 | 25,83 | |
| <u>Final 50%</u> | 10,53 | 9,42 | -56 \pm10,63 |
| <u>Final 60%</u> | 10,68 | 11,69 | -51 \pm4,94 |

Estes resultados confirmam os observados macroscopicamente, quanto ao aclaramento da cor verde. O decréscimo da clorofila total sugere uma diminuição dos

pigmentos da cultura, eventualmente por exposição a compostos fenólicos e/ou pouco crescimento, concordante com a variação de volume.

Tabela 4.3 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado e coluna de bolhas.

| | Efluente não preservado | | Coluna de bolhas | |
|---------------------------------------------|---------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| | E1 | E2 | E1 | E2 |
| Inicial | 19,21 | 20,17 | 4,54 | 4,52 |
| Final | 1,03 | 0,86 | 34,83 | 30,31 |
| % Variação (M\pmDP) | -95 \pm0,81 | | +619 \pm67,32 | |

Os resultados das séries 50% AR-2 com utilização de efluente não preservado registaram um decréscimo de cerca de 95% de clorofila total (Tabela 4.3), concordante com a variação de cor previamente observada.

Por outro lado, na otimização do biorreator (coluna de bolhas) em 50% AR-2, ao fim de 8 dias de fermentação verificou-se um acréscimo de cerca de 619% das clorofilas totais (Tabela 4.3). Este acréscimo é concordante com o observado macroscopicamente e com o aumento do volume das esferas. O valor inicial de clorofila total baixo comparativamente aos outros ensaios realizados com a mesma diluição (50 e 50% efluente não preservado), devem-se ao facto de neste ensaio a inoculação ter sido feita com uma concentração celular mais baixa.

Avaliação de Pigmentos

Na Figura 4.7 apresentam-se as variações de pigmentos do ensaio 35% AR-2 para o 1º ciclo da biomassa. Nesta série de ensaios a biorremediação causou uma perda de 92% de carotenoides (carot). Porém o maior decréscimo foi observado na clorofila *a* (Chl *a*) e clorofila *b* (Chl *b*) que apresentaram uma redução de 97%.

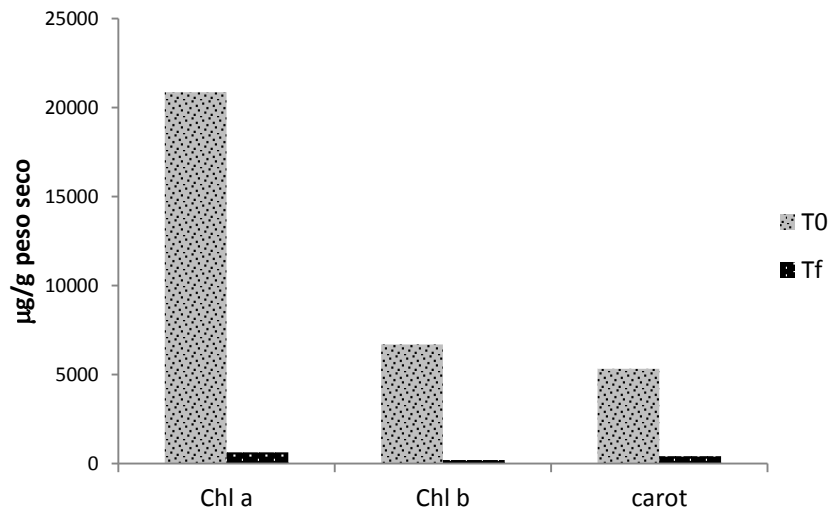


Figura 4.7 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 35% AR-2, 1º ciclo da biomassa.

Contrariamente ao 1º ciclo da biomassa 35% AR-2, no 2º ciclo 35% AR-2 foram registados incrementos de pigmentos no final do processo de biorremediação (Figura 4.8).

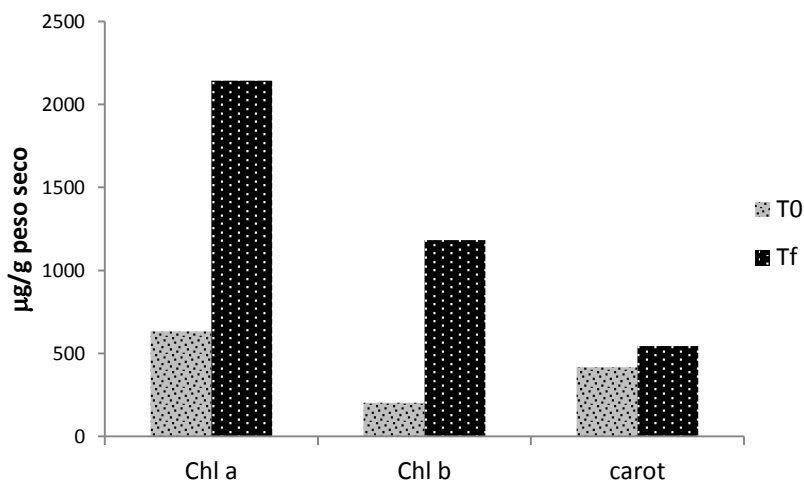


Figura 4.8 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 35% AR-2, 2º ciclo da biomassa.

Foi utilizada a mesma biomassa nas duas séries de ensaios, porém entre séries as células imobilizadas foram preservadas em meio de cultura. Para além da preservação, a explicação para este enriquecimento poderá residir no facto da primeira fermentação ter funcionado como uma pré-adaptação. No total verificou-se um acréscimo de pigmentos entre os 30% e os 484%. Destaque para os carotenoides, com incrementos de 30%, dado o seu potencial biológico. Este incremento poderá ser uma mais-valia, na valorização da biomassa, com vista à sua utilização futura. De facto já foi verificado o papel antioxidante

dos carotenoides na proteção cutânea contra a radiação UV (Chong et al., 2007). Estudos demonstram a capacidade dos carotenoides na proteção das membranas lipídicas contra a peroxidação lipídica dos ROS (*Reactive Oxygen Species*) diminuindo assim as lesões oxidativas nos tecidos. Para além disso destaca-se também a sua importância na indústria alimentar como um antioxidante (Dixon et al, 1998; Perera e Yen, 2007; Rodriguez-Amaya, 2001), podendo também desempenhar papel de pró-vitamina A (Rodriguez-Amaya, 2001). Verificaram-se ainda efeitos hepato-protetores e desempenho positivo no sistema imunitário, observando-se a sua ação contra agentes patogénicos (Murthy et al., 2007; Perera e Yen, 2007). O estudo do metabolismo dos carotenoides em Humanos revelou também a sua associação à diminuição no risco de determinados tipos de cancro, na prevenção de úlceras gástricas e ainda na proteção da degeneração da mácula (Paiva e Russell, 1999). Alguns carotenoides podem funcionar ainda como substitutos de corantes alimentares sintéticos (Olson, 1999).

Nas Figuras 4.9 e 4.10 estão representadas as variações de pigmentos na *C. vulgaris* após a fermentação 50% e 60% AR-2, respetivamente. Os resultados obtidos com a extração a metanol confirmam o que já se tinha constatado na análise macroscópica e na análise da clorofila total. Nestas séries (50% e 60% AR-2) registaram-se perdas de pigmentos entre os 61% e os 89%, não se verificando diferenças significativas entre séries.

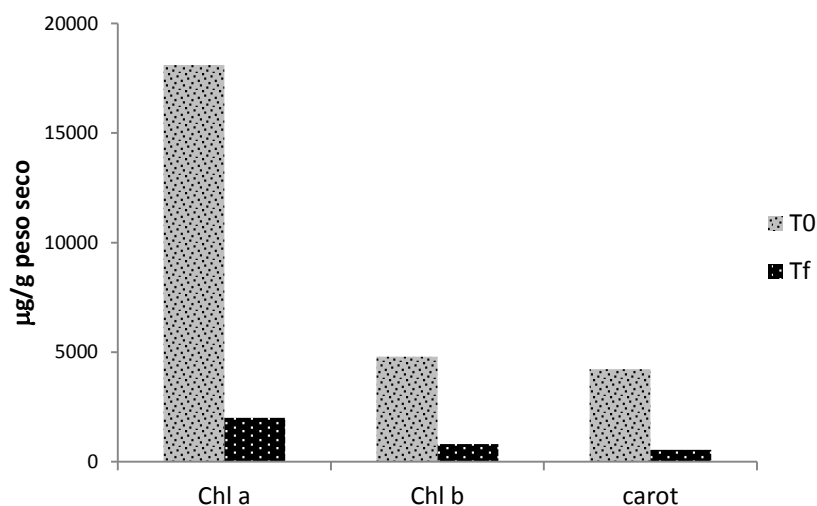


Figura 4.9 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2.

A comparação dos resultados obtidos entre as séries 35% (1º ciclo) e 50%-60% AR-2 permite-nos concluir que nem sempre o aumento da concentração do efluente se

refletiu numa maior perda de pigmentos, desde que exista uma pré-adaptação da biomassa. Ou seja o efeito potencialmente tóxico dos efluentes em menores diluições (50-60%) poderá ser atenuado com a pré-adaptação das células de *C. vulgaris*. Também pelos resultados observados na série 35% AR-2, 1º e 2º ciclo da biomassa, uma pré-adaptação com a *C. vulgaris* imobilizada, em detrimento das células planctónicas, poderá ser mais vantajoso.

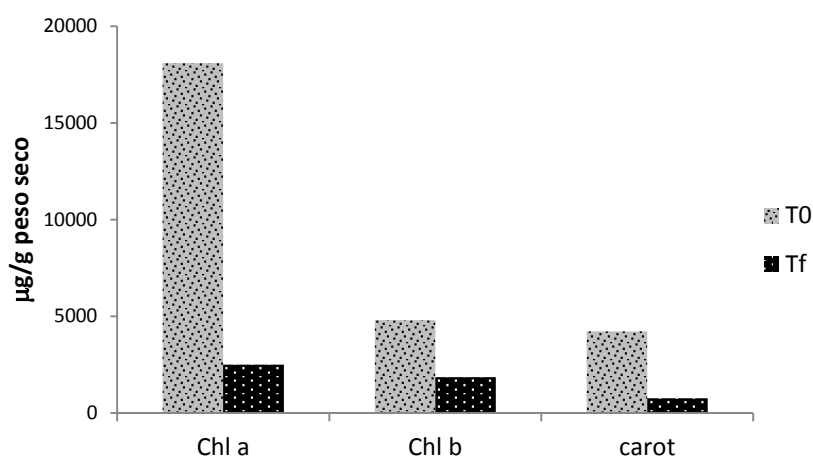


Figura 4.10 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 60% AR-2.

Na cultura de 50% AR-2 com efluente não preservado houve uma diminuição dos pigmentos entre 80 e 86% (Figura 4.11), reforçando os resultados anteriores para esta série.

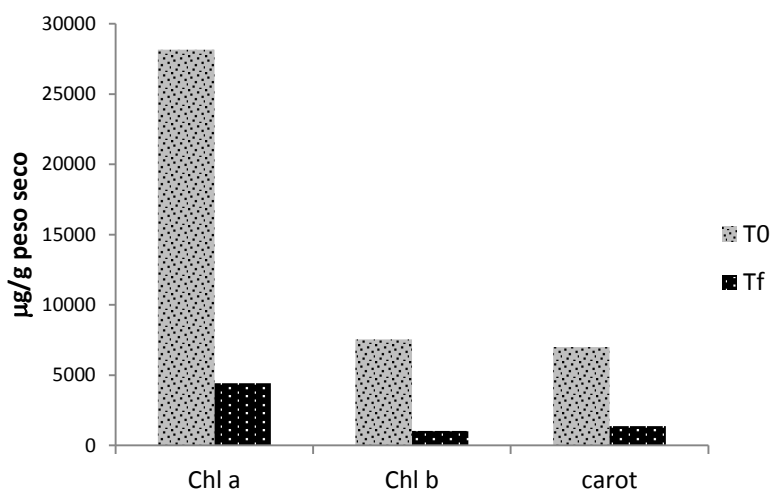


Figura 4.11 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado.

Por outro lado quando utilizamos a coluna de bolhas verificamos que houve um incremento dos pigmentos superior a 15% no final do processo de biorremediação (Figura

4.12), merecendo especial destaque mais uma vez o enriquecimento em carotenoides, pelas suas potenciais aplicações.

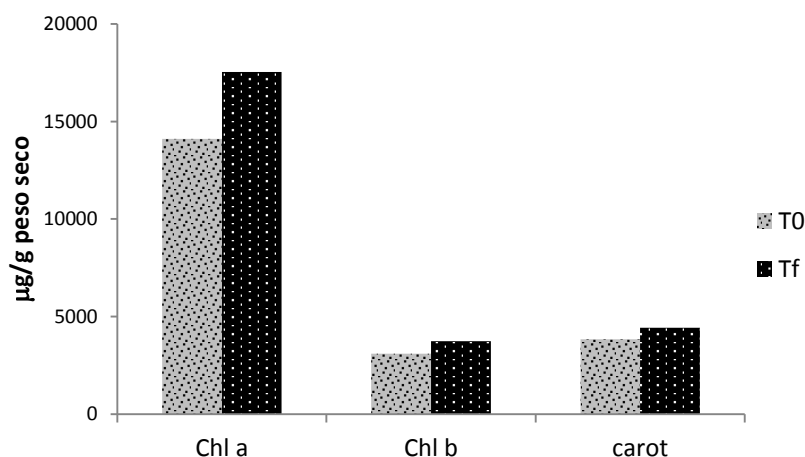


Figura 4.12 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2, utilização da coluna de bolhas.

Dos resultados obtidos nesta avaliação conclui-se que a utilização da biomassa em segundo ciclo (35%) e a utilização da coluna de bolhas (50%) levou ao aumento dos pigmentos, podendo assim resultar na valorização desta biomassa.

4.2.1.3 Proteínas

A percentagem de proteína por peso de cultura na *C. vulgaris* é fortemente condicionado pelo meio nutritivo, podendo variar entre os 9% e os 59% (Ciferri e Tiboni, 1973). Também aqui, o teor de proteínas totais reflete crescimento da cultura já que expresso em peso por volume.

Tabela 4.4 – Variação do teor de proteínas (µg/mL) na *C. vulgaris* após fermentação em 35% AR-2, 1º e 2º ciclos da biomassa.

| | 1ºCiclo | | 2ºCiclo | |
|------------------------------|------------------|--------|------------------|--------|
| | E1 | E2 | E1 | E2 |
| Inicial | 423,13 | 415,31 | 587,02 | 602,05 |
| Final | 587,02 | 602,05 | 702,53 | 670,44 |
| % Variação (M±DP) | +42 ±4,40 | | +16 ±5,88 | |

Na Tabela 4.4 encontra-se a variação do teor de proteínas na *C. vulgaris* após fermentação em 35% AR-2, 1º e 2º ciclo da biomassa. No 1º ciclo da biomassa (35% AR-

2) verificou-se um acréscimo médio de 42% do teor de proteínas, enquanto o acréscimo no 2º ciclo (35% AR-2) foi apenas de 16%. Estes resultados reforçam a ideia de aumento da biomassa. Por outro lado e comparativamente, a maior integridade do sistema fotossintético, traduzida pelo aumento dos pigmentos (observada no segundo ciclo) não se traduziu numa maior síntese de proteínas.

Nas séries de ensaios 50% e 60% AR-2 verificam-se incrementos de 226% e 227%, respetivamente (Tabela 4.5). À semelhança dos resultados obtidos anteriormente para estas séries, não se verificam diferenças significativas entre elas. Porém estes resultados sugerem aumento da biomassa, contrariando os obtidos na variação do volume e dos pigmentos. Por outro lado o aumento da síntese proteica pode ter ocorrido para fazer face a toxicidade do meio.

Tabela 4.5 – Variação do teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2 e 60% AR-2.

| | E1 | E2 | % Variação (M\pmDP) |
|-------------------------|-----------|-----------|---------------------------------------------|
| Inicial | 286,23 | 238,94 | |
| <u>Final 50%</u> | 851,08 | 845,68 | +226 \pm40,02 |
| <u>Final 60%</u> | 854,79 | 851,10 | +227 \pm 40,70 |

Para este aumento do teor de proteínas poderá também ter contribuído, até certo ponto, a adesão de microrganismos presentes no efluente. De facto, embora o efluente após a diluição tenha sido autoclavado, o desenvolvimento das culturas deu-se em condições não axénicas. O aumento da concentração do efluente (50-60%) pode ter facilitado este fenómeno pelo aporte de substratos, comparativamente com a diluição de 35% de AR.

Tabela 4.6 – Variação do teor de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* após fermentação em 50% AR-2, com efluente não preservado e coluna de bolhas.

| | Efluente não preservado | | Coluna de bolhas | |
|-----------------------------------------|---------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | E1 | E2 | E1 | E2 |
| Inicial | 285,33 | 305,33 | 110,13 | 128,88 |
| Final | 61,86 | 90,80 | 727,14 | 684,29 |
| % Variação (M\pmDP) | -74\pm 5,70 | | +496 \pm91,44 | |

Os resultados obtidos com a utilização de efluente não preservado a 50% AR-2 sugerem que a ausência de conservação por congelamento limitou não só o sistema fotossintético, mas também a produção proteica nas microalgas. Esta foi a única série em foi utilizado o efluente não preservado e foi também a única que apresentou um decréscimo do valor inicial proteico (Tabela 4.6). Desta forma os resultados sugerem que não houve crescimento da cultura, dado que quer os pigmentos, quer as proteínas apresentaram, após a fermentação, decréscimos significativos. Por outro lado, estes resultados contrariam o aumento de volume de 23% verificado. Assim, conclui-se que neste caso, o aumento do volume das esferas não resultou do aumento da concentração da biomassa, nem da eventual adsorção de microrganismos, mas sim por outros fatores.

Contudo a otimização do biorreator realizada com 50% AR-2 resultou num aumento de cerca de 496% das proteínas (Tabela 4.6). Este aumento do teor de proteína vem de encontro aos resultados obtidos anteriormente, a nível de pigmentos e variação de volume. O aumento de todos estes parâmetros permite-nos afirmar que efetivamente houve um aumento da densidade celular da cultura. Processos de biotratamento com a *C. vulgaris* planctónica, realizados pela equipa, com diferentes diluições de AR, mostraram também um incremento de proteínas que poderá resultar de um incremento da síntese enzimática para degradar os compostos fenólicos.

Tabela 4.7 – Parâmetros físico-químicos resultantes dos ensaios realizados em AR-2.

| Diluição AR | Duração (dias) | Vol. (%) | Chl Total (%) | Chl a (%) | Chl b (%) | Carot (%) | Proteína (%) |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|
| 35% | 18 | = | NA | -97 | -97 | -92 | +42 |
| 35% 2º Ciclo | 14 | NA | NA | +239 | +484 | +30 | +16 |
| 50% | 16 | = | -56 | -89 | -83 | -87 | +226 |
| 60% | 16 | = | -51 | -86 | -61 | -82 | +227 |
| 50% Sem preservação | 8 | +23 | -95 | -84 | -86 | -80 | -74 |
| 50% Coluna de bolhas | 8 | +37 | +619 | +24 | +21 | +15 | +496 |

(NA-Não avaliado)

A análise da Tabela 4.7 demonstra mais uma vez que para o aproveitamento da biomassa os melhores resultados, tendo em conta o perfil de pigmentos, foram os obtidos com segundo ciclo da biomassa (35%) e com a utilização do fotobiorreator coluna de bolhas. Porém, considerando o teor em proteína, os processos de biorremediação a 50% e 60% de diluição AR não devem ser desprezados já que levaram a um incremento muito substancial do teor deste parâmetro.

4.2.2 Crescimento das microalgas em AR-3

4.2.2.1 Variação do volume

Os resultados do *screening* inicial apontaram para uma ausência do crescimento na presença de AR-3 diluída em água destilada. Desta forma os ensaios de fermentação avançaram com uma diluição em meio de cultura. Nestas séries de fermentação apenas foi testada uma concentração de efluente, 20%. Porém, para esta concentração de efluente foram realizados três tipos de ensaios: utilizando biomassa sem pré-adaptação; biomassa com pré-adaptação; e um segundo tratamento do efluente. Os ensaios com e sem pré-adaptação tiveram uma duração de 14 dias, o segundo tratamento 18 dias.

No que respeita a variações de volumes das células imobilizadas, os resultados observados nas séries de ensaio utilizando AR-3 foram semelhantes entre eles. Apesar de existir um aumento de volume resultante da biorremediação, quando comparado com o controlo, a variação foi muito pequena. Assim, estes resultados sugerem que nestas séries não houve crescimento da biomassa ou que este parâmetro não é um bom indicador do crescimento algal.

4.2.2.2 Pigmentos

À semelhança dos ensaios com AR-2, realizou-se uma avaliação macroscópica da variação da cor da biomassa após o processo de biorremediação, escolhendo-se aleatoriamente um dos triplicados das séries, previamente liofilizado.

A Figura 4.13 apresenta a variação da cor obtida nas fermentações 20% AR-3, para biomassa com e sem pré-adaptação. É possível observar que comparativamente com o T0 (I e L), a cor das microalgas imobilizadas após a fermentação (J e M) apresenta uma elevada degradação da cor, passando de verde-escuro para verde amarelado.

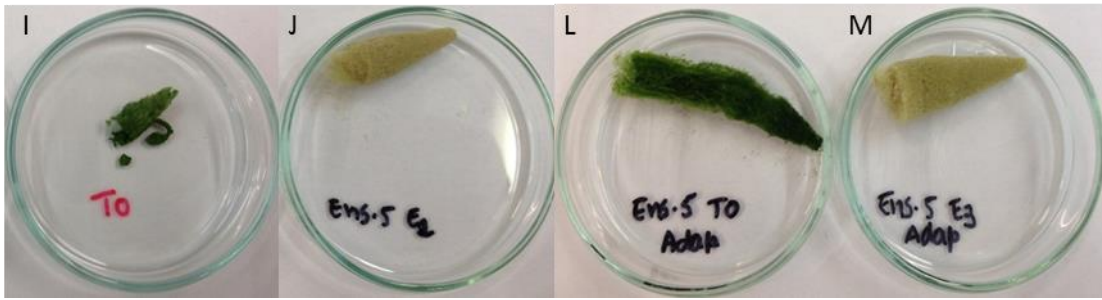


Figura 4.13 – Variação de cor da biomassa de *C. vulgaris* após fermentação 20% AR-3, com e sem pré-adaptação: inóculo inicial sem pré-adaptação, T0 (I); 20% diluição, sem pré-adaptação (J); inóculo inicial com pré-adaptação, T0 (L); 20% diluição, com pré-adaptação (M).

No que respeita à variação da cor após o segundo tratamento do efluente 20% AR-3 (Figura 4.14) verificou-se também uma degradação da cor, ainda que não tão expressiva como a verificada nas séries 20% AR-3 anteriores.

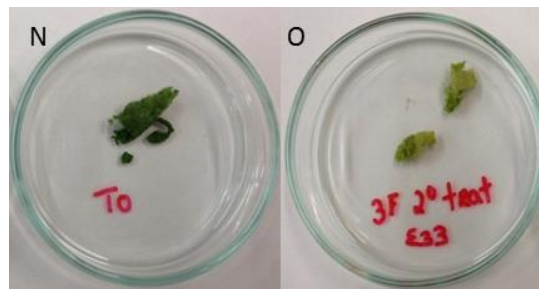


Figura 4.14 – Variação de cor da *C. vulgaris* após fermentação 20% AR-3 2º tratamento do efluente: inóculo inicial sem pré-adaptação, T0 (N); segundo tratamento do efluente (O).

A utilização de AR-3 a 20%, para todas as séries, apresentou diminuições da clorofila total acima de 80% (Tabela 4.8). De facto as AR-3, comparativamente com as AR-2 para a mesma diluição, apresenta um maior teor de compostos fenólicos (Tsagaraki et al., 2007) e estes têm capacidade de exercer os seus efeitos tóxicos nas microalgas diminuindo o seu teor em pigmentos (Stom e Roth, 1981).

Tabela 4.8 – Variação do teor de clorofila total ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* após fermentação em 20% AR-3, com e sem pré-adaptação e 2º tratamento do efluente.

| | Com pré-adaptação | | Sem pré-adaptação | | 2º Tratamento do efluente | |
|----------------------------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|---------------------------------|------|
| | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 |
| Inicial | 7,74 | 8,06 | 7,17 | 5,95 | 4,85 | 5,68 |
| Final | 1,46 | 1,41 | 0,86 | 0,76 | 1,05 | 1,04 |
| % Variação (M \pm DP) | -82 \pm0,99 | | -88 \pm0,46 | | -80 \pm2,33 | |

Também a avaliação da incorporação de clorofila a, b e carotenoides na biomassa vem de encontro ao observado até agora nestas séries de ensaios (Figura 4.15).

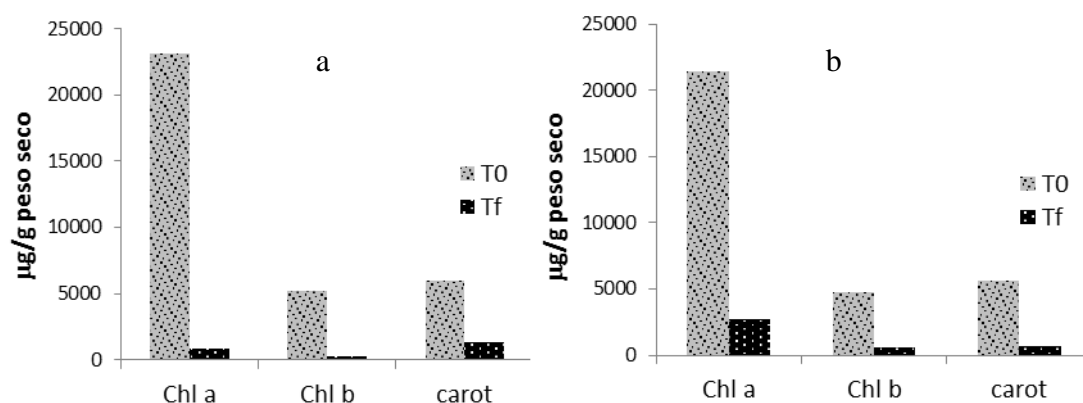


Figura 4.15 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 20% AR-3: sem pré-adaptação(a); com pré-adaptação (b).

Registaram-se perdas acima dos 88% para a Chl a e Chl b e 78% nos carotenoides. Com análise dos resultados verificou-se que não existem variações significativas na utilização do inóculo com pré-adaptação. Assim, pode-se concluir que a nível de incorporação de pigmentos, a utilização de 20% AR-3 suplementada com meio de cultura não apresenta quaisquer mais-valias.

No que respeita ao segundo tratamento da série 20% AR-3 verificaram-se perdas de pigmentos entre os 77% e os 88% (Figura 4.16).

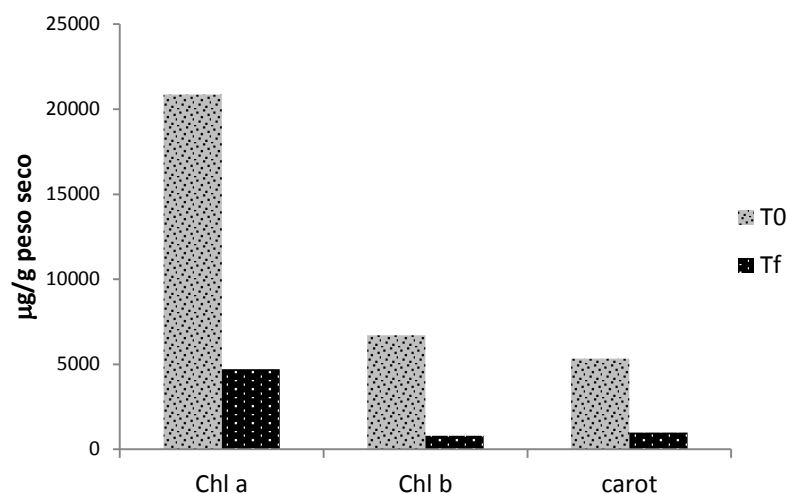


Figura 4.16 – Variação dos pigmentos na *C. vulgaris* após fermentação em 20% AR-3, 2º tratamento do efluente.

A utilização de *C. vulgaris* imobilizada para efeitos de biorremediação de AR-3 traduz-se aparentemente num efeito inibitório no crescimento da cultura. Esse efeito inibitório verifica-se de imediato no sistema fotossintético da *C. vulgaris*, confirmando-se a degradação da cor da biomassa. Este efeito poderá ser devido à grande quantidade de compostos fitotóxicos e de compostos com efeito anti-algal, como os compostos fenólicos característicos destas águas (Niaounakis e Halvadakis, 2006; Stom e Roth, 1981; Wang et al., 2008; Aruoja et al., 2011; Shao et al., 2013). Por outro lado, existem ainda fatores externos ao processo de biorremediação, como a temperatura e o pH. Estes fatores não foram controlados ao longo das fermentações, podendo também condicionar o crescimento da cultura.

4.2.2.3 Proteínas

Contrariamente aos resultados registados anteriormente, nesta série de ensaios (AR-3 20%), no que respeita à variação do teor de proteínas foram observados aumentos entre o inóculo inicial e a biomassa resultante da fermentação, para os ensaios com e sem pré-adaptação (Tabela 4.9). Mais uma vez para este aumento da proteína, e à semelhança do observado para AR-2, poderá ter ocorrido o aumento da síntese enzimática bem como o contributo da adsorção de microrganismos.

Tabela 4.9 – Variação do teor de proteínas na ($\mu\text{g/mL}$) na *C. vulgaris* após fermentação em 20% AR-3, com e sem pré-adaptação e 2º tratamento do efluente.

| | Com pré-adaptação | | Sem pré-adaptação | | 2º Tratamento do efluente | |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
| | E1 | E2 | E1 | E2 | E1 | E2 |
| Inicial | 117,62 | 96,19 | 88,50 | 78,50 | 423,13 | 415,31 |
| Final | 612,11 | 605,53 | 450,24 | 442,93 | 390,26 | 398,94 |
| % Variação (M\pmDP) | +475 \pm77,14 | | +437 \pm39,24 | | -6 \pm2,70 | |

Por outro lado, os ensaios em que se realizou o 2º tratamento do efluente apresentam um decréscimo médio de 6% do teor de proteínas. Estes resultados aparentemente são contraditórios, já que as microalgas estariam expostas a uma menor concentração de tóxicos devido ao efeito do primeiro tratamento. No entanto, o efluente resultante do 1º tratamento foi sujeito a esterilização e a evaporação ocorrida provavelmente contribuiu para o aumento da concentração em fenóis totais levando a esta variação das proteínas. De facto, Megharaj et al. (1992) verificou que o aumento dos compostos fenólicos (5 – 20 $\mu\text{g/mL}$) no meio de cultura traduz-se numa diminuição do teor proteico das células de *C. vulgaris*.

Tabela 4.10 – Parâmetros físico-químicos resultantes dos ensaios realizados em AR-3.

| Diluição AR | Duração (dias) | Vol. (%) | Chl Total (%) | Chl a (%) | Chl b (%) | Carot (%) | Proteína (%) |
|-----------------|-------------------|-------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| 20% | 14 | = | -88 | -96 | -96 | -78 | +437 |
| 20% Adap | 14 | = | -82 | -88 | -88 | -88 | +375 |
| 2º Trat. | 18 | = | -80 | -77 | -88 | -82 | -6 |

(NA-Não avaliado.)

A análise da tabela resumo (Tabela 4.10) permite-nos concluir que a biorremediação em AR-3 não traz mais-valias para a biomassa em termos de pigmentos, uma vez que nos ensaios realizados o saldo foi sempre negativo. Apesar disso verificou-se uma valorização no teor proteico que pode ser uma mais-valia na valorização da biomassa final.

4.3 Compostos Fenólicos

Fenólicos Totais

Dado que os ensaios de biorremediação foram desenvolvidos para AR de duas e três fases, os resultados serão apresentados por essa ordem.

AR-2

Nos ensaios de biorremediação AR-2 a 35%, as culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e no final dos 18 dias de fermentação obteve-se um Índice de Perda de Fenólicos (PLI) de 73%. No entanto considerando o desempenho das culturas controle, o PLI líquido obtido foi de 51%. Comparativamente, o segundo ciclo não apresentou diferenças nos valores de PLI (Tabela 4.11). Os resultados sugerem que a utilização das microalgas em 2º ciclo mantem a eficácia na redução dos compostos fenólicos.

Tabela 4.11 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 35% AR-2, 1º e 2º ciclos da biomassa.

| | 1º Ciclo (18 dias) | 2º Ciclo (14 dias) |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Concentração inicial ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | $6 \pm 0,34$ | $7 \pm 0,02$ |
| % PLI | $73 \pm 2,82$ | $70 \pm 7,19$ |
| % PLI líquido | $51 \pm 2,82$ | $62 \pm 7,19$ |

(PLI - Índice de Perda de Fenólicos; PLI líquido - Índice de Perda de Fenólicos considerando o controle; n=3)

Para os ensaios com menor diluição das AR-2 (50% e 60%), de forma a aumentar o rendimento de perda de fenólicos, os inóculos foram pré-adaptados (10% em Bold Basal Modificado) e reduziu-se o tempo de fermentação para 8 dias. Os resultados mostraram que apesar de terem sido testadas duas diluições (muito próximas), não se verificaram diferenças no PLI líquido (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 50% e 60% AR-2.

| | 50% | 60% |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Concentração inicial ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | $8 \pm 0,10$ | $10 \pm 0,20$ |
| % PLI | $56 \pm 2,13$ | $53 \pm 7,41$ |
| % PLI líquido | $17 \pm 2,13$ | $24 \pm 7,41$ |

(PLI - Índice de Perda de Fenólicos; PLI líquido - Índice de Perda de Fenólicos considerando o controle; n=3)

No biotratamento das AR não sujeitas ao processo de conservação através da congelação, as culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de $7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e no fim dos 8 dias de fermentação obteve-se um PLI líquido de 5% (Tabela 4.13). Comparativamente com os resultados obtidos nas culturas de 50%, apresentados anteriormente, verificaram-se valores pouco satisfatórios e tal poderá ser devido à tendência que os compostos fenólicos têm se converterem durante o período de armazenamento 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). No biotratamento utilizando o reator de coluna de colhas, as culturas foram iniciadas com um teor médio de fenóis totais de $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e no final do período de ensaio observaram-se valores líquidos de PLI de 19% (Tabela 4.13). Comparativamente com as culturas de biorremediação anteriormente realizadas com igual diluição do efluente, verifica-se que não existem diferenças no PLI-líquido. Apesar disso, os resultados obtidos sugerem que podem existir vantagens no uso deste tipo de fotobiorreator, já que permitem rentabilizar o incremento em pigmentos e em proteína, na biomassa algal.

Tabela 4.13 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 50% AR-2 com efluente não preservado e otimização do biorreator.

| | Efluente não preservado (8 dias) | Otimização biorreator (8 dias) |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Concentração inicial ($\mu\text{g/mL}$) | $7 \pm 0,38$ | $9 \pm 0,13$ |
| % PLI bruto | $40 \pm 1,93$ | $43 \pm 0,90$ |
| % PLI líquido | $5 \pm 1,93$ | $19 \pm 0,90$ |

(PLI - Índice de Perda de Fenólicos; PLI líquido- Índice de Perda de Fenólicos considerando o controlo; n=3)

AR-3

Foram executados dois tipos de ensaios de biorremediação em paralelo: com e sem pré-adaptação do inóculo. Além disso foi também realizado um segundo tratamento do afluente. Para todos os ensaios a concentração de água ruça (AR-3) foi de 20% de diluição em meio Bold Basal Modificado. Os resultados das concentrações iniciais de fenóis totais e da eficácia de remoção dos compostos fenólicos, avaliada pelo Índice de Perda de Fenólicos (PLI) encontram-se na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Variação dos compostos fenólicos no efluente 20% AR-3, biomassa com e sem adaptação e segundo tratamento do efluente.

| | Sem pré-adaptação (14 dias) | Com pré-adaptação (14 dias) | 2° Tratamento (18 dias) |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Concentração inicial (µg/mL) | 26 ±0,69 | 28 ±0,29 | 21 ±0,79 |
| % PLI | 20 ±3,22 | 43 ±8,43 | 17 ±8,87 |

(PLI - Índice de Perda de Fenólicos; n=3)

Comparativamente, com as culturas de biorremediação, as culturas controle apresentaram uma capacidade de remoção dos compostos fenólicos praticamente idêntica a dos ensaios, pelo que o PLI líquido não foi calculado. Para isso poderá ter contribuído a decomposição dos fenóis promovida pela aerificação (Komilis et al., 2005).

Comparativamente às AR-2 (apesar destas terem sido testadas em menor diluição) os valores de PLI obtidos são muito inferiores, não ultrapassando os 20%. Verifica-se maior eficiência na remoção de compostos fenólicos quando se usa a *C. vulgaris* pré-adaptada.

Em função dos resultados anteriores, a identificação e quantificação dos compostos fenólicos individuais foi realizada nos ensaios de biorremediação e em amostras de biomassa final liofilizada para os ensaios de águas ruças de 2 fases para a diluição de 35% do efluente e águas ruças de 3 fases para 20% diluição, para ensaios sem pré-adaptação e 2° tratamento.

4.4 Identificação dos compostos fenólicos

Biomassa

Foram sujeitos a análise cromatográfica amostras liofilizadas da biomassa resultante dos ensaios 35% AR-2 e 2° tratamento AR-3. Para ser possível uma comparação, foram também analisadas amostras de biomassa obtida em culturas desenvolvidas rotineiramente em meio Bold Basal (biomassa fresca) e biomassa do início destes ensaios (T0). Os resultados foram uniformes para todas as amostras, já que nem a biomassa resultante dos ensaios de biorremediação, nem a biomassa fresca e biomassa T0 apresentavam compostos fenólicos. Assim, pode-se concluir que a biomassa não

incorporou nenhum composto fenólico, durante o processo de biorremediação, apenas se registrando variações nos pigmentos e nas proteínas.

Efluente

Na Tabela 4.15 encontram-se as variações observadas no perfil dos três compostos fenólicos identificados na série de ensaios 35% AR-2 e respectivo controle (negativo). Bianco et al. (2003) confirmou também a presença de ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico, e ácido cafeico.

Pode-se observar que todos os compostos fenólicos registados no início foram totalmente eliminados com a biorremediação.

Tabela 4.15 – Variação do perfil de compostos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) em 35% AR-2.

| | Bioensaio | | Controlo | |
|---------------------------------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|
| | CF _t | % Variação | CF _t | % Variação |
| Ácido gálico | 8 \pm 0,20 | -100 | 8 \pm 0,00 | -19 \pm 4,00 |
| Ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico | 3 \pm 0,00 | -100 | 3 \pm 0,20 | -27 \pm 11,20 |
| Ácido cafeico | 8 \pm 0,30 | -100 | 8 \pm 0,00 | -45 \pm 1,20 |

(CF_t - Concentração do composto fenólico ao T0; n=3)

Por outro lado, na cultura controlo verifica-se que houve também alguma diminuição dos compostos fenólicos, contudo esta não foi tão significativa quanto a observada no bioensaio. Estes resultados vêm de encontro aos que foram já expostos anteriormente, na redução efetiva dos compostos fenólicos totais, confirmando assim a ação positiva das microalgas na biorremediação destas águas ruças.

Na Tabela 4.16 encontram-se os resultados obtidos na análise cromatográfica do perfil de compostos fenólicos do efluente AR-3 a 20% sem pré adaptação e respectivo controlo (negativo).

Tabela 4.16 – Variação do perfil de compostos fenólicos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) em 20% AR-3 sem pré-adaptação.

| | Bioensaio | | Controlo | |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | CFT _i | %Variação | CFT _i | %Variação |
| Ácido gálico | 89 \pm 1,41 | -10 \pm 0,91 | 59 \pm 0,34 | -8 \pm 2,13 |
| Ácido <i>p</i>-hidroxibenzóico | 30 \pm 0,57 | -0,9 \pm 1,83 | 7 \pm 0,47 | +421 \pm 18,39 |
| Ácido protocatecuico | 923 \pm 16,65 | -100 | 687 \pm 2,27 | -100 |
| Ácido siríntrico | 18 \pm 0,36 | +13 \pm 2,37 | 8 \pm 0,14 | +225 \pm 6,71 |
| Rutina | 4 \pm 0,28 | -100 | 2 \pm 0,04 | -100 |
| Quercetina | 8 \pm 0,23 | -24 \pm 0,88 | 5 \pm 0,08 | -100 |

(CFT_i - Concentração do composto fenólico ao T0; n=3)

Aqui foram identificados mais compostos fenólicos, comparativamente às águas ruças de 2 fases, nomeadamente os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, e siríntrico. Para além dos ácidos estavam também presentes a rutina e a quercetina.

Este procedimento permitiu verificar que o composto maioritário em todas as amostras era o ácido protocatecuico. De facto autores já confirmaram a presença de ácido *p*-hidroxibenzóico (Casa et al., 2002; Kallel et al., 2009), ácido protocatecuico (Kallel et al., 2009), e ácido siríntrico (Casa et al., 2002) nas AR-3 através de cromatografia.

À exceção do ácido siríntrico, todos os compostos fenólicos sofreram uma diminuição da sua concentração, quando sujeitos a biorremediação com a *C. vulgaris*. (Tabela 4.16). Especial destaque para ácido protocatecuico e a rutina que no final da biorremediação estavam extintos. Variações no perfil de fenólicos foram também encontradas por outros investigadores, durante processos de biotratamento (Daâssi et al., 2014). Nos resultados obtidos no controlo do ensaio 20% AR-3 (Tabela 4.16) observa-se um aumento muito significativo do ácido *p*-hidroxibenzóico e do ácido siríntrico. Esta variação poderá ser devida eventualmente a compostos intermediários resultantes das vias de degradação, promovidas pela aerificação das culturas.

As variações registadas no ensaio e no controlo 20% AR-3, permitem-nos afirmar que apenas a redução do ácido *p*-hidroxibenzóico se deve efetivamente ao efeito das microalgas, uma vez que os restantes diminuições também são registaram no controlo. Uma vez mais os resultados obtidos pela análise cromatográfica vêm de encontro aos que

foram expostos anteriormente, na redução efetiva dos compostos fenólicos totais, confirmando a ação mais fraca das microalgas na biorremediação destas águas ruças.

Da comparação entre as AR-2 e as AR-3 podemos verificar que as AR-3 apresentam quer uma maior concentração, quer uma maior diversidade de compostos fenólicos. Esta diversificação está fortemente condicionada não só pelo tipo de extração, mas também pela espécie de azeitona e respetivo cultivo, o grau de maturação do fruto (Yay et al., 2012).

4.5 Avaliação Toxicológica

4.5.1 Testes de ecotoxicidade da biomassa com *Daphnia magna*

Os ensaios de toxicidade da biomassa foram realizados com o crustáceo de água doce, *Daphnia magna*. A *D. magna* é considerada um ótimo organismo de estudo na área da toxicologia, uma vez que pode ingerir o alimento tóxico presente na água ou pode absorver a toxicidade dos compostos através do seu exosqueleto (Kashian e Dodson, 2002). Existem muitos compostos tóxicos presentes no ambiente que afetam a integridade e a permeabilidade das membranas biológicas dos organismos, isto é, os organismos sofrem uma intoxicação resultando num efeito letal (Rand e Petrocelli, 1983). Para além da mortalidade, o comportamento frequentemente estudado e avaliado é o fototático. Este comportamento funciona como um bioindicador da presença de poluentes (Di Delupis e Rotondo, 1988). A presença ou não de movimento por parte do crustáceo pode ser indicativo de não contaminação ou de contaminação respetivamente. Este comportamento deve-se à sensibilidade do sistema nervoso destes organismos aos compostos tóxicos e a sua interligação com o sistema muscular. Na presença de um composto tóxico o sistema nervoso é afetado impossibilitando o funcionamento do sistema muscular, levando à ausência de movimentação (Di Delupis e Rotondo, 1988).

A realização destes testes apresenta uma grande pertinência quando se pensa na utilização futura da biomassa. Neste trabalho a *D. magna* foi utilizada para avaliação da toxicidade da biomassa resultante dos ensaios de biorremediação. Para uma melhor comparação foi realizado um controlo com cultura *C. vulgaris*. Este controlo permite-nos verificar se a dáfnia apresenta alguma intolerância a esta microalga. Os resultados obtidos para o controlo foram de 100% \pm 0 de sobrevivência com 100% \pm 0 de mobilidade no final

das 36 horas. As dáfias utilizadas no controlo não tinham sido alimentadas previamente e a observação das mesmas à lupa, permitiu verificar que estas se alimentaram da microalga. Assim podemos concluir que o crustáceo se alimenta de *C. vulgaris* e que a mesma não apresenta toxicidade antes dos ensaios de biorremediação.

Na Figura 4.17 está apresentada a taxa de sobrevivência das dáfias quando exposta à biomassa resultante da fermentação com 35% AR-2. Ao fim de 24 horas verificou-se um decréscimo de 100% para 96% da taxa de sobrevivência com mobilidade, que se manteve até as 36 horas.

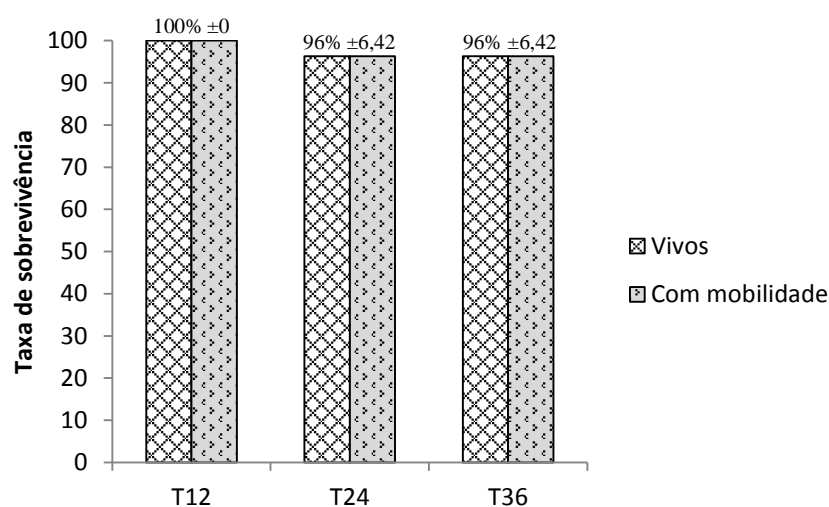


Figura 4.17 – Sobrevivência e mobilidade da *Daphnia magna* quando exposta à biomassa resultante do ensaio 35% AR-2 ao longo do tempo. (T12-Avaliação às 12 horas; T24-Avaliação às 24 horas; T36-Avaliação às 36 horas; n=9x3)

Por outro lado o 2º ciclo da biomassa (35% AR-2) revelou-se mais tóxico (Figura 4.18), conforme seria de esperar. Logo nas primeiras 12 horas a taxa de sobrevivência era de 81% dos quais 71% permaneciam com mobilidade. Ao fim das 36 horas observou-se uma taxa de sobrevivência de 52% com mobilidade.

Com a comparação do 2º com o 1º ciclo da biomassa (35% AR-2) verifica-se que no 2º ciclo a biomassa se tornou mais tóxica. Os resultados obtidos anteriormente (pigmentos e proteínas) para estas séries sugerem o crescimento da cultura, particularmente no segundo ciclo da biomassa, com a eventual incorporação de compostos, nomeadamente compostos resultantes da degradação dos fenólicos. Comparativamente, a biomassa de segundo ciclo será potencialmente mais “tóxica” já que também foi exposta durante mais tempo às AR-2.

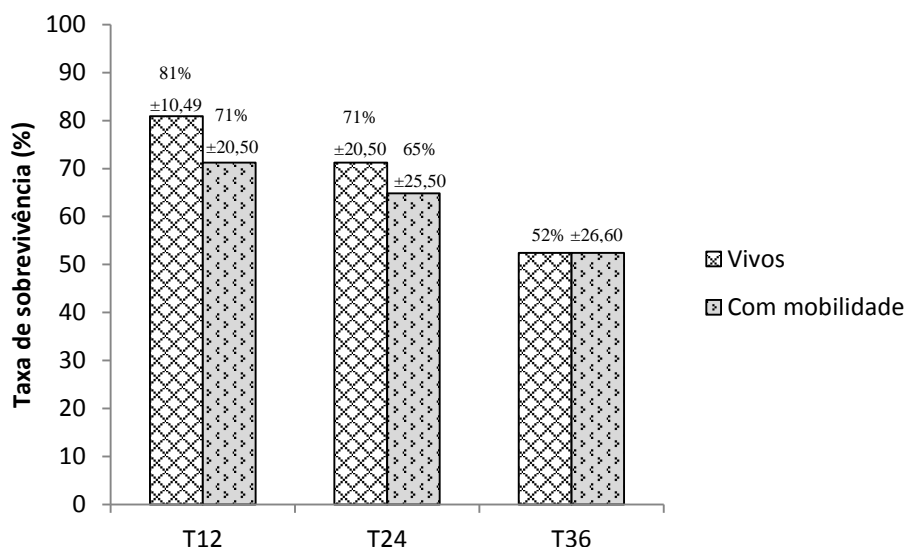


Figura 4.18 – Sobrevivência e mobilidade da *Daphnia magna* quando exposta à biomassa resultante do ensaio 35%, 2º ciclo da biomassa AR-2 ao longo do tempo. (T12-Avaliação às 12 horas; T24-Avaliação às 24 horas; T36-Avaliação às 36 horas; n=11x3)

Na Figura 4.19 estão representados os resultados obtidos nos testes de toxicidade realizados com a biomassa resultante de 50% AR-2.

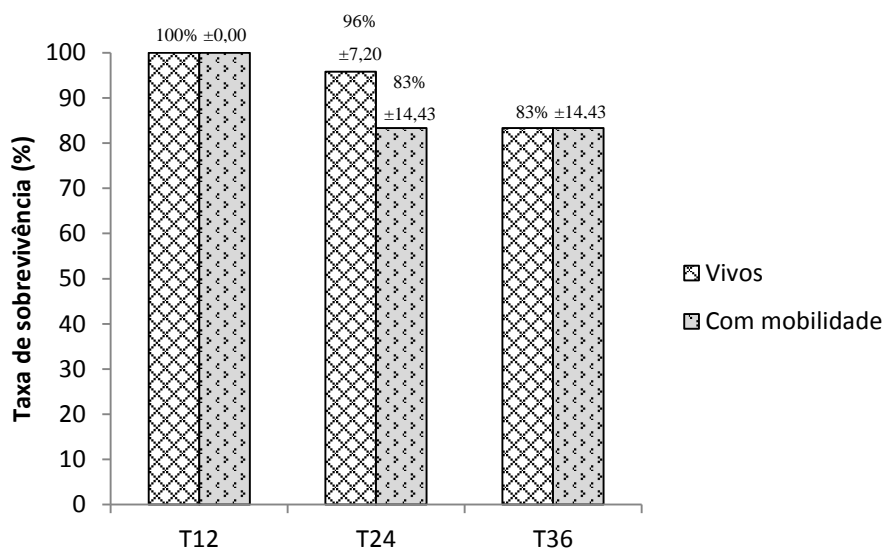


Figura 4.19 – Sobrevivência e mobilidade da *Daphnia magna* quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 ao longo do tempo. (T12-Avaliação às 12 horas; T24-Avaliação às 24 horas; T36-Avaliação às 36 horas; n=8x3)

Uma vez que não foram registadas diferenças significativas nos resultados anteriores entre os ensaios 50% e 60% AR-2, a toxicidade foi verificada de forma aleatória na concentração de 50% AR-2. Como seria de esperar, com o aumento da concentração de AR-2, aumenta a toxicidade da biomassa. Nas primeiras 12 horas a taxa de sobrevivência permanecia nos 100% com mobilidade, porém no fim das 36 horas a taxa desceu para aproximadamente 83% de sobreviventes com mobilidade.

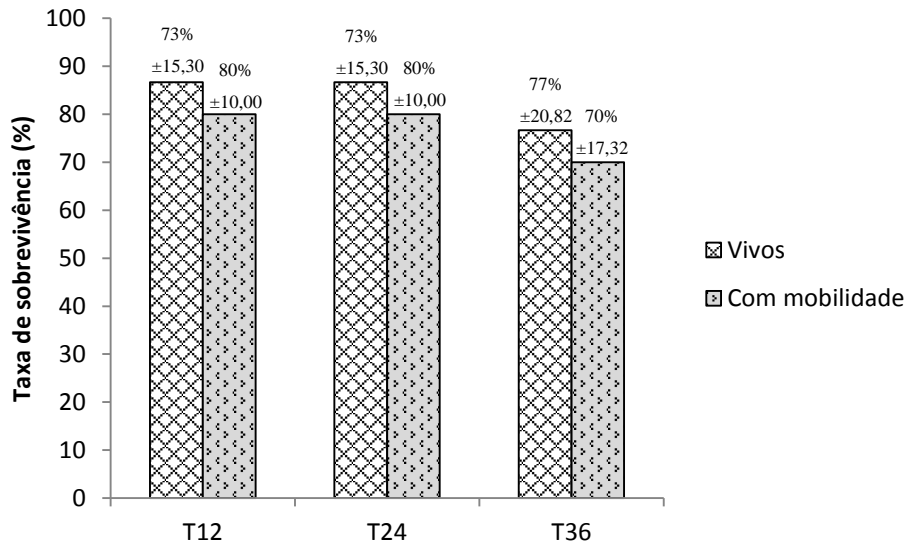


Figura 4.20 – Sobrevivência e mobilidade da *Daphnia magna* quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 com utilização do efluente não preservado ao longo do tempo. (T12-Avaliação às 12 horas; T24-Avaliação às 24 horas; T36-Avaliação às 36 horas; n=10x3)

Na utilização de efluente não preservado (50% AR-2) ao fim de 36 horas obteve-se uma taxa de sobrevivência de 77% dos quais apenas 70% apresentava mobilidade (Figura 4.20). Esta biomassa apenas com 8 dias de fermentação apresenta uma toxicidade idênticas ao ensaio realizado com 16 dias de fermentação 50% AR-2.

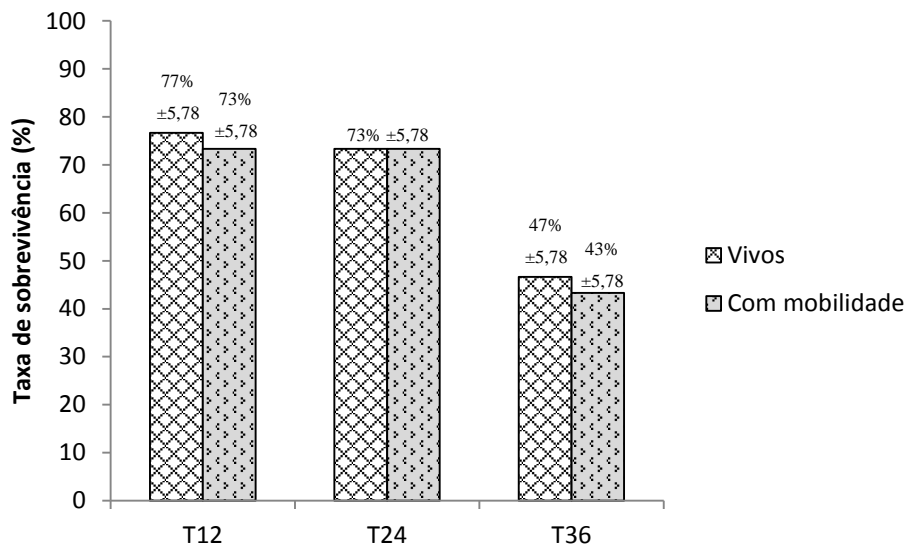


Figura 4.21 – Sobrevivência e mobilidade da *Daphnia magna* quando exposta à biomassa resultante do ensaio 50% AR-2 com otimização do biorreator ao longo do tempo. (T12-Avaliação às 12 horas; T24-Avaliação às 24 horas; T36-Avaliação às 36 horas; n=8x3)

A biomassa que apresentou maior toxicidade após biotratamento das AR-2 foi a resultante dos ensaios onde se utilizou os biorreatores otimizados (Figura 4.21). Ao fim de 12 horas a taxa de sobrevivência decresceu para 77%, dos quais 73% apresentava

mobilidade. A descida nas taxas em função do tempo foi gradual, até atingir às 36 horas uma taxa de sobrevivência de 47%, dos quais 43% apresentava mobilidade. Tal como para o 2º ciclo da biomassa a 35%, os resultados obtidos para esta série sugerem crescimento e incorporação na biomassa algal de compostos resultantes da degradação dos fenólicos existentes no efluente.

Tendo em conta os resultados obtidos anteriormente para toxicidade da biomassa resultante da biorremediação de AR-2, pode-se considerar que a avaliação é feita com base nos resultados obtidos às 36 horas. Assim, para os ensaios realizados para a toxicidade da biomassa resultante da biorremediação de AR-3, serão apresentados apenas os valores a este tempo.

A taxa de sobrevivência das dáfnias quando expostas à biomassa resultante da fermentação com 20% AR-3 mostra que $87\% \pm 11,77$ sobreviveram e encontravam-se móveis. Estes resultados sugerem que a toxicidade desta biomassa é semelhante à obtida para 50% AR-2. De facto a composição dos dois tipos de águas ruças é muito semelhante, mas a concentração de compostos fenólicos totais nas AR-3 é comparativamente superior (Tsagaraki et al, 2007). Quando a biomassa sofre pré-adaptação a taxa de sobrevivência ao T36 desce para $47\% \pm 5,77$, dos quais $43\% \pm 5,77$ apresentavam mobilidade. Estes resultados sugerem uma maior incorporação de compostos fitotóxicos por parte das microalgas quando comparado com a série em que não se fez adaptação prévia da cultura.

A biomassa resultante do segundo tratamento do efluente (20% AR-3) é a que apresenta uma maior toxicidade, às 36 horas a taxa de sobrevivência era nula. Apesar de não terem sido identificados compostos fenólicos nesta biomassa, não invalida que outros compostos não tenham sido incorporados, nomeadamente compostos resultantes da degradação dos fenólicos, contribuindo assim para o aumento da sua toxicidade. Assim, em trabalhos futuros propõem-se a pesquisa de outro tipo de compostos eventualmente presentes na biomassa.

4.4.2 Teste de ecotoxicidade do efluente com *Artémia salina*

Os ensaios de ecotoxicidade do efluente foram realizados com o crustáceo salino, *Artémia salina*. A fácil manipulação e incubação da *A. salina* fazem com que esta tenha vindo a ser utilizada nos testes de toxicidade (Calow, 1993). Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais na artémia (Nascimento et al., 2008), nomeadamente a sua sensibilidade aos compostos fenólicos presentes em efluentes (Guerra, 2001). Ainda

que os testes de toxicidade com efluentes sejam comumente realizados com organismos de água doce, o uso de *A. salina* justificou-se pelo facto de que a maioria dos compostos nocivos despejados no ambiente, principalmente por fenómenos de lixiviação, têm como destino final o ambiente salino. Os testes de ecotoxicidade realizados consistiram na contabilização dos indivíduos sobreviventes ao tempo zero e fim de 6 e 12 horas de contacto com AR após o processo de biorremediação. Embora os indivíduos utilizados nos ensaios tenham sido náuplios recém-eclodidos e não alimentados, para uma melhor avaliação dos resultados foram realizados dois tipos de controlo (positivo e negativo). O controlo positivo, realizado com água destilada em substituição das AR, permite-nos verificar a mortalidade do crustáceo quando não se encontra em condições ideais de salinidade e sem composto tóxico. Esta avaliação prévia é importante para averiguar se a mortalidade ocorrida nas séries se deve à toxicidade do efluente ou à baixa condutividade do meio.

A Figura 4.22 apresenta a sobrevivência da artémia em água destilada, durante o tempo de ensaio. Neste controlo a taxa de sobrevivência às 12 horas decresceu de 100% para 89%, demonstrando que a partir das 6 horas a mortalidade existente pode não se dever ao efeito dos compostos tóxicos do efluente. Este controlo foi utilizado como critério quer nas AR-2 quer nas AR-3.

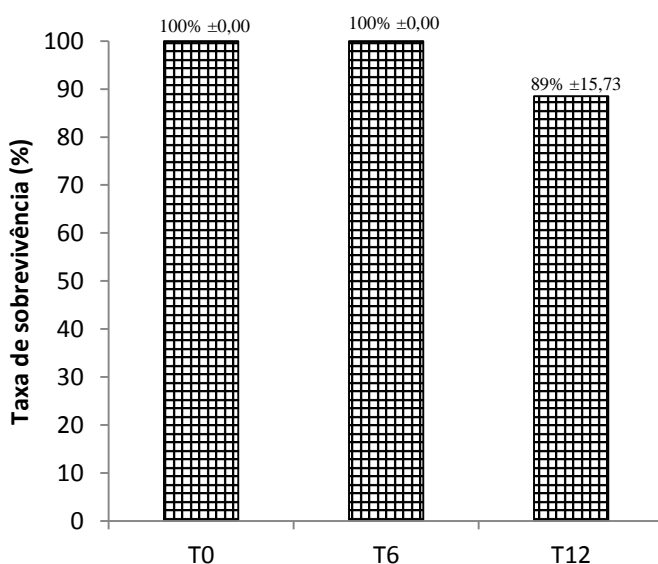


Figura 4.22 – Sobrevivência da *Artémia salina* quando exposta a água destilada ao longo do tempo. (T0-Avaliação às 0 horas; T6-Avaliação às 6 horas; T12-Avaliação às 12 horas; n=6x4)

O controlo negativo, realizado com AR sem tratamento e às mesmas diluições, permite-nos verificar se efetivamente ocorreu uma diminuição da toxicidade do efluente quando sujeito ao processo de biorremediação. O resultado deste controlo foi uniforme em todas as séries testadas (AR-2 e AR-3), ao fim de 6 horas a taxa de sobrevivência desceu de 100% (T0) para 0% (T6). A sobrevivência nula demonstra que antes da biorremediação as AR diluídas apresentavam toxicidade para estes crustáceos.

Nas AR-2 foram testados os efluentes resultantes de biotratamentos de 35%, 50% e 60% de diluição, do biotratamento com efluente não preservado e do biotratamento com reator de coluna de bolhas. A observação dos resultados (Figura 4.23) sugere que existe uma diminuição da mortalidade da artémia com o aumento da concentração de efluente tratado, isto é para AR a 35% observou-se efeito mais tóxico, comparativamente a AR a 50% e 60%. A série de 35% foi a única a sofrer um decréscimo da taxa de sobrevivência, de 100% ao T0 para 36% ao T12.

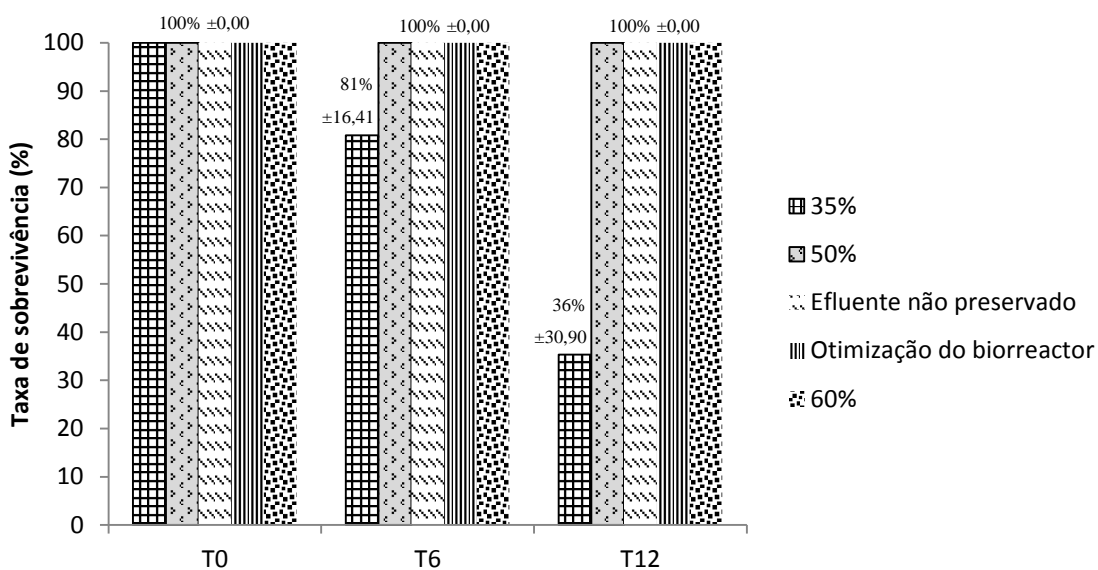


Figura 4.23 – Sobrevivência da *Artémia salina* quando exposta aos efluentes resultantes dos ensaios de biorremediação com AR-2 ao longo do tempo. (T0-Avaliação às 0 horas; T6-Avaliação às 6 horas; T12-Avaliação às 12 horas; n=6x4)

Embora a artémia seja considerada uma espécie extremamente eurialina, tolerando variações de salinidade entre 3 e 300‰ (Treece, 2000) e possuindo um eficiente sistema de osmorregulação (Van Stappen, 1996), para diluições mais altas, como é o caso de 35% de AR, poderá não conseguir sobreviver. Por outro lado, a diminuição da diluição das AR poderá acarretar a presença de substâncias que aumentem a condutividade do meio, logo a presença destes sais poderá contribuir para regulação osmótica e subsequente maior taxa de sobrevivência da artémia.

De um modo geral, a comparação destes resultados com o controlo negativo possibilita afirmar que se observa uma diminuição relativa da toxicidade do efluente AR-2 após o processo de biorremediação.

Nas AR-3 foram testados os efluentes resultantes de biotratamentos de 20% de diluição, com inóculo pré-adaptado e sem pré-adaptação (Figura 4.24).

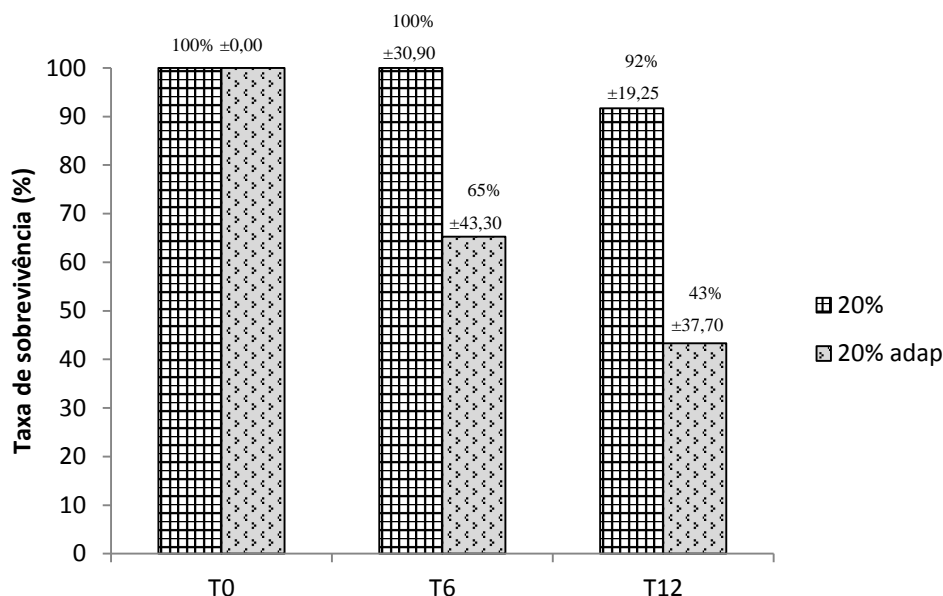


Figura 4.24 – Sobrevivência da *Artémia salina* quando exposta aos efluentes resultantes dos ensaios de biorremediação com AR-3 ao longo do tempo. (T0-Avaliação às 0 horas; T6-Avaliação às 6 horas; T12-Avaliação às 12 horas; n=6x4)

Contrariamente ao esperado, o efluente cuja biomassa sofreu pré-adaptação apresentou uma taxa de sobrevivência inferior (43%) ao que não teve pré-adaptação (92%). A avaliação da germinação de sementes de alface na presença deste efluente mostraram resultados idênticos, ou seja, menor capacidade de germinação nos ensaios com pré-adaptação do inóculo (resultados não publicados).

Na Tabela 4.17 encontra-se o resumo dos ensaios de toxicidade, quer do efluente quer da biomassa. De uma forma geral, após a biorremediação, a biomassa apresenta alguma toxicidade e o respetivo efluente diminuiu a sua. Comparativamente, o efluente não tratado (controlo negativo) leva a 100% de mortalidade da artémia, sendo por isso notório o papel das microalgas na remoção de compostos tóxicos do efluente.

A toxicidade da biomassa varia com o tipo de AR e diluição utilizada, sendo potencialmente mais agravada quando resulta de biorremediações com AR-3.

As taxas de sobrevivência das dáfrias ao fim de 36 horas, para biomassa resultante do tratamento AR-2, são bastante aceitáveis visto que são superiores a 77%, com a exceção do uso da coluna de bolhas (47%). Como seria de esperar dois tratamentos sucessivos com a mesma biomassa levam a um aumento da toxicidade da mesma.

Tabela 4.17 – Ecotoxicidade da biomassa e do efluente AR-2 e AR-3 após o biotratamento.

| | | Biomassa | Efluente |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | | T36 | T12 |
| Controlo Positivo | | 100% ±0,00 | 89% ±15,73 |
| Controlo negativo | | NA | 0% ±0,00 |
| AR-2 | 35% | 96% ±6,42 | 36% ±30,90 |
| | 35% 2º Ciclo | 52% ±26,60 | NA |
| | 50% e 60% | 83% ±14,43 | 100% ±0,00 |
| | Efluente não preservado | 77% ±20,82 | 100% ±0,00 |
| | Otimização do biorreator | 47% ±5,78 | 100% ±0,00 |
| AR-3 | 20% | 87% ±11,70 | 92% ±19,25 |
| | 20% Adaptada | 47% ±5,77 | 43% ±37,70 |
| | 2º Trat. Efluente | 0% ±0,00 | NA |

(T36-Taxa de sobrevivência da dáfria ao fim de 36 horas em contacto com a biomassa; T12-Taxa de sobrevivência da artémia ao fim de 12 horas em contacto com o efluente; NA-Não avaliado.)

As taxas de sobrevivência das dáfrias, para biomassa resultante do tratamento AR-3 são aproximadamente superiores a 50%, sendo a toxicidade agravada quando se fez a pré-adaptação. Surpreendentemente o segundo tratamento originou uma biomassa altamente toxica, contudo potencialmente pouco interessante, dado o seu perfil em proteínas e pigmentos. Assim, e uma vez que esta biomassa não será utilizada como produto exclusivo mas sim em misturas, pode considerar-se a sua futura utilização.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Através dos resultados recolhidos ao longo deste trabalho foi possível verificar-se que de facto o meio de cultura condiciona o crescimento, e o desenvolvimento da microalga. Dos dois tipos de efluentes (AR-2 e AR-3) testados na biorremediação obtiveram-se biomassas com características distintas. Também com as diferentes diluições (35%, 50 e 60% AR-2 e 20% AR-3) se obteve biomassas com perfis diferentes.

No que diz respeito a biorremediação com AR-2, a biomassa resultante que apresenta resultados mais favoráveis à sua futura valorização, foi a dos ensaios de 35% 2º ciclo e 50% com recurso a coluna de bolhas. Estas séries apresentaram aumentos quer a nível proteico quer a nível de pigmentos, com especial destaque para os carotenoides. Contudo, a utilização de diluições de 50% e 60% destes efluentes deve ser valorizada, dado o aumento do teor em proteínas na biomassa final.

Os resultados obtidos na biomassa resultante dos ensaios com AR-3 permite-nos concluir que a biorremediação neste efluente não traz mais-valias para a biomassa em termos de pigmentos, uma vez que nos ensaios realizados o saldo foi sempre negativo. Apesar disso verificou-se uma valorização no teor proteico que pode ser importante na valorização da biomassa final.

No que respeita aos compostos fenólicos registaram-se de uma forma geral uma variação nula, isto é, a biorremediação com microalgas surtiu efetivamente resultados na diminuição dos compostos fenólicos existentes nestes efluentes, sendo os resultados mais expressivos nas AR-2, porém não houve incorporação destes compostos na biomassa algal.

Os resultados obtidos na ecotoxicidade mostraram que após a biorremediação a biomassa apresenta alguma toxicidade e o respetivo efluente diminuiu a toxicidade. Comparativamente, o efluente não tratado (controlo negativo) leva a 100% de mortalidade da artémia, sendo por isso mais uma vez notório o papel das microalgas na remoção de compostos tóxicos do efluente. A toxicidade da biomassa varia com o tipo de AR e diluição utilizada, sendo potencialmente mais agravada quando resulta de biorremediações com AR-3.

Com este trabalho pretendeu-se dar um contributo para a caracterização da biomassa resultante de processos de biorremediação de águas ruças, com vista à sua aplicação futura. Para um melhor enquadramento da potencial utilização desta biomassa seriam necessários mais estudos, nomeadamente uma análise físico-química mais ampla

(aminoácidos, lípidos, etc), assim como novos testes de ecotoxicidade, nomeadamente testar a sua vertente crônica.

6. BIBLIOGRAFIA

- Al-Khalid T. and El-Naas M. 2012. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 42: 1631-1690.
- Alamsjah M.A., Ishibe K., Kim D., Yamaguchi K., Ishibashi F., et al. 2007. Selective toxic effects of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* on red tide phytoplankton species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71: 265-268.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association. Washington.
- Arizon A., Neto T.J.P., Gerber W. 2011. Manual sobre Toxicidade em efluentes industriais. *Friergs Ciergs*. Porto Alegre. 7-9.
- Aruoja V., Sihtmäe M., Dubourguier H.C., 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.
- Ayed L., Assas N., Sayadi S., Hamdi M. 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Lett Appl Microbiol* 40: 7-11.
- Bastos R.G., Queiroz M.I, Almeida T.L., Beneri R.L., Almeida R.V., Padilha M. 2004. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nägeli* na ausência de luminosidade. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. Vol. 9, 2: 112-116.
- Benemann J. R. 1990. Microalgae products and production: An overview. *Journal of Industrial Microbiology*. Vol. 31, 5: 247-256.
- Bertoldi F.C., Sant'Anna E., Oliveira J.L.B. 2008. Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Ciencia Rural*. Vol. 38, 1: 54-58.
- Bianco A., Buiarelli F., Cartoni G., Coccioli F., Jasionowska R., Margherita P. 2003. Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of biophenolic compounds in olives and vegetation waters. *Journal Separation of Science*. 26: 409-416.

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Calow P. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: Hoffman, D. et al. *Handbook in cytotoxicology*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. Vol. 1, 1-5.
- Casa R., D'Annibale A., Pieruccetti F., Stazi S.R., Giovannozzi Sermanni G., Lo Cascio B. 2002. 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.
- Chong E.W-T., Wong T.Y., Kreis A.J., Simpson J.A., Guyner R.H. 2007. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 335: 755.
- Chisty Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. Vol. 25, 294-306.
- Ciferri O., Tiboni O. 1973. Elongation factors for chloroplast and mitochondrial protein synthesis in *Chlorella vulgaris*. *Nature New Biology*. Vol. 245 209-211.
- Costa C.R., Olivi P., Botta C.M.R., Espindola E.L.G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e método de Avaliação. *Química Nova*. Vol.31, 7:1820-1830.
- Crognale S., D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Quaratino D., Petruccioli M. 2006. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *J Chem Technol Biotechnol* 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 *Corioloropsis gallica*. *Chemosphere*. 113: 62-70.
- Delupis D., Rotondo V. 1988. Phototaxis in aquatic invertebrates: possible use in ecotoxicity tests. *Ecotoxicology Environment Safety*. 16: 189-193.
- Derner R.B., Ohse S., Villela M., Carvalho S. M., Fett R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Vol. 36, 6: 1959-1967.
- Di Giovacchino L., 1998. *Química y Tecnología del aceite de oliva*. Dimitrios Boskov. AMV ediciones. Madrid. 25-66.
- Di Giovacchino L., Sestili S., Di Vincenzo D. 2002. Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104: 587-601.

- Dixon Z.R., Shie F.S., Warden B.A., Burri B.J., Neidlinger T.R. 1998. The Effect of a Low Carotenoid Diet on Malondialdehyde-Thiobarbituric Acid (MDA-TBA) Concentrations in Women: A Placebo-Controlled Double-Blind Study. *Journal of the American College of Nutrition*. 17: 54-58.
- Ezezika O.C. & Singer, P.A. 2010. Genetically engineered oil-eating microbes for bioremediation: Prospects and regulatory challenges. *Technology in Society*. 32: 331-335.
- Fernandez M.H., Ojeda M.V., Rodriguez A.G., Bernardino J.M., Roig F., Garcia A.F. 1991. 1991. Apuntes: Elaboración de aceite de oliva de calidad. Junta de Andalucía Consejería de Agricultura y Pesca. 5/91, 173.
- Gaylarde C., Bellinaso M., Manfio G. 2005. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biociência*. 34: 36-41.
- Gherardi-Goldstein E., Bertoletti E., Zagatto P.A., Araújo R.P.A., Ramos M.L.L.C. 1990. Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). São Paulo.
- Guerra R. 2001. Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*. Vol. 44, 1737-1747.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2014. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 11 September 2014.
- Guo H., Luo S., Chen L., Xiao X., Xi Q., Wei W., Zeng G., Liu C. Wan Y., Chen J., He Y. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresour. Technol.* 101: 8599-8605.
- Harun R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 14, 1037-1047.
- Hermann A.A., John D.K., Souza M.P., Moraes M.S.A., Souza R.C.S. 2013. Biorremediação de efluente urbano utilizando microalgas. XIX Seminário de Iniciação Científica. 242.
- International Olive Oil Council. 2010. World and EU olive oil figures. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>.

- Jacob-Lopes E., Scoparo C.H.G., Franco T.T. 2008. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nägeli* in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*. Vol. 47, 8: 1365-1373.
- Jeanfils J., Collard F. 1983. Effect of immobilized *S.obliquus* cells in a matrix in oxygen evolution and fluorescence properties. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. 17: 254-257.
- Jeffrey S.W. and Humphrey G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzn. (BPP)* 167: 191-194.
- Justino C.I., Duarte K., Loureiro F., Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., Rocha-Santos T.A.P., Freitas A.C. 2009. Toxicity and organic content characterization of olive oil mill wastewater undergoing a sequential treatment with fungi and photo-Fenton oxidation. *J Hazard Mat*. 172: 1560-1572.
- Justino C.I., Pereira R., Freitas A.C., Rocha-Santos T., Panteleitchouk T., Duarte A.C. 2011. Olive oil mil wastewater befor and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view. *Ecotoxicol*. 21: 615-629.
- Kallel M., Belaida C., Mechichib T., Ksibia M., Elleucha 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.
- Kashian R.D., Dodson I. S. 2002. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicol Ind Health*. Vol. 18 5: 225-235.
- Kendall R.J., Anderson T.A., Baker R.J., Bens C.M., Carr J.A., Chiodo L.A., Cob III G.P., Dickerson R.L., Dixon K.R., Frame L.T., Hooper M.J., Martin C.F., McMurry S.T., Patino R., Smith E.E., Theodorakis W. 2001. *Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons*. 6th ed., MacGraw-Hill. New York. Cap. 29.
- Khan S.A., Rashmi, Hussain M.Z., Prasad S., Banerjee U.C. 2009. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 13, 2361-2372.
- Komilis P.D., Karatzas 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.
- Kumar M.S., Miao Z.H., Wyatt S.K. 2010. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculums source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. *Bioresource Technology*. Vol. 101, 6012-6018.

- Li X., Feng Y., Sawatsky N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. Kluwer Academic Publisher. Plant and soil. 192: 219-226.
- Li Y., Chen Y.F., Chen P., Min M., Zhou W., Martinez B., Zhu J. Ruan R., 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. Bioresource technology. 102: 5138-44.
- Linares A., Caba J.M., Ligeró F., De la Rubia T., Martínez J. 2003. Detoxification of semisolid olive-mill wastes and pine-chip mixtures using *Phanerochaete flavid-alba*. Chemosphere. 51: 887-891.
- Lorenzen C.J. 1967. Determination of chlorophylls and phaeopigments: spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr. 12: 343-346.
- McNamara C.J., Anastasiou C.C., O'Flaherty V., Mitchell R. 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. Int Biodeter Biodegr. 61: 127-134.
- Mallick N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. Biometals. Vol. 15, 4: 377-90.
- Martins A., Dinardi A.L., Formagi V.M., Lopes T.A., Barros R.M., Coneglian C.M.R., Brito N.N., Sobrinho G.D., Tonso S., Pelegrini R. 2003. Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis. São Paulo.
- Megharaj M., Pearson H.W. and Venkateswarlu K. 1992. Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. Plant and soil. 140: 25-34.
- Metcalf & Eddy, Inc. 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 3rd Ed. McGraw-Hill. New York. 1819.
- Morillo J.A., Antizar-Ladislao B., Manteoliva-Sánchez M., Ramos-Cornzana A., Russel N.J. 2008. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. Microbial Biotechnol. 82: 25-39.
- Murthy K.N., Rajesha J., Swamy M.M., Ravishankar G.A. 2005. Comparative evaluation of hepatoprotective activity of carotenoids of microalgae. J. Med. Food. 8: 52.
- Nascimento J.E., Melo A.F.M., Silva T.C.L., Filho J.V., Santos E.M., Albuquerque U.P., Amorim E.L.C. 2008. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus*

- (*Phyllanthaceae*). Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. Vol. 29, 2: 143-148.
- Niaounakis M., Halvadakis C.P. 2006. Olive processing waste management: literature review and patent survey, second ed. Elsevier. Amsterdam.
- Ohse S., Derner B.D., Ozório R.A., Braga V.C.B., Cunha P., Lamarca C.P., Santos M.E. 2008. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. Biotemas. 21: 7-18.
- Olaizola M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. Biomolecular Engineering. Vol. 20, 459-466.
- Olguin E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. Biotechnology Advances. 22: 81-91.
- Olson J.A. 1999. Bioavailability of carotenoids. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 49, 1: 21-25.
- Paiva S. and Russell R. 1999. Review Series: Antioxidants and their Clinical Applications β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. Journal of the American College of Nutrition. 18: 426-433.
- Parsons T.R. and Strickland J.D.H. 1963. Discussion of spectrophotometric determination of marine plankton pigments, with revised equations of ascertaining chlorophyll *a* and carotenoids. Journal of Marine Research. New Haven: Vol. 21, 3: 155-163.
- Perera O. and Yen M. 2007. Functional Properties of Carotenoids in Human Health, International. Journal of Food Properties. 10: 201-230.
- Queiroz M.I., Lopes E.J., Zepka L.Q., Bastos R.G., Goldbeck R. 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. Bioresource Technology. Vol. 98, 11: 2163-2169.
- Queiroz M.L.S., Torello C.O., Perhs S.M.C., Rocha M.C., Bechara E.J.H., Morgano M.A., Valadares M.C., Rodrigues A.P.O., Ramos A.L., Soares C.O. 2008. *Chlorella vulgaris* up-modulation of myelosuppression induced by lead: The role of stromal cells. Food and Chemical Toxicology. 48: 3147-3154.
- Ramos-Cormenzana A., Juarez-Jimenez B., 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.
- Rand G.M., Petrocelli R. 1983. Resting eggs in rotifers. Hydrobiology. 104: 213-224.

- Rand G.M., Wells P.G., McCarty L. S. 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment in Introduction on Aquatic Toxicology. 2nded. Taylor & Francis. Washington. 3-66.
- Rawat I., Kumar R.R., Mutanda T. Bux F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. Applied Energy. 88(10): 3411-3424.
- Ribo J.M. 1997. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. Environmental Toxicology and Water Quality. Vol.12, 4: 283-294.
- Rodolfi L., Chini Z.G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. 2008. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 102, 100-112.
- Rodriguez-Amaya D. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI Human Nutrition Institute. United States of America. 14-31.
- Ronco A., Báez M.C.D., Granados Y.P. 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa.
- Scragg A. 2005. Environmental Biotechnology, 1st edition. Oxford University Press Oxford.
- Shao J., Li R., Leo J.E. and Gu J.D. 2013. Potential for control of harmful cyanocateriae blooms using biologically derived substances: problems and prospects. Journal of Environmental Management. 125: 149-155.
- Singh H. 2006. Mycorremediation: Fungal Bioremediation. 1sted. John Wiley and Sons, New Jersey.
- 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.
- Spolaorea P., Joannis-Cassana C., Duranb E., Isamberta A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 101, 2: 87-96.
- Stom D.I. and Roth R. 1981. Some effects of polyphenols on aquatic plants: I. Toxicity of phenols in aquatic plants. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 27: 332-337.

- Tam N.F.Y., Wong Y.S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. Vol. 107, 145-151.
- Treece G.D. 2000. *Artemia Production for Marine Larval Fish Culture*. Southern Regional Aquaculture Center, Publication. 702.
- Tomaselli L. 2004. The Microalgal Cell. Richmond A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford. 3-19.
- Van Leeuwen C.J. 1988. *Manual on Aquatic Ecotoxicology*. Kluwer Academica Publishers. Dordrecht. Cap. 18.
- Van Stappen G. 1996. Introduction, biology and ecology of *Artemia*. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. 95.
- Vidali M. 2001. Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry*. 73: 1163-1172.
- Tsagaraki E., Lazarides H.N., Petrotos, K.B. 2007. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. Olive mill wastewater. V. Oreopoulou & W. Russ (Eds.). 133-157.
- Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D., Aggelis G. 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (*laccase*) activity. *Bioresour Technol*. 84: 251-257.
- Wang B., Li Y., Wu N., Lan C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 79, 707-718.
- Wang^a H.Q., Wu Z.B., Zhang S.H., Cheng S.P., He F. and Liang W. 2008. Relationship between the allelopathic activity and molecular structure of hydroxyl derivatives of benzoic acid and their effects on cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy Journal*. 22(1): 205-212.
- Wen Z., Johnson M. B. 2009. *Microalgae as a feedstock for biofuel production*. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University. 7.
- Wise D.L., Trantolo D.J., Eichon E.J., Inyang H.I., Stottneuter U. 2000. Bioremediation of Contaminated Soils. *Environmental Science and Pollution Control Series*. 22: 903.
- Xin L., Hu H.Y., Ke G., Sun Y.X. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource Technology*. Vol. 101, 5494-5500.

Yay A.S.E., Oral H.V., Onay T.T., Yenigun O. 2012. A study on olive oil mill wastewater management in Turkey: A questionnaire and experimental approach. Resources, Conservation and Recycling. 60: 64-71.³