

CARLA MARIA ALVES QUINTELAS DO AMARAL MARINHO

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
MICROBIOLÓGICA DE ÁGUAS RESIDUAIS
DE LAGARES DE AZEITE. SELECÇÃO DE
LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO AO
TRATAMENTO DE ÁGUAS RUÇAS**



Carla Maria Alves Quintelas do Amaral Marinho

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE
ÁGUAS RESIDUAIS DE LAGARES DE AZEITE. SELECÇÃO DE
LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO AO TRATAMENTO DE ÁGUAS
RUÇAS**

*Tese apresentada para o efeito de obtenção do grau
de Doutor em Ciências do Ambiente, de acordo com o
disposto no Decreto-Lei nº 216/92, de 13 de Outubro.*

Trabalho Supervisionado por:

Prof.^a Dra. Maria do Rosário Ferreira Anjos

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2009

Aos meus pais, Avelino e Emília

Aos meus filhos, Tomás, Francisca e Carlota

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de investigação, nunca é tarefa que possa ser efectuada com sucesso apenas por uma pessoa. Ele irá reflectir o esforço, dedicação, trabalho, ideias, alegrias, desilusões, alento, conforto, não só do autor, com responsabilidade acrescida, mas definitivamente, também, de um conjunto de pessoas, às quais gostaria de expressar publicamente toda a minha gratidão. Esta, não será nunca suficiente, e ficarei em dívida, que não serei capaz de pagar, para sempre.

Ao Professor Doutor Armando Mascarenhas Ferreira, Magnífico Reitor da UTAD, pelo seu excelente trabalho no melhoramento da nossa Instituição, que tem permitido o desenvolvimento de carreiras académicas de sucesso. Pela sua constante preocupação com o meu percurso profissional, e pela sua inestimável e sempre presente amizade, o meu obrigado.

Ao Professor Doutor Carlos Correia, Director do Departamento a que pertenço, pelo seu apoio, amizade e preocupação. Agradeço ainda todas as facilidades concedidas para a realização deste trabalho, em tudo o que lhe foi possível.

Ao Professor Doutor António Fontainhas Fernandes, distinto Presidente da Escola de Ciências da Vida e do Ambiente (ECVA). Obrigado Fontainhas, pois antes de seres o Presidente da escola a que eu, com muito orgulho pertenço, foste, és e serás sempre um Amigo. Desde os primeiros tempos da minha vida nesta academia, aprendi contigo, não só o valor do trabalho sério e dedicado, como ainda, e principalmente, o quanto vale uma amizade verdadeira. Recebi com agrado todos os teus conselhos, e sempre que consegui, apliquei-os à minha vida.

À Professora Doutora Célia Pais, agradeço a forma solícita, empenhada, paciente, desinteressada e encorajadora com que sempre me recebeu em Braga. O trabalho que desenvolvi, sempre com o seu apoio incondicional, revelou-se profícuo, mas acima de tudo permitiu o desenvolvimento de uma amizade, que faço questão de enaltecer e preservar.

À Professora Doutora Maria do Rosário Anjos, orientadora científica desta tese. Rosarinho, não sei se tenho palavras que cheguem para te agradecer a contribuição para este trabalho. Na tua imensa modéstia, pensarás provavelmente que poderias ter feito mais... Não é verdade. A tua Amizade, sempre presente, e a crescer, traduziu-se

numa força que me segurou em muitos momentos maus, tu e eu sabemos, que aconteceram. As minhas lágrimas e as tuas ajudaram a lavar (e a levar) tristezas, acreditando sempre que dias melhores viriam. Esta amizade foi o que mais prezei nesta convivência, e que mais valor tem para mim. No entanto, tenho ainda de te agradecer as tuas revisões minuciosas, os teus conhecimentos laboratoriais, as tuas muitas indicações preciosas no momento de analisar e passar para o papel os resultados deste trabalho. Sem as tuas insistências, o “trauma da folha em branco” poderia ter durado mais uns tempos. Obrigado por tudo...

À memória do Professor Doutor José Manuel Gaspar Torres-Pereira, antigo Reitor e Coordenador do extinto Departamento de Engenharia Biológica e Ambiental, e até à sua partida, orientador científico deste trabalho. A ele presto homenagem, e relembro com saudade e deferência. As suas capacidades científicas, intelectuais e académicas, não equipararam com certeza as suas elevadas características morais e humanas, reconhecidas por todos os que tiveram o privilégio de com ele privar. Englobo-me no grupo dos que com ele privaram, e desculpo-me nunca ter conseguido agradecer tudo o que o Sr. Professor Torres-Pereira fez por mim, pela minha carreira académica e profissional, mas também, e ele soube-o, pela minha vida pessoal.

A todos os meus colegas e amigos do Departamento de Biologia e Ambiente, pelo excelente ambiente de trabalho, entreaajuda, companheirismo, dinamismo, animação e constante incentivo. Pela sua inestimável, infinita e valiosa amizade, tenho de agradecer em particular à Teresa, à Edna, ao Dario, ao Pereira e ao Jorge. Meus amigos, é difícil dizer tudo o que vocês mereciam por me terem recebido nos vossos corações, e com vosso prejuízo, terem ajudado em alturas menos boas, em trabalho, e em apoio. Também agradeço os momentos alegres, as anedotas, os jantares, os cafés, os chás, os lanches e almoços partilhados que fizeram parte da minha evolução. Ao Dario, em particular, agradeço o tempo que dispensaste no tratamento das imagens e da formatação final deste trabalho. Como sempre, ficou excelente, e mais uma vez surpreendeste pelo bom gosto e requinte. Não posso deixar de recordar alguém, que nos foi roubado precocemente, com quem tive o prazer de partilhar não só o gabinete, mas também a sua prestimosa, grandiosa e infindável amizade, e serviço ao próximo. Fernandes, estarás sempre na minha memória...

Aos técnicos e outros funcionários não docentes do Departamento de Biologia e Ambiente por me terem recebido de forma acolhedora e de me terem dispensado a sua amizade, e ajuda na realização dos trabalhos práticos relacionados com o serviço



docente, nas pessoas da D. Clotilde e Sr. Luís Fernando. Na investigação tenho de agradecer à Irene pelas boas horas passadas às voltas com o HPLC e com o Microtox. Agradeço ainda ao Rui Martins a sua modéstia, simplicidade, dedicação, amizade e trabalho, também com o HPLC. Ao Sr. Fraga e à D. Augusta agradeço a dedicação, companheirismo, competência, rigor, entrega e amizade que ajudaram a superar com algum prazer as muitas horas passadas nos laboratórios de Microbiologia Ambiental e de Biologia Molecular. Ajudaram também os momentos em que me fizeram companhia, ou me substituíram, para registar resultados, fora dos seus horários de trabalho, quer à noite, quer aos fins-de-semana. Obrigado D. Augusta e Sr. Fraga. Já está!...

Ao Mestre Marco Lucas agradeço o companheirismo, amizade, trabalho e dedicação com que tudo começou. O Projecto Agro, em que tive o prazer de participar com o Professor Doutor Alcides Peres, Professora Doutora Ana Sampaio e Professor Doutor Albino Dias, deu início ao que viria a ser esta tese de doutoramento. Obrigado a todos por ter tido o privilégio de trabalhar convosco em parceria. Agradeço-vos ainda a prestimosa amizade com que sempre me brindastes.

Aos colegas do Departamento de Química, Professor Doutor Francisco Peixoto e Professor Doutor Fernando Nunes. Foi um prazer trabalhar convosco e mais uma vez concluir que trabalho em equipa é melhor, em todos os aspectos, que trabalho solitário. Os conhecimentos de cromatografia do Fernando fizeram-me ultrapassar uma insegurança que de outro modo não resolveria. Ao Francisco devo a descoberta das imensas potencialidades da bioenergética mitocondrial. Para além dos conhecimentos científicos que me transmitiram, agradeço-vos ainda a amizade que me dedicaram.

Ao Professor Doutor Torres de Castro, de quem me sinto uma “protegée” e uma filha adoptada. Nunca poderei retribuir de forma adequada a imensa amizade e carinho que sempre demonstrou por mim. O meu respeito pelas suas qualidades científicas, intelectuais e académicas, que iniciou quando em 1991 foi o meu Professor de Bioquímica, cresceu e multiplicou-se exponencialmente, quando tive o privilégio de privar consigo e conhecer as suas ainda maiores e melhores qualidades pessoais. Dê-me a honra de continuar a ser meu Amigo...

Ao Professor Doutor João Coutinho agradeço os seus constantes incentivos e preocupação demonstrados durante a execução dos trabalhos desta tese. Agradeço

ainda a confiança, colaboração, leitura cuidada dos manuscritos, achegas preciosas, e principalmente a amizade com que sempre me contemplou e que continuarei a preservar.

À equipa dos Serviços de Reprografia da UTAD, pela eficácia e solicitude na composição gráfica e impressão final deste trabalho.

Aos meus Amigos que não trabalham comigo, mais antigos e mais recentes. Coíbo-me de indicar os seus nomes pois sei que eles sabem quem são, e acredito, estiveram e estarão sempre presentes nos momentos mais marcantes da minha vida. Este é um deles, e por isso tenho de vos agradecer a honra da vossa Amizade. Desculpai-me as minhas ausências e maus humores, prometo que tentarei compensar-vos...

À minha família, à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã, meus pilares na Vida... Como poderei apenas em palavras mostrar a todos, o quanto vos amo, respeito e preciso de vós? Não consigo... Sei, e peço perdão por isso, que nem sempre tive o melhor de mim para vos dar, mas foi nesses momentos que me destes o que melhor tendes de vós. Obrigado mãe por todos os momentos que roubei à tua vida, e que tu me ofereceste, também nos teus netos. Sem o teu apoio, presença constante, sacrifício, dedicação, carinho e amor nunca teria conseguido construir a minha vida, nos moldes em que a vivo hoje. Obrigado pai. Quando acreditas sem pressionar, mas em atitudes, gestos, olhares e carinhos passas a mensagem, e vês crescer o que plantaste, mostras o teu verdadeiro amor... Xana, mana, o que teria sido de mim sem ti? Nada. Metade do que sou é um reflexo de ti, e não consigo sequer pensar, que quando a escuridão passa no meu pensamento, não te tenho para me aliviar e salvar. Obrigado, por também tu teres acreditado que eu conseguiria atingir mais este objectivo. As palavras certas, ditas no momento chave, trouxeram muitas vezes a tábua de salvação dos meus muitos naufrágios.

Ao Paulo e aos meus filhos, Tomás, Francisca e Carlota. Sois a minha vida, a minha essência e fazeis parte do meu ser. Não sei ser sem vós... Tomás e Francisca, a mamã já acabou o Doutoramento. Desculpem as vezes em que este trabalho foi usado para vos roubar brincadeiras, gelados, cinema, praia, televisão...mas sabeis que vos amei cada vez mais a cada dia que passou. Não sei se serei capaz, mas tentarei compensar-vos.

Obrigado meu Deus, por tudo o que tenho e sou...



RESUMO

Portugal é um dos dez maiores produtores mundiais de azeite. Durante o processo de extracção de azeite virgem, para o qual se recorre exclusivamente a processos físicos, produzem-se grandes quantidades de águas residuais. Estas resultam da lavagem do fruto, anterior à extracção, da água de vegetação da azeitona, e de alguma água que é adicionada para facilitar a emulsão. Estas águas residuais, vulgarmente designadas por águas ruças, tornaram-se um problema ambiental especialmente nos países da Bacia Mediterrânica.

Não foi ainda estabelecido, à escala industrial, um sistema de tratamento eficiente e economicamente viável para estas águas residuais, fundamentalmente, porque são produzidas em grandes quantidades, num período curto do ano, possuem elevada carga orgânica, e apresentam teores muito elevados de compostos fenólicos e ácidos gordos. Esta tese pretende contribuir como uma abordagem de apoio ao desenvolvimento de um tratamento biológico destas águas residuais, utilizando como modelo, microrganismos adaptados do grupo das leveduras, por terem sido isolados a partir de amostras de águas ruças.

Fez-se uma caracterização físico-química e microbiológica, em simultâneo, dos efluentes gerados num lagar contínuo de três fases, durante duas campanhas oleícolas consecutivas, na Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça (CAOM). A partir das amostras microbiológicas, efectuou-se um estudo de caracterização da abundância e diversidade de espécies de leveduras deste ambiente particular. As espécies identificadas em maior número de isolados foram sujeitas a um processo de selecção. Foi escolhido um isolado de *Candida oleophila*, cujas potencialidades para remover a toxicidade das águas ruças se revelaram mais adequadas aos objectivos. A caracterização físico-química serviu para estabelecer os parâmetros que melhor reflectiram as propriedades de cada fluxo de subproduto formado e que permitiram distinguir os tipos de efluentes gerados.

Concluiu-se que as águas de lavagem (AL) são significativamente diferentes das águas da centrífuga vertical (DEC) e das águas ruças (AR). As águas de lavagem têm menor carga orgânica, pH mais elevado e teores mais elevados de oxigénio dissolvido, comparativamente com os valores registados nas águas ruças, para os mesmos parâmetros. A Carência Química de Oxigénio (CQO), Carbono Orgânico Dissolvido (COD), teores em potássio (K) e teores em fósforo (P) revelaram ser os mais adequados para caracterizar os fluxos de efluentes gerados na CAOM. A caracterização microbiológica permitiu concluir que as águas residuais de lagares de azeite apresentam uma elevada abundância de microrganismos, que incluem bactérias, fungos filamentosos e leveduras. As populações de leveduras e fungos filamentosos revelaram estar mais adaptados ao ambiente estudado, pois a sua abundância diminuiu menos quando as condições ambientais se tornaram mais desfavoráveis.

Nas águas de lavagem as espécies identificadas, correspondentes a um maior número de isolados, foram a *C.oleophila* e *Metshnikowia aff. fructicola*. Nas águas ruças as espécies mais abundantes foram a *C.oleophila* e a *C.pomicola*. Por terem sido identificadas em maior

número de isolados, e a partir de amostras das águas ruças, as leveduras identificadas de *C.oleophila* e *C.pomicola* foram avaliados em ensaios de degradação de compostos fenólicos. O melhor isolado desses ensaios preliminares foi seleccionado, de acordo com as capacidades registadas em utilizar vários compostos fenólicos hidroxilados e metoxilados, para destoxificar amostras de água ruça esterilizada, não diluída e não suplementada. A diminuição da toxicidade da água ruça foi verificada na germinação de sementes, na bioluminescência de bactérias, e na bioenergética mitocondrial.

Concluiu-se que o isolado seleccionado de *C.oleophila* após um mês de incubação, promoveu uma remoção de 50% da carga orgânica das águas ruças (em termos de CQO), e 83% do teor em polifenóis totais, revelando boas capacidades depurativas. Foi ainda capaz de diminuir a toxicidade das amostras de água ruça tratada (ARt) na germinação de sementes de *Lepidum sativum*, aumentando o Índice de Germinação até 32% utilizando ARt diluída, comparativamente com a mesma diluição usando ARnt. Concluiu-se ainda que a ARt diminuiu a toxicidade da AR em cerca de 50% na inibição da bioluminescência em *Vibrio fischerii*. O teste de inibição da bioluminescência revelou ser mais sensível para avaliar a toxicidade de um efluente do que o teste de germinação. Quanto aos efeitos ao nível da bioenergética mitocondrial, concluiu-se que a acção da *C.oleophila* diminuiu o efeito tóxico provocado pelas águas ruças nos complexos respiratórios. Com base nos resultados obtidos, e no caso da succinato desidrogenase, o IC₅₀ obtido mostrou uma diminuição da toxicidade superior a 50%, quando se usou a ARt. Para além do efeito tóxico sobre este complexo, verificou-se ainda um efeito deletério da água ruça sobre a ATPase. Utilizando a ARt, os valores de IC50 revelaram uma diminuição na toxicidade superior a 50%.

Dadas as elevadas potencialidades demonstradas pelo isolado utilizado nos ensaios de destoxificação das águas ruças, bem como com outros tipos de efluentes, patenteou-se em co-autoria, um processo de depuração de efluentes agro-industriais com elevado teor de compostos aromáticos, que tem como base a aplicação do isolado seleccionado com este trabalho de tese.

Palavras-Chave: águas residuais, águas ruças, bactérias, bioluminescência, caracterização físico-química, caracterização microbiológica fungos filamentosos, indice germinação, lagares de extracção de azeite, leveduras, toxicidade de efluentes, tratamento biológico.



ABSTRACT

Portugal is one of the ten largest producers of olive oil. During the extraction process of virgin olive oil, exclusively done by mechanical processes, high amounts of residual waters are produced. These result from the washing of the fruit prior to extraction, from the vegetation water of the olives and some water that is added during the emulsifying process. These residual waters commonly referred to as Olive Mill Wastewaters (OMW), became an important environmental problem, especially in countries of the Mediterranean Basin.

Considering industrial application of well established treatment systems, none of them has proved to be efficient and economically profitable to be applied broadly. The factors usually pointed out as responsible for that are related with high amounts of organic load, together with high concentrations of phenolic compounds and fatty acids that characterize these wastewaters. This thesis pretends to contribute with a new approach to develop biological treatment systems, using model organisms, like yeasts, isolated from samples of OMW.

A simultaneous physico-chemical and microbiological characterization of OMW was done during two olive harvest campaigns, in a cooperative continuous extraction mill, of the Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça (CAOM). The results obtained in the microbiological characterization were used to study the abundance and diversity of the yeast community of this particular environment. The species identified in a higher number of isolates were used in a selection process. An isolate, identified as *Candida oleophila*, was selected to remove the toxicity of OMW samples. The physico-chemical characterization was used to establish the parameters that adequately reflected the wastewaters characteristics, and were able to distinguish between wastewater flows produced in the studied olive mill.

It has been concluded that the washing waters (OWW) were significantly different from the waters of the vertical centrifuge (CWW) and of olive mill wastewaters (OMW). The wastewaters from OWW had lower values of organic matter, higher pH values and higher values of dissolved oxygen, comparatively to the values registered for the same parameters in OMW. Chemical Oxygen Demand (COD), Dissolved Organic Carbon (DOC), potassium (K) and phosphorus (P) values measured in the waters, have shown to be the physico-chemical parameters most adequate to characterize the residual water flows generated in the cooperative (CAOM). The microbiological characterization showed that the olive mill wastewater flows had high abundances in microorganisms, which include bacteria, filamentous fungi and yeasts. The filamentous fungi and yeast populations revealed to be more adapted to the studied environment, since their counts were less affected by the more unfavourable environmental conditions.

In the OWW samples, the highest number of isolates was identified as *Candida oleophila* and *Metshnikowia aff. fructicola* species. In the OMW samples the most abundant species were *Candida oleophila* and *Candida pomicola*. Due to the fact that the species of *C.oleophila* and *C.pomicola* were identified in isolates obtained from OMW samples, and were, simultaneously, the most abundant identified species, their abilities in degrading several

phenolic compounds were tested in different assays. The isolate that showed the best performance was selected to detoxify samples of sterilized, non supplemented and non diluted OMW samples. The effect of the isolate in removing some of the OMW toxicity was evaluated using germination tests, bioluminescence assays, and effects in the mitochondrial bioenergetics.

The results obtained lead to the conclusion that the selected *C.oleophila* isolate, after one month incubation period, was able to remove about 50% of the organic matter (COD) and 83% of the total polyphenols content. The isolate was able to lower the toxicity of treated olive mill wastewater (OMWt) in the germination of *Lepidum sativum* seeds. The Germination Index (GI) increased up to 32% using diluted OMWt, comparatively with the same dilution using untreated olive mill wastewater (OMWnt). It was also concluded that the OMWt decreased OMW toxicity for about 50% in *Vibrio fischerii* bioluminescence. This inhibition test was more sensitive to evaluate the toxicity of the effluents than the germination test. As for the effects in mitochondrial bioenergetics, it was concluded that the growth of the *C.oleophila* isolate in OMW decreased the toxic effect in respiratory complexes. Based in the registered results, and for succinate dehydrogenase, the IC_{50} calculated, showed that incubation of SMP with treated decreased the toxicity more than 50%. Besides the toxic effect verified to this complex, it was also detected a deleterious effect caused by OMWnt on the ATPase. Using treated OMW, the IC_{50} values revealed a decrease in toxicity higher than 50%.

Due to the good abilities shown by the isolate used in the detoxification assays of OMW, and also showed in other types of effluents with high concentrations of phenolics or aromatic compounds, the author of this thesis in collaboration with other inventors, patented a process for depuration of agro-industrial wastewaters with high contents of aromatic compounds, that is based in the application of the isolate selected with this work.

KEYWORDS: bacteria, biological treatment, bioluminescence, effluents toxicity, filamentous fungi, germination index, microbiological characterization, olive mill wastewaters, olive mill, physico-chemical characterization, residual waters, yeasts.



OBJECTIVOS E PLANO GERAL DA TESE

A produção mundial de azeite tem sofrido nas últimas duas décadas um incremento significativo. As razões fundamentais prendem-se com o aumento do consumo desta gordura vegetal, como consequência da adesão cada vez maior à chamada dieta mediterrânica, comprovadamente com benefícios para a saúde humana.

A agro-indústria de extracção de azeite gera grandes quantidades de subprodutos. Destes, alguns podem ser revalorizados, fundamentalmente com aplicações energéticas, mas um dos efluentes – água ruça – não tem, até ao momento actual, uma reutilização economicamente viável. Estas águas têm-se revelado um problema ambiental grave, pois apresentam um elevado teor poluente e são geradas em grandes quantidades, num período muito curto do ano. Os efeitos das águas ruças prendem-se com a elevada carga orgânica que caracteriza estes efluentes, bem como com a presença de substâncias que apresentam capacidades fitotóxicas e antimicrobianas – compostos fenólicos, taninos e ácidos gordos voláteis.

Vários tipos de tratamento têm vindo a ser alvo de investigação pela comunidade científica, cujo objectivo é encontrar uma forma eficiente e economicamente viável de resolver este problema ambiental. O conhecimento adequado da tipologia físico-química destes efluentes bem como das quantidades geradas é fundamental para decidir sobre a melhor opção tecnológica de tratamento.

Partindo deste quadro, o trabalho que se apresenta pretende dar um contributo para a resposta às questões assinaladas nos parágrafos anteriores. Assim, os objectivos desta tese são:

- I – Caracterizar física e quimicamente os efluentes líquidos gerados por um lagar cooperativo de extracção de azeite em regime contínuo de três fases localizado na região de Trás-os-Montes e Alto Douro;
- II – Determinar os parâmetros físico-químicos que possam caracterizar de forma adequada os tipos de efluentes gerados num lagar de extracção de azeite;
- III – Caracterizar as populações microbianas dos efluentes líquidos gerados pelo lagar em estudo e estabelecer quais os parâmetros físico-químicos que mais as afectam ao longo do processo de extracção de azeite;

IV – Isolar e identificar estirpes de leveduras que apresentem características de adaptabilidade e resistência às condições de toxicidade típicas dos efluentes líquidos gerados pelos lagares de azeite;

V – Testar a capacidade destoxicante de isolados de leveduras obtidos das águas ruças, nomeadamente na remoção do efeito tóxico dos compostos fenólicos;

A tese é constituída por seis capítulos. No **primeiro capítulo** apresenta-se uma perspectiva geral relativa à produção de azeite e azeitona no mundo, referindo as zonas mais significativas e dando ênfase à produção portuguesa. Refere-se também, de forma genérica, a quantidade de águas ruças produzidas a nível mundial e em Portugal. Estabelecem-se ainda as diferenças fundamentais entre as tipologias de lagares para extracção do azeite, bem como os subprodutos gerados por cada tipo de lagar. Finalmente, apresenta-se de forma breve, em que consiste o processo de extracção, para que melhor se compreenda como e em que fases de extracção se geram os diferentes subprodutos.

No **Capítulo Dois** mostra-se a caracterização física e química dos efluentes líquidos gerados no lagar em estudo. Para esta caracterização fizeram-se recolhas dos diferentes locais onde são gerados efluentes líquidos durante duas campanhas sucessivas de extracção de azeite – campanhas 2003/2004 e 2004/2005. As recolhas foram efectuadas no início, meio e final das campanhas, em três locais distintos: na água de lavagem das azeitonas, na água que sai da centrífuga vertical após a separação de fases, e na água depositada numa bacia logo após a separação de fases. Os parâmetros medidos foram analisados estatisticamente, para identificar aqueles que mais se correlacionam com a origem do efluente, de forma a obter o menor número de parâmetros possível, capaz de identificar de forma acurada o tipo de efluente que é gerado.

As amostras que foram recolhidas para a caracterização físico-química serviram simultaneamente para fazer a caracterização microbiológica dos efluentes, cujos resultados se apresentam no **Capítulo Três**. Para esta, as amostras de efluentes recolhidas nos mesmos locais, e nas mesmas campanhas, foram inoculadas em meios de cultura selectivos, para os grupos microbianos: heterotróficos totais, fungos filamentosos e leveduras. Esta experiência teve como objectivo estabelecer a dimensão das populações, determinar as suas abundâncias relativas, não só umas em relação às outras no mesmo local, como também a sua variação ao longo da cadeia de extracção de azeite. Ainda no mesmo capítulo, através de análise multivariada, estabelecem-se correlações entre as contagens microbianas e os parâmetros físico-



químicos determinados, no sentido de identificar que características dos efluentes mais influenciam o número de microrganismos que se encontram nestas águas ruças.

As populações de leveduras obtidas nos ensaios anteriores foram sujeitas a um trabalho posterior de agrupamento baseado em técnicas de tipagem molecular. O grupo isolado a partir das águas com teores mais elevados de poluição foi sujeito a técnicas moleculares para identificação taxionómica. Os resultados obtidos por estas técnicas apresentam-se no **Capítulo Quatro**. Este grupo microbiano apresentou números elevados e uma grande diversidade biológica, revelando interessantes capacidades de adaptação às águas ruças. Dos isolados com maior representatividade, encontrados após o processo de identificação foram seleccionados alguns para ensaios de degradação de efluentes simulados e reais.

No **Capítulo Cinco** apresentam-se os resultados dos ensaios de degradação e utilização de compostos fenólicos como fonte de carbono e energia, realizados com os isolados obtidos anteriormente. Identificaram-se estirpes capazes de metabolizar diferentes substâncias fenólicas frequentemente encontradas nas águas ruças. A estirpe que apresentou maior eficiência foi usada em ensaios de destoxificação de águas ruças “inteiras”. Um isolado de *Candida oleophila*, espécie encontrada em todas as amostras de efluentes gerados no lagar onde se efectuou este trabalho, foi usado para destoxificar amostras de águas ruças. Os seus efeitos foram verificados em termos de redução da carga orgânica, variação do teor fenólico no meio de cultura, e na avaliação da toxicidade em processos de germinação, bioluminescência e bioenergética mitocondrial.

Finalmente no **Capítulo Seis** apresentam-se as conclusões gerais que se obtiveram com este trabalho, bem como o grau de consecução dos objectivos propostos. Apresentam-se ainda algumas linhas de investigação a seguir em trabalhos futuros.

PUBLICAÇÕES

No âmbito desta tese foram publicados ou encontram-se em preparação para publicação os seguintes trabalhos:

Amaral C, Lucas MS, Coutinho J, Crespí AL, Anjos MR, Pais C. (2008). "Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal". *Bioresource Technology*, **99**, 7215-7223.

Amaral C, Anjos MR, Pais C (2009). "Bioremediation of Olive Mill Wastewaters with Fungi". *Invited Review, in Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*. (aceite para publicação).

Amaral C, Lucas MS, Anjos MR, Pais C (2009). "Characterization of Yeast Populations of Olive Mill Wastewaters from a Continuous Olive Mill". *Microbiological Research* (em preparação).

Amaral C, Anjos MR, Pais C (2009). "Biodegradation of model phenolics of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*". *Bioresource Technology*. (em preparação).

Amaral C, Peixoto F, Nunes F, Anjos MR, Pais C (2009). "Biodegradation and detoxification of olive mill wastewaters by a wild isolate of *Candida oleophila*". *International Biodegradation and Biodeterioration*. (em preparação)

Patentes:

M Lucas, Ja Peres, **C Amaral**, A Sampaio, Aa Dias. "Processo Biológico Aeróbio De Tratamento De Efluentes Agro-Industriais Com Elevado Teor Em Compostos Aromáticos Baseado Na Aplicação De Microrganismos Da Espécie *Candida Oleophila*". P. PAT Nacional 103 738, 13 de Agosto de 2009.



ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xi
Objectivos e Plano Geral da Tese	xiii
Publicações	xvi
Capítulo 1 – Introdução Geral	
1. A fileira oleícola	3
1.1. Produção de azeite no Mundo	4
1.2. Produção de azeite em Portugal	6
2. Extracção do azeite	7
2.1. Limpeza, pesagem, moenda e termobatedura	9
2.2. Extracção por prensagem – lagares tradicionais de prensas	10
2.3. Extracção por centrifugação – Lagares contínuos	11
2.3.1. Lagares contínuos de duas fases – lagares ecológicos	12
2.3.2. Lagares contínuos de três fases	14
3. Sub-produtos da Fileira Oleícola e problemática ambiental associada	14
3.1. Águas residuais dos lagares de prensas	18
3.2. Águas residuais dos lagares ecológicos	21
3.3. Águas residuais dos lagares contínuos de três fases	24
Capítulo 2 – Caracterização físico-química das águas residuais de um lagar contínuo de três fases	
1. Introdução	29

2. <i>Material e Metodologia</i>	32
2.1. <i>Amostragem</i>	32
2.2. <i>Parâmetros Analisados</i>	33
2.3. <i>Análise Numérica</i>	35
3. <i>Resultados e Discussão</i>	35
3.1. <i>Caracterização físico-química das águas de lavagem (AL)</i>	35
3.1.1. <i>Análise estatística dos resultados das AL</i>	39
3.2. <i>Caracterização físico-química das águas da centrífuga vertical (DEC)</i>	40
3.2.1. <i>Análise estatística dos resultados das águas da DEC</i>	42
3.3. <i>Caracterização físico-química das águas ruças</i>	44
3.3.1. <i>Análise estatística dos resultados das águas ruças</i>	46
3.4. <i>Análise geral das relações entre os parâmetros físico-químicos</i>	48
4. <i>Conclusões</i>	54

Capítulo 3 – Caracterização microbiológica das águas residuais de um lagar contínuo de três fases

1. <i>Introdução</i>	57
2. <i>Material e Metodologia</i>	59
2.1. <i>Amostragem e Contagem de Microrganismos</i>	59
2.2. <i>Análise Numérica</i>	60
3. <i>Resultados e Discussão</i>	60
3.1. <i>Caracterização microbiológica das águas de lavagem</i>	60
3.2. <i>Caracterização microbiológica das águas da centrífuga vertical</i>	62
3.3. <i>Caracterização microbiológica das águas ruças</i>	63
3.4. <i>Correlações estatísticas entre parâmetros microbiológicos e parâmetros físico-químicos</i>	65



4. Conclusões	69
Capítulo 4 – Isolamento e caracterização das leveduras das águas residuais do lagar contínuo de três fases	
1. Introdução	73
2. Material e Metodologia	76
2.1. Obtenção dos isolados	76
2.2. Extracção de DNA	76
2.3. Tipagem molecular por PCR	77
2.4. Sequenciação da região D1/D2 da subunidade 26S do DNAr	78
2.5. Análise Numérica	79
3. Resultados e Discussão	80
3.1. Diversidade das leveduras nas águas residuais do lagar de azeite	80
3.1.1. Água de Lavagem	80
3.1.2. Centrifuga Vertical	84
3.1.3. Águas Ruças	86
3.2. Identificação dos isolados	88
3.3. Análise de todos os isolados de leveduras obtidas nas campanhas de extracção	91
4. Conclusões	97
Capítulo 5 – Tratamento de águas ruças por uma estirpe de Candida oleophila isolada de águas residuais de um lagar contínuo de três fases	
1. Introdução	101
2. Material e Metodologia	104

2.1. <i>Microorganismos</i>	104
2.2. <i>Águas Ruças utilizadas</i>	104
2.3. <i>Crescimento em meio com compostos fenólicos</i>	104
2.4. <i>Crescimento em águas ruças não diluídas e não suplementadas</i>	105
2.5. <i>Medição dos compostos fenólicos</i>	105
2.6. <i>Avaliação da toxicidade das águas ruças</i>	105
2.6.1. <i>Testes de germinação</i>	106
2.6.2. <i>Testes de toxicidade microbiana</i>	107
2.6.3. <i>Testes de toxicidade na bioenergética mitocondrial</i>	108
2.7. <i>Análise Numérica</i>	109
3. <i>Resultados e Discussão</i>	109
3.1. <i>Seleccção de isolados de leveduras de águas residuais de lagares de azeite por crescimento em meios ricos em compostos fenólico</i>	109
3.2. <i>Caracterização do isolado de Candida oleophila</i>	111
3.3. <i>Crescimento do isolado de Candida oleophila em meios com compostos fenólicos como única fonte de carbono e energia</i>	113
3.4. <i>Metabolismo celular dos compostos fenólicos no isolado selvagem de Candida oleophila</i>	116
3.4.1. <i>Metabolismo celular dos orto-difenóis no isolado de C.oleophila</i>	116
3.4.2. <i>Metabolismo celular dos ácidos fenolcarboxílicos no isolado de C.oleophila</i>	117
3.4.3. <i>Metabolismo celular dos ácidos fenilpropenóides no isolado de C.oleophila</i>	120
3.4.4. <i>Metabolismo celular de compostos fenólicos com substituintes metoxilo no isolado de C.oleophila</i>	122
3.5. <i>Avaliação da toxicidade de águas ruças tratadas após incubação com o isolado de C.oleophila</i>	127
3.5.1. <i>Caracterização físico-química da água ruça antes e após o</i>	



<i>tratamento com Candida oleophila</i>	127
<i>3.5.2. Caracterização dos compostos fenólicos presentes nas amostras de águas ruças antes e após tratamento com o isolado de Candida oleophila.</i>	130
<i>3.5.3. Efeito do tratamento de águas ruças com Candida oleophila na germinação de sementes de Lepidum sativum</i>	135
<i>3.5.4. Efeito do tratamento das águas ruças com Candida oleophila no metabolismo de Vibrio fischerii</i>	141
<i>3.5.5. Efeito do tratamento das águas ruças com Candida oleophila na bioenergética mitocondrial</i>	144
<i>4. Conclusões</i>	150
Capítulo 6 – Considerações Finais	155
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas	163



Capítulo

1

Introdução Geral

1. A Fileira Oleícola

A oliveira, *Olea europaea* L., pertence à família das Oleaceae, que abrange centenas de espécies, maioritariamente árvores e arbustos das regiões temperadas e paleotropicals. É uma árvore rústica, de grande longevidade e com folha persistente. A sua fácil propagação por via vegetativa permitiu que o seu cultivo se mantivesse ao longo dos séculos (Monteiro, 1999). As origens do cultivo desta árvore perdem-se no tempo, sendo mais ou menos consensual que terá surgido na bacia do Mediterrâneo, tendo-se espalhado a regiões da África, Península Ibérica e restante Sul da Europa por sucessivas civilizações que ocuparam a região (Bacelar, 2006).

O seu fruto, a azeitona, é uma drupa de mesocarpo carnudo (polpa), rico em lípidos. O pericarpo (película epidérmica) apresenta variação de cores de acordo com a variedade e estado de maturação da azeitona, que vão desde o verde pálido ao negro, passando pelo violáceo ou roxo. O endocarpo (caroço) é duro, estriado e mais ou menos pontiagudo, podendo perfazer até 30% do peso total do fruto. A forma é geralmente ovóide e o seu tamanho e peso variam muito, desde pequeno (1,9 g) até muito grande (> 8 g) (Figura 1.1).

O elevado teor em lípidos na polpa do fruto permite rendimentos em azeite de 14% a 28% do seu peso. Para além dos lípidos, o mesocarpo é maioritariamente constituído por água ($\approx 75\%$), açúcares, proteínas, pectina, ácidos orgânicos, taninos, oleuropeína, antocianinas e sais minerais (Monteiro, 1999). A colheita do fruto está dependente do fim a que se destina (azeite ou azeitona de mesa), da variedade, das condições climáticas e dos meios de apanha a utilizar (manual ou mecanizada). No entanto, o período de maturação do fruto corresponde, normalmente, ao intervalo de tempo entre os meses de Novembro até Fevereiro.

A popularidade recente, e ainda crescente, da oliveira como produção agrícola está relacionada com o aumento da procura dos seus produtos, nomeadamente o fruto, e o azeite que se extrai do mesmo, devido aos comprovados benefícios que têm para a saúde humana (Saldanha, 1999; Tuck e Hayball, 2002; Perona *et al.*, 2006). O baixo ratio ácidos gordos saturados versus ácidos gordos insaturados, associado à presença de antioxidantes naturais, coloca a azeitona e o azeite como produtos capazes de prevenir algumas doenças que afectam a população humana. Nestas, incluem-se a prevenção das doenças coronárias e arteriosclerose, particularmente devido ao efeito dos compostos fenólicos, potentes antioxidantes naturais, também responsáveis pela adstringência e acidez do azeite (Visioli *et al.*, 2002; Caturla *et al.*, 2005).

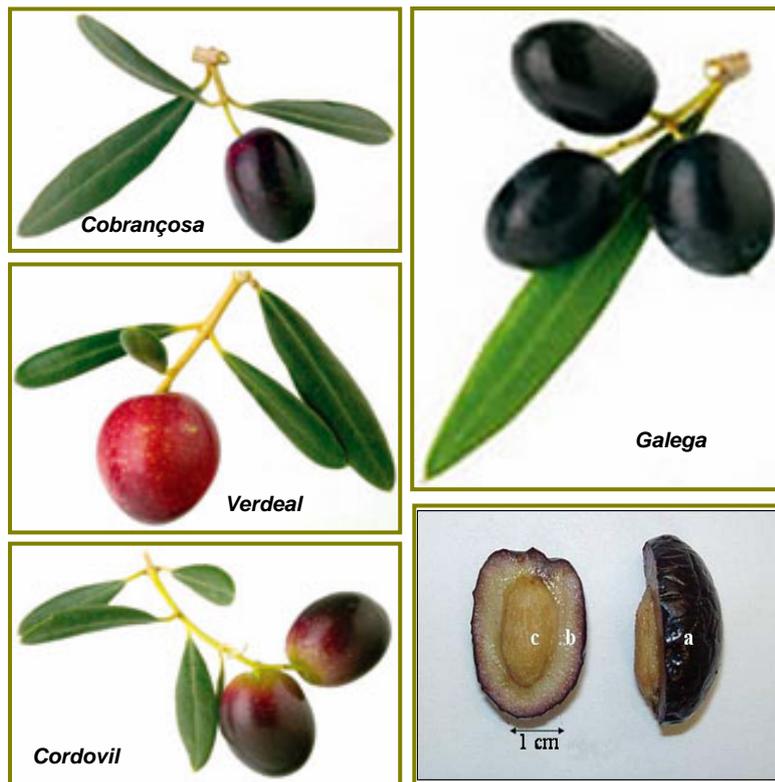


Figura 1.1. – Azeitona, de diferentes cultivares. Aspecto do interior do fruto e principais elementos constituintes (a – pericarpo, b – mesocarpo, c - endocarpo).

A nível mundial, nos últimos 20 anos o consumo desta gordura vegetal aumentou mais de 50%, tendo atingido as 60 mil toneladas em 2002. O consumo *per capita* em 1995 ultrapassou os 5,4 kg/hab/ano, rondando os 5,8 kg/hab/ano entre 1998-2002 (GPPAA, 2007).

1.1. Produção de azeite no Mundo

A oliveira tem o seu habitat preferencial nas regiões com clima de tipo mediterrânico, caracterizado por verões quentes e secos. A maior parte do património olivícola mundial concentra-se na região da Bacia Mediterrânica (Monteiro, 1999) mas, nos últimos 500 anos, o cultivo da oliveira estendeu-se a outros continentes, nomeadamente às Américas, África do Sul, Austrália, China e Japão (Connor, 2005). No entanto, Espanha, Itália, Grécia, Turquia, Tunísia, Síria, Marrocos e Portugal, todos países da Bacia Mediterrânica, são os maiores produtores mundiais de azeite, perfazendo mais de 90% de toda a produção (FAOSTAT, 2007) (Figura 1.2.).

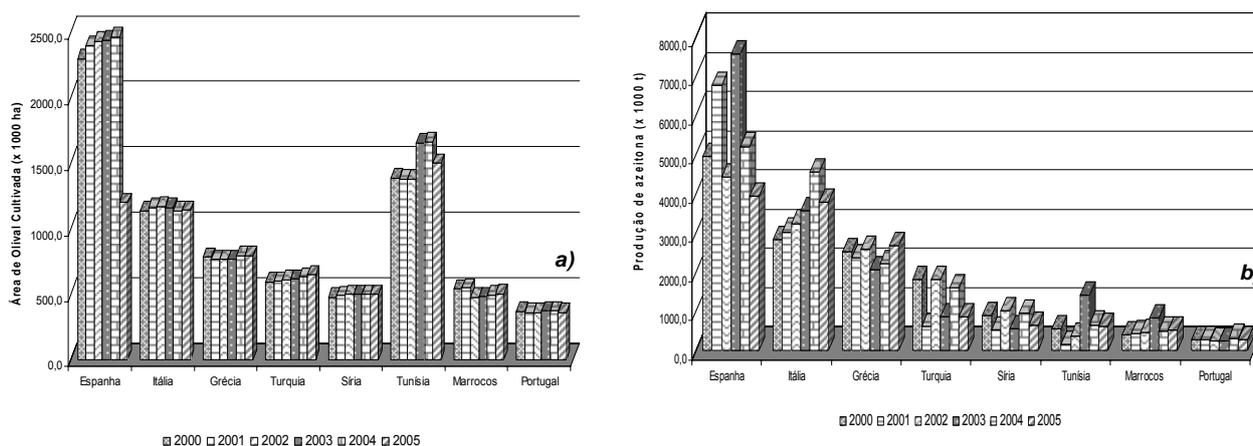


Figura 1.2. – (a) Área de olival e (b) produção de azeitona (x 1000t) desde 2000 até 2005, pelos principais países produtores (Fonte: FAOSTAT, 2007).

Na década de 90, a produção mundial de azeite atingiu quase os 2 milhões de toneladas, valores que ascendem, nos primeiros anos do século XXI, a mais de 2,2 milhões de toneladas. O escoamento deste produto tende também a aumentar, pela substituição de outros óleos vegetais por azeite, fundamentalmente pelos benefícios que aporta à saúde humana.

A lista dos principais países produtores de azeite difere pouco da lista dos principais consumidores desta gordura vegetal. A exceção faz-se para os Estados Unidos da América (EUA), que consomem cerca de 5% de todo o azeite produzido (Monteiro, 1999).

Em 2000, a superfície olivícola da União Europeia (UE) representava 4% da superfície agrícola utilizável (aproximadamente 5 milhões de hectares), dos quais 48% em Espanha e 22,5% em Itália. A produção comunitária lidera o mercado mundial, embora a Tunísia, a Síria e Marrocos tenham atingido valores de produção, em algumas campanhas, equivalentes a 25% da produção comunitária e 20% da produção mundial. As exportações comunitárias em 2000/2001 atingiram as 290 000 toneladas, sobretudo de azeite envasilhado, para países como os EUA, Japão, Canadá e Austrália. Até à integração da Grécia, Espanha e Portugal, a UE era um importador líquido. A partir destas entradas, assumiu um papel fulcral no comércio mundial de azeite. Esta mudança teve como consequência a evolução das políticas de incentivo ao cultivo da oliveira, que hoje se centra fortemente na melhoria da qualidade do produto, e no incentivo aos agricultores para corresponder ao desejo dos consumidores. O orçamento da política comum de mercado no sector do azeite excede os 2 300 milhões de euros anuais (CEDGA, 2002).

Pode considerar-se que a área de olival no mundo se mantém estabilizada, dado que as tendências são de equilíbrio entre a produção e o consumo, à semelhança do que já acontece no sector da azeitona de mesa. Há, no entanto, alterações previsíveis quanto aos níveis de produção nos próximos anos, principalmente devido ao Plano Oleícola de Marrocos, que pretende instalar novos olivais com uma área total de ocupação de 435 000 hectares até 2020, e devido às primeiras produções de olivais novos (5 anos) em Espanha, que ascendem a mais de 160 000 hectares, bem como à introdução de novos olivais em zonas facilmente mecanizáveis e irrigáveis, como nos EUA, México e Argentina (Monteiro, 1999). Considerando estas circunstâncias, será de perspectivar um ambiente altamente competitivo a nível mundial.

1.2. Produção de azeite em Portugal

Sendo dos principais produtores mundiais de azeite, Portugal tem, na olivicultura, um factor de importância significativa para o país, não só do ponto de vista económico, mas também do ponto de vista social nas regiões produtoras, devido à sua ligação às condições naturais das zonas, sendo os olivais mais valias patrimoniais, paisagísticas e culturais.

Os dados mais recentes disponíveis relativamente à produção de azeite e azeitonas de mesa em Portugal reportam à campanha de 2004/2005. Nesse período, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), a área de olival para azeite ascendia a 363 839 ha, sendo as regiões produtoras mais representativas Alentejo e Trás-os-Montes (Figura 1.3.).

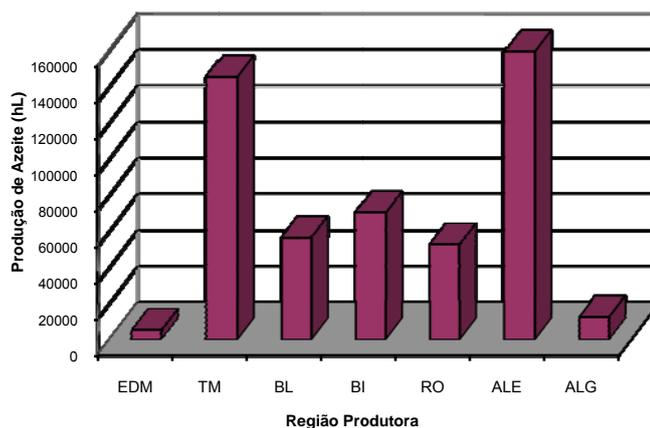


Figura 1.3. – Produção de azeite em Portugal, relativa à campanha 2004/2005, por regiões produtoras (adaptado de GPPAA, 2007). (EDM – Entre Douro e Minho, TM – Trás-os-Montes, BL – Beira Litoral, BI – Beira interior, RO – Ribatejo e Oeste, ALE – Alentejo, ALG – Algarve)

A produção de azeite representou um volume médio de negócios anual (entre 2002 e 2004) de 65 milhões de Euros. Relativamente à campanha anterior, aumentou em cerca de 37%, tendo-se processado 500 658 hL de azeite de boa qualidade. Em Portugal, a quase totalidade de azeitona laborada é transformada em lagares reconhecidos pelo INGA, persistindo ainda alguns lagares tradicionais que laboram pequenas quantidades (ENEAPAI, 2007). O número de lagares de azeite em Portugal diminuiu de cerca de 1100 em 1995, para pouco mais de 600 em 2004 (GPPAA, 2007). Num relatório recente da Agência de Controlo das Ajudas Comunitárias ao Sector do Azeite (ACACSA) prevê-se uma estabilização deste número de lagares nos próximos anos (ENEAPAI, 2007). Este facto não se traduziu numa diminuição da eficiência produtiva que, pelo contrário, aumentou, essencialmente porque desapareceram muitos lagares tradicionais de apenas um proprietário, sendo substituídos por lagares de maiores dimensões, com maior capacidade elaboradora e tendencialmente cooperativos (GPPAA, 2007).

Esta reestruturação traduziu-se num aumento da quantidade de azeitona que é laborada por lagar, sendo os maiores valores registados no Alentejo e Ribatejo e Oeste. Desde 1990 até à campanha de 2004/2005 verificou-se um aumento de 6% do número de lagares contínuos de duas fases, e de 12% de lagares contínuos de três fases. Nos dados disponíveis relativos à campanha de 2004/2005, Portugal Continental laborou 303 mil toneladas de azeitona, originando mais de 46 mil toneladas de azeite. As regiões Alentejo e Trás-os-Montes concentram mais de 56% de azeitona laborada e mais de 61% do azeite obtido (Figura 1.4.).

No que diz respeito à informação ambiental, dos 1253 lagares identificados pelas Comissões de Coordenação Regionais (CCDR) e pelo Instituto da Água (INAG), apenas cerca de 40% dispõem de informação sobre licenças de descarga para rejeição das águas residuais, seja em linha de água ou no solo, e 12% estão indicadas como ligadas a colectores municipais (ENEAPAI, 2007).

2. Extracção do Azeite

A extracção de azeite nas unidades processadoras está muito dependente do tipo de sistema utilizado. Actualmente, e no caso particular de Portugal, apesar de ainda se manter o processo tradicional de prensas em muitos lagares, os olivicultores sentiram, a partir da campanha de 2001/2002, dificuldades em conseguir certificar as suas unidades para obtenção de ajudas comunitárias à produção de azeite. Estas unidades, criadas há várias décadas, estão equipadas com materiais e equipamentos mais ou menos obsoletos e desgastados. Servem, essencialmente, para produzir pequenas quantidades de azeite, principalmente para consumo próprio. Os proprietários

destas unidades não possuem capacidade económica para fazer face às novas exigências de mercado, não tanto no que diz respeito à qualidade do azeite produzido mas, fundamentalmente, no que se refere às normas de higienização na produção, bem como ao destino final dos subprodutos gerados. No que diz respeito a estes últimos, as exigências governamentais relativas à disposição e tratamento de efluentes (DL nº 243/2001, Despacho Conjunto nº 626/2000 do Ministério da Agricultura e Ministério do Ambiente) terão, como maior consequência, o progressivo desaparecimento deste tipo de unidades extractoras, já visível na redução sucessiva, campanha após campanha, de lagares registados.

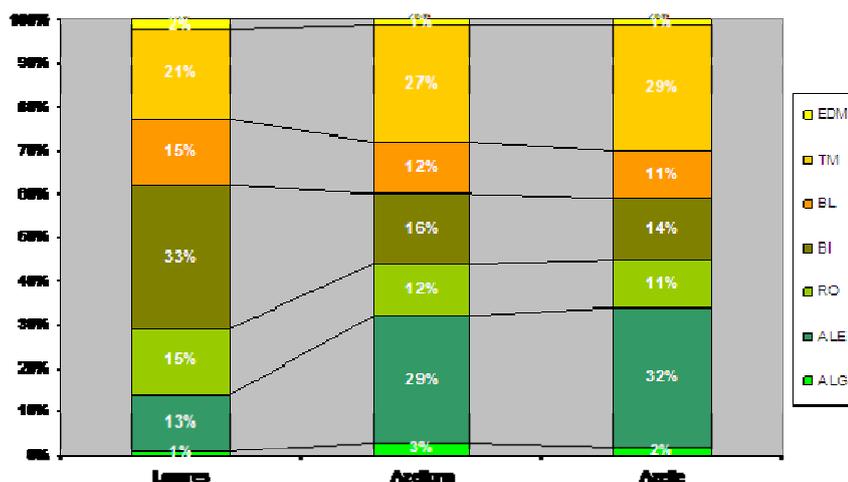


Figura 1.4. – Distribuição, por regiões, do número de lagares, azeitona laborada e azeite obtido na campanha de 2004/2005 (ENEAPAI, 2007) (EDM – Entre Douro e Minho, TM – Trás-os-Montes, BL – Beira Litoral, BI – Beira interior, RO – Ribatejo e Oeste, ALE – Alentejo, ALG – Algarve).

A maior parte dos olivicultores e/ou associações de olivicultores dos países mediterrânicos (cerca de 90% na Grécia, Itália e Espanha) utilizam o sistema de centrifugação contínua. Em Portugal ainda existem muitos lagares de prensas (63%) e só nas regiões de Trás-os-Montes e Alentejo é que predominam os lagares contínuos (52% e 70%, respectivamente) (ENEAPAI, 2007).

Nos sistemas contínuos incluem-se os que geram no final três fases (azeite, bagaço e água ruça) e os chamados lagares ecológicos que geram apenas duas fases (azeite e “alpeorujo”) (Sampedro *et al.*, 2004). Estes últimos são largamente utilizados em Espanha e “alpeorujo” é a designação espanhola, cujo significado em português será lamassa. Neste trabalho usar-se-ão as duas designações.

Apesar de frequentemente serem referidos três tipos de lagares – contínuos de duas fases, contínuos de três fases e descontínuos (de prensas), na realidade o



processo de laboração só difere na etapa de separação das fases (Peres, 2001). As operações anteriores a esta são comuns a todos os tipos de lagares. Na Figura 1.5. mostram-se, de forma resumida, os passos fundamentais para a obtenção do azeite.

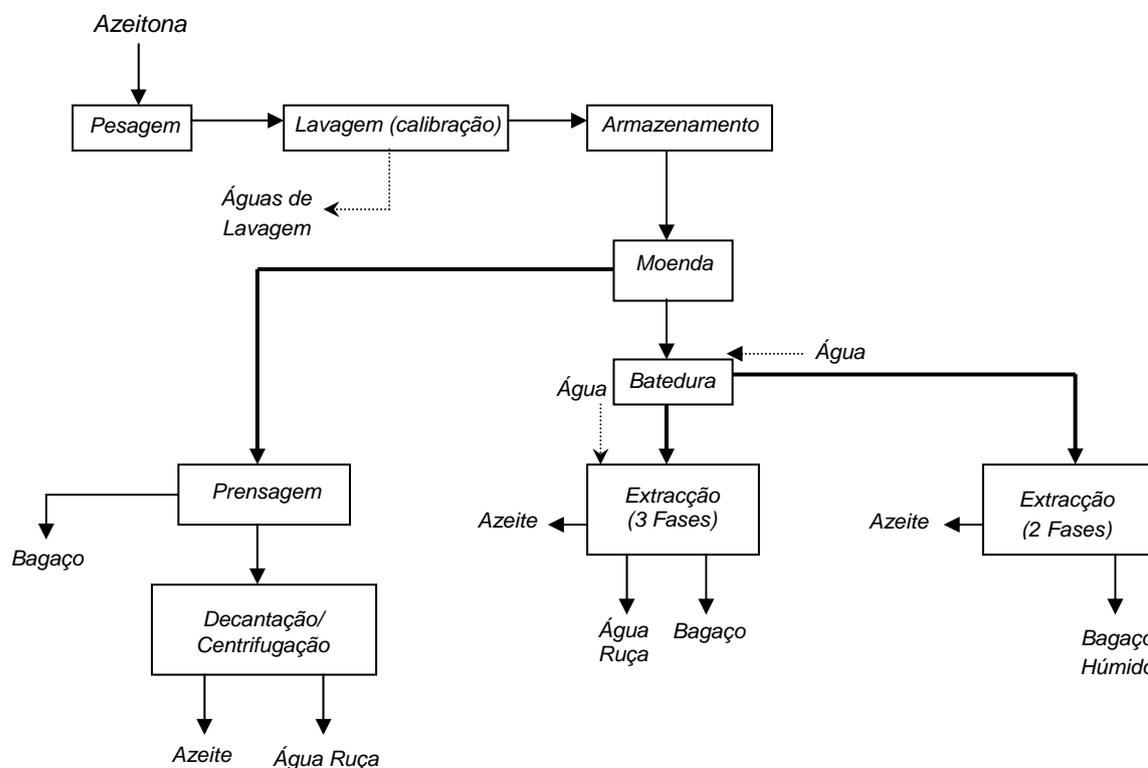


Figura 1.5. – Sequência das operações unitárias no processo de extração do azeite (Peres, 2001).

Referir-se-á, de seguida, em que consistem basicamente as operações físicas a que são sujeitas as azeitonas para a extração do azeite.

2.1. Limpeza, Pesagem, Moenda e Termobatedura

Após a recolha e transporte da azeitona para o lagar, as primeiras fases correspondem à pesagem, limpeza e armazenamento do fruto, do que resulta uma azeitona limpa e pronta a ser processada. Destas operações, gera-se um efluente líquido constituído pela água da lavagem, alguns sólidos sedimentáveis e matéria orgânica em concentrações variáveis que dependem, fundamentalmente, do estado de maturação e sanidade do fruto, bem como da sua proveniência (do chão e/ou da árvore) (Peres, 2001).

O fruto armazenado é, depois, enviado para a moenda e termobatedura, cujos objectivos são a preparação da pasta a partir da qual se separarão as fases. Na

operação de moenda (ou moagem), a drupa é esmagada, promovendo a ruptura das células da polpa em cujo citoplasma se encontra o azeite. Esta operação pode ser efectuada em moinhos de rolos ou moinhos metálicos. Os primeiros, mais comuns em lagares de pequenas dimensões, são formados por uma base circular (geralmente de granito) sobre a qual giram rolos cónicos ou cilíndricos (galgas), esmagando o fruto por pressão e deslizamento, com rotações de aproximadamente 15 revoluções por minuto (rpm).

Os moinhos metálicos, mais eficientes e, como tal, mais usados em explorações de grandes dimensões como os lagares associativos, possuem uma cruzeta onde se inserem os martelos, envolvida por um crivo (camisa). Ao girar a elevada velocidade, os martelos golpeiam a azeitona e a pasta sai através das perfurações do crivo. A pasta formada é enviada para a termobatedura, cuja função é formar uma fase oleosa contínua, com gotículas de gordura de maiores dimensões, que facilitam a sua separação das outras fases da pasta. Para tal, as termobatedeiras são constituídas por um depósito de capacidade variável (consoante as necessidades de produção da unidade extractora), vertical ou horizontal, de acordo com o eixo de rotação das pás que se encontram a girar no seu interior. O objectivo destas pás, que giram a velocidades entre 15 e 18 rpm, é voltear a massa. Esta operação realiza-se a temperaturas moderadas (entre 25 e 28°C) que são mantidas na batedeira através da circulação exterior ao depósito, de água de aquecimento, que geralmente circula numa camisa que envolve o mesmo (Gouveia, 1995).

O tipo de processo utilizado para a extracção influenciará algumas das propriedades físico-químicas apresentadas pelas águas residuais. Como tal, apresenta-se, de seguida, os principais aspectos que caracterizam o processo de extracção propriamente dito, a jusante das operações já referidas.

2.2. Extracção por Prensagem – Lagares tradicionais de prensas

Este sistema de extracção, o mais antigo, é ainda utilizado nos pequenos lagares de azeite e em alguns lagares de maiores dimensões que foram modernizados. Com a natural evolução dos sistemas agrícolas, as antigas prensas de discos, de vara ou parafuso foram substituídas por prensas hidráulicas (Figura 1.6.), mais eficientes e que exigem menor esforço, oferecendo um maior rendimento.

A pasta preparada nas operações anteriores é colocada em camadas finas sobre discos de material filtrante denominados vulgarmente capachos ou ceiras, que se dispõem em pilhas, uns sobre os outros, ao longo de um fuso que alberga um número diferente de filtros, consoante a sua dimensão e a grossura da pasta depositada em cada capacho. Esse fuso é depois sujeito a pressão, por mecanismo hidráulico, que

espreme os discos. O mosto oleoso (constituído por azeite e alguma água) escorre pelos capachos, separando-se da fase sólida que fica retida, sendo recolhido e enviado para a fase seguinte, que tem como objectivo retirar a água que ainda está presente em emulsão com a matéria gorda. A decantação é a forma tradicional usada para fazer esta separação. No processo, reconhecendo-se as diferenças de densidade entre o azeite e a água, o mosto oleoso é depositado em decantadores – “tarefas”. Aqui o azeite fica à superfície, sendo removido. A água (ruça), mais densa, permanece no fundo – “infernos” (Peres, 2001).

Obtido assim o azeite, resta armazená-lo e, se for caso disso, embalar e comercializar.

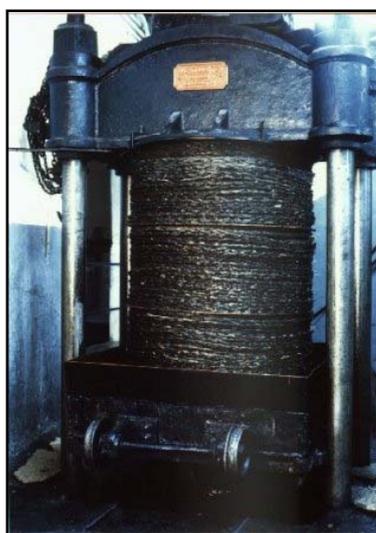


Figura 1.6. – Fotografia de prensa hidráulica utilizada nos lagares tradicionais para espremer a polpa das azeitonas e extrair o azeite.

2.3. Extração por Centrifugação – Lagares Contínuos

O sector oleícola, com tradições centenárias na Bacia do Mediterrâneo, manteve-se tecnologicamente inalterado até ao início dos anos 70, com o aparecimento do sistema de centrifugação de três fases (Albuquerque *et al.*, 2004). Através deste processo, o azeite e a água de vegetação podem ser separados de forma contínua, isto é, a injeção da pasta e a separação das fases são efectuados sem ser necessária a paragem da máquina separadora – centrifuga horizontal (decanter) (Peres, 2001).

Pela sua maior eficiência e rapidez ao laborar, em pouco tempo, grandes quantidades de pasta de azeitona, este processo de extração tornou-se o mais usado nos países com maior produção de azeite, especialmente nas agro-indústrias de maiores dimensões (Sayadi *et al.*, 2000; Albuquerque *et al.*, 2004; Giannoutsou *et al.*, 2004), particularmente em Espanha, Itália e Grécia, sendo que em países em

desenvolvimento, como Marrocos ou Tunísia, é ainda vulgar o processo tradicional (Mouncif *et al.*, 1993).

O sistema de extracção por centrifugação, propriamente dito, baseia-se na diferente densidade apresentada pelas fases da pasta de azeitona quando sujeitas a uma velocidade de rotação no interior de um tambor horizontal – centrífuga horizontal/decanter. A centrífuga possui, no interior, um parafuso sem-fim a girar mais rapidamente do que o tambor exterior, promovendo forças distintas que actuam de forma diferente sobre os componentes da pasta, separando assim o bagaço, de densidade mais elevada, a água ruça, de densidade intermédia e o azeite, de menor densidade.

Devido às dimensões do decanter, a força centrífuga aplicada (3000-4000 rpm) não é muito elevada e, como tal, a separação não é perfeita. Para ultrapassar esta dificuldade, vulgarizou-se a utilização, a jusante do decanter, de uma centrífuga vertical a operar a velocidades mais elevadas (6000-7000 rpm), que permite a separação entre o azeite e a fase aquosa (Peres, 2001).

2.3.1. Lagares contínuos de duas fases – lagares ecológicos

Sendo a bacia do Mediterrâneo responsável por mais de 90% da produção mundial de azeite (Sayadi *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, pela produção de quantidades imensas de águas ruças, o tratamento e deposição final destes efluentes tornaram-se um problema ambiental grave (Albuquerque *et al.*, 2004). Nas várias tentativas de reduzir o impacto causado por estas águas, foi desenvolvido e comercializado, a partir de 1992, um novo sistema de extracção por centrifugação, denominado lagar ecológico ou de duas fases (Borja *et al.*, 2002; Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004; Giannoutsou *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004; Pelillo *et al.*, 2006).

Nos lagares ecológicos, a centrífuga horizontal em vez de apresentar ao longo do tambor três saídas de líquidos (uma para o azeite, uma para o bagaço e outra para a água ruça), apresenta apenas duas. Assim, obtêm-se como produtos finais da centrifugação, o azeite e um subproduto, que resulta da mistura da água ruça com o bagaço, gerando um efluente bastante aquoso denominado “**bagaço húmido**” ou “**lamassa**” em Portugal e “**alpeorujo**” em Espanha, onde estes lagares são largamente utilizados (Peres, 2001; Borja *et al.*, 2002, 2006). O bagaço húmido final resulta da mistura das águas de lavagem iniciais da azeitona, às quais se juntam as que saem do decanter, sendo o volume de “alpeorujo” gerado de cerca de 0,25 L/kg de azeitona processada (Pelillo *et al.*, 2006).

As maiores vantagens apresentadas por este processo são a diminuição do resíduo produzido, já que o consumo de água é reduzido substancialmente (ver Figura



1.7.), bem como um maior rendimento em azeite e um menor consumo de energia (Albuquerque *et al.*, 2004; Borja *et al.*, 2006; Giannoutsou *et al.*, 2004).

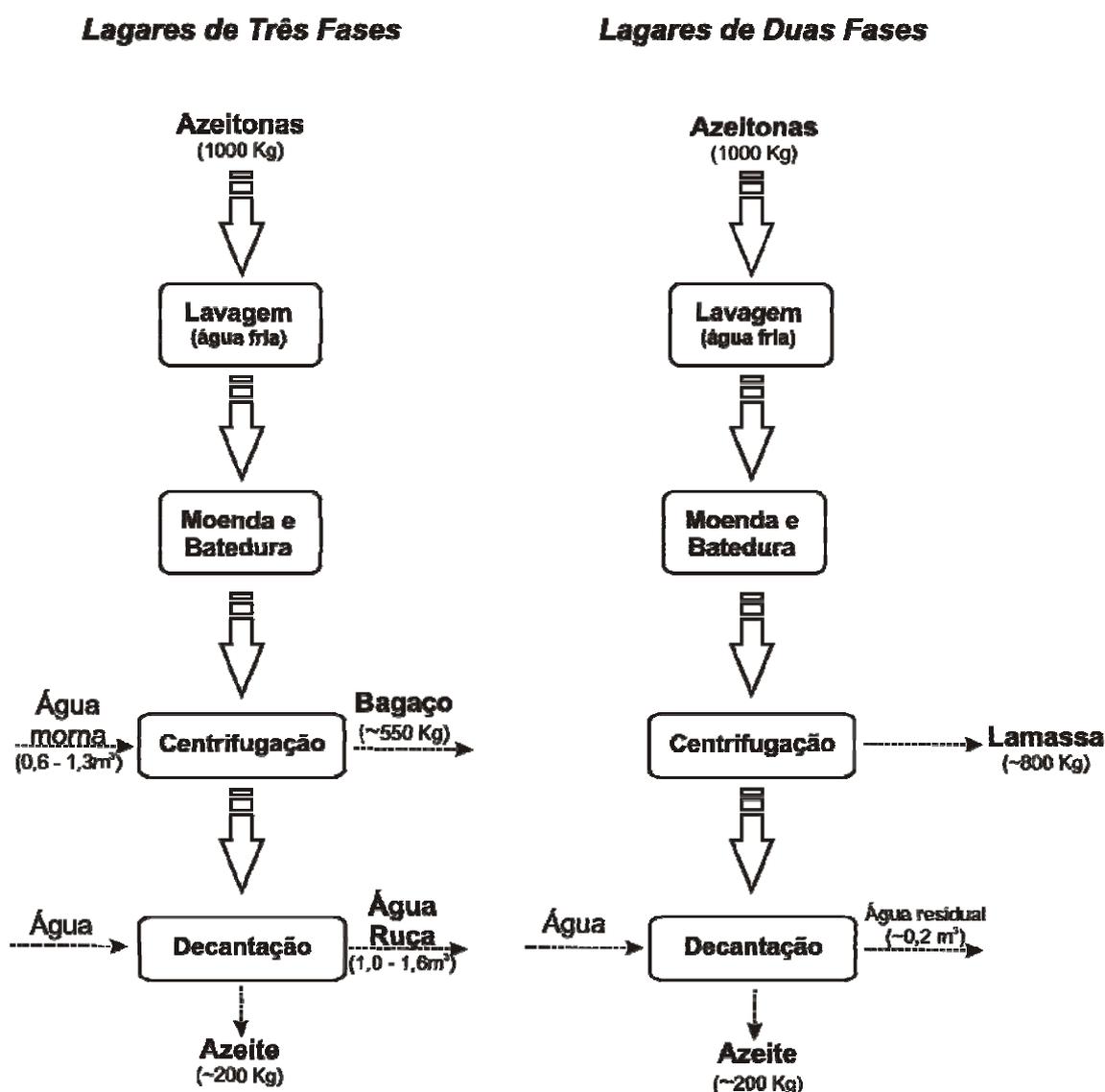


Figura 1.7. – Esquema comparativo dos dois sistemas de extração contínua por centrifugação actualmente em uso (adaptado de Albuquerque *et al.*, 2004).

A maior desvantagem advém do facto do tratamento posterior do “alpeorujo” gerado ser pouco rentável, mesmo para as refinarias de óleos, devido à grande quantidade de água que possui na sua constituição, que onera o transporte desde os lagares até às refinarias, bem como o seu armazenamento, uma vez que deve ser depositado em grandes bacias por longos períodos de tempo (Balis *et al.*, 1996; Arjona *et al.*, 1999).

2.3.2. Lagares contínuos de três fases

À excepção de Espanha, que como já se referiu utiliza maioritariamente a centrifugação com sistemas de duas fases, os restantes países produtores de azeite fazem a extracção recorrendo ao processo contínuo de três fases. Neste, para além do azeite, geram-se dois fluxos de subprodutos: uma massa com pouca água – **bagaço** – constituída, fundamentalmente, por resíduos de polpa e pelo caroço da azeitona, e um efluente de coloração castanha mais ou menos escura, vulgarmente designado por **água ruça** (Sierra *et al.*, 2001; Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004; D’Annibale *et al.*, 2006; Pelillo *et al.*, 2006).

Em Trás-os-Montes e Alto Douro, na campanha de 2004/2005 a extracção em regime contínuo fez-se em 52% dos lagares registados e destes, apenas 15% usaram o sistema de três fases ou misto, tendo os restantes usado já o sistema de duas fases.

3. Subprodutos da Fileira Oleícola e problemática ambiental associada

Os subprodutos gerados pela indústria oleícola estão dependentes do tipo de sistema usado na extracção do azeite. Para além deste facto, as características particulares de cada tipo de subproduto gerado está dependente de outros factores. Far-se-á uma reflexão sobre os sub-produtos que são gerados quer nos lagares de prensas, quer nos lagares que utilizam a extracção em sistema contínuo. Estes tornaram-se, nas duas últimas décadas, um dos maiores problemas ambientais dos países da bacia do mediterrâneo, o qual urge resolver rapidamente.

O **bagaço**, originado pela extracção em sistema contínuo de três fases e nos sistemas descontínuos, é formado pela polpa e caroço do fruto. Contém ainda entre 25 e 50% de humidade e 5 a 7% de azeite. Este subproduto é, em termos ambientais, um mal menor pois é, frequentemente, usado pelas indústrias de extracção de óleo de bagaço (Cabrera Capitán, 1995). Depois de seco, extrai-se o óleo de bagaço, de forma economicamente viável e o subproduto utiliza-se como combustível (Arjona *et al.*, 1999). Quando se faz a separação do caroço, aumenta a eficiência de extracção do óleo, permitindo uma utilização posterior da polpa para produção de alimento animal (Aguilera *et al.*, 1986) ou como aditivo orgânico na compostagem, misturada com outros subprodutos agrícolas (Ramos Ayerbe, 1986). Os caroços, para além de combustível, podem usar-se para fabrico de carvões, carvões activados e furfural (Ramos Suria, 1986).

O “**alpeorujo**” ou **lamassa** é o subproduto gerado pelos lagares contínuos de duas fases. É constituído por uma mistura sólido-líquido formada pelo caroço, polpa do fruto, e ainda água de vegetação da azeitona. Para além de elevadas proporções de



água (cerca de 65%), possui ainda 2,5 a 3,5% de óleos residuais (Giannoutsou *et al.*, 2004; Borja *et al.*, 2006), apreciáveis quantidades de celulose e hemicelulose (18 a 20%), lenhinas (13 a 15%) (Albuquerque *et al.*, 2004, Sampedro *et al.*, 2004) e outra matéria orgânica que inclui açúcares, ácidos gordos voláteis, poli-alcoóis, proteínas, polifenóis e outros pigmentos (Borja *et al.*, 2002, 2006). Este resíduo, cuja produção é de aproximadamente 800 kg por tonelada de azeitona processada (Albuquerque *et al.*, 2004; Giannoutsou *et al.*, 2004), devido às suas elevadas proporções de água, apresenta um volume de 0,25 metros cúbicos por tonelada de azeitona (Pelillo *et al.*, 2006). Em termos ambientais, a produção é menor comparativamente com os volumes de águas residuais geradas com o sistema contínuo de três fases.

Nos sistemas de extracção contínuos e nos lagares descontínuos (de prensas), para além do bagaço, originam-se **águas ruças**. Estas correspondem ao conjunto de efluentes líquidos que incluem água de vegetação da azeitona, água de lavagem dos frutos e a água que é adicionada durante a extracção propriamente dita. Este efluente líquido apresenta uma coloração e cheiro que variam com o tempo. Assim, quando “fresca”, apresenta uma coloração avermelhada (ruça) e cheiro idêntico ao do azeite, mas com o decorrer do tempo, a coloração passa a castanho muito escuro ou preto, e o cheiro torna-se fétido (Cabrera Capitán, 1995). Estas características são consequência da sua composição e da ocorrência de processos de degradação biológica, particularmente em anaerobiose. A composição das águas ruças é extremamente variável e os factores que a influenciam incluem o processo de extracção, as condições edafo-climáticas, a variedade da cultivar de azeitona utilizada, grau de maturação do fruto, condições e período de armazenamento. De uma forma genérica, as águas ruças são maioritariamente constituídas por água (83 a 94%), matéria orgânica (4 a 16%) e sais minerais (0,4 a 2,5%) (Ramos-Cormenzana, 1996). As características mais referidas a respeito deste efluente prendem-se com o seu carácter poluente, nomeadamente porque apresenta valores de carga orgânica elevados e presença de compostos como fenóis, responsáveis pela sua cor, que lhes conferem propriedades antimicrobianas e fitotóxicas, inibindo particularmente a germinação (Capasso *et al.*, 1995; Paixão *et al.*, 1999; Casa *et al.*, 2003).

O sistema de extracção em contínuo utiliza água que é adicionada durante o processo, podendo variar de 500 a 2 000 L por tonelada de azeitona (Scioli e Vollaro, 1997; De Marco *et al.*, 2007). Este líquido, juntamente com o da água de vegetação, origina as águas ruças. A produção deste efluente varia de 0,5 m³ a 0,8 m³ de água ruça por tonelada de azeitona, nos lagares de prensas, e até 1,1 m³ a 1,4 m³ de água ruça nos lagares com sistemas em contínuo. Um cálculo rápido, baseado nestes valores e

nos dados de produção referenciados anteriormente demonstra, claramente, que esta indústria é uma fonte persistente de poluição.

Estima-se que a produção de águas ruças a nível mundial seja superior a 30 milhões de metros cúbicos anuais (Jaouani *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2006; De Marco *et al.*, 2007) concentradas na região do mediterrâneo. Portugal produziu, na campanha de 2004/2005, 46 000 toneladas de azeite (ENEAPAI, 2007). Considerando que os processos de extracção usados são contínuos e descontínuos, a estimativa para a produção de águas ruças, no nosso país, ascende a 44 mil metros cúbicos de água residual, gerada num curto período de tempo no ano (Dezembro a Março).

Numa publicação conjunta do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP) e do Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional (MAOTDR) (ENEAPAI, 2007), onde se procuraram identificar indicadores e coeficientes de poluição para os vários efluentes de diversos sectores produtivos, verificou-se que os sectores de produção animal representam essencialmente carga em nutrientes, enquanto que nos sectores agro-industriais, como é o caso do sector lagareiro, tem maior expressão a carga orgânica. Assim, em habitantes equivalentes (HE), os resíduos da indústria oleícola representam 251 000 HE para a carga orgânica, 39 000 HE em compostos de azoto e 34 000 HE em compostos de fósforo.

No mesmo estudo foi, ainda, analisado o impacto territorial do sector lagareiro, tendo-se verificado uma pressão significativa sobre algumas bacias hidrográficas e linhas de água, bem como sobre alguns sistemas de águas residuais associados a pequenos aglomerados populacionais. As regiões hidrográficas com pressões muito elevadas correspondem às regiões do Douro, Tejo e Guadiana, obviamente relacionadas com as regiões do país com maiores produções de azeitona e azeite (Figura 1.3.). Estas observações permitiram estabelecer zonas de acção para eliminar/minimizar o efeito ambiental deste e de outros sectores produtivos, usando vários critérios para delimitar as zonas. Assim, estabeleceram-se 5 núcleos de acção, correspondentes a 29 concelhos nacionais que, na campanha 2004/2005, laboraram 60% da azeitona produzida (Tabela 1.1.) (ENEAPAI, 2007).

Os dados apresentados demonstram a necessidade urgente de encontrar uma forma integrada, eficiente e, preferencialmente, pouco dispendiosa de eliminar os resíduos da indústria oleícola. Estes esforços foram iniciados no nosso país em 1997, quando a Confederação dos Agricultores Portugueses (CAP) e o Estado Português celebraram os então designados Contratos de Adaptação Ambiental (CAA), através dos quais os lagareiros se comprometiam, voluntariamente, e de forma faseada, ao cumprimento da legislação ambiental. Uma das formas encontradas para minimizar o



efeito destes efluentes, reutilizando-os, foi estabelecida em 2000 com publicação do Despacho Conjunto nº 626/2000 (MADRP e MAOTDR), ainda não revogado, que prevê a aplicação das águas ruças nos solos agrícolas, impondo, no entanto, algumas normas para a sua correcta aplicação. Destas, sobressaem a necessidade da emissão condicionada de uma licença, que considera aspectos como a existência de um reservatório, para armazenar a totalidade das águas ruças produzidas durante a campanha até, pelo menos, ao mês de Março, e a necessidade de realizar um pré-tratamento que vise a correcção do pH. Cumpridas estas condições, a utilização no solo só deve ser feita em culturas arbustivas ou arbóreas e à quantidade máxima de 80 m³/ha ano, tendo, como condicionantes, a proximidade a zonas de Reserva Ecológica Nacional (REN), poços, furos, linhas de água ou habitações (Despacho Conjunto 626/2000).

Conhecendo a realidade geográfica de Portugal Continental, a produtividade em azeitona nas diferentes regiões do país, as condicionantes socio-económicas e populacionais, bem como as tipologias de lagares de extracção das regiões com maiores produções destes efluentes, fica claro que este tipo de solução não é facilmente aplicável nas cinco zonas de acção prioritária referidas na Tabela 1.1. Efectivamente, o lagar cooperativo onde foi efectuado o estudo que se apresenta, encontra-se na região transmontana, cujas condições geográficas não são adequadas, na sua maioria, a este tipo de reutilização. A busca de soluções de tratamento deve passar por outras tipologias de intervenção, como as referenciadas no documento “Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais” elaborado pelos Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional, e Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas (2007). Nestas, prevê-se o desenvolvimento de soluções, quer individuais, quer colectivas, tendo-se considerado, no entanto, que para o sector oleícola, as mais adequadas serão do tipo individual, à excepção de situações muito pontuais e núcleos específicos.

A escolha da intervenção adequada passará pela utilização dos meios técnicos e conhecimentos científicos disponíveis e dependerá dos recursos económicos de cada entidade envolvida. Para tal, o conhecimento correcto e actualizado das quantidades e características do efluente produzido, bem como da localização da unidade relativamente a linhas de água e estações municipais de tratamento de efluentes domésticos, permitirá uma escolha adequada. Por razões já referidas anteriormente, que se prendem com a grande variabilidade de características apresentadas pelas águas ruças, far-se-á uma descrição sobre o que se encontra publicado na bibliografia relativamente às propriedades físico-químicas dos efluentes produzidos por cada

tipologia de lagar, bem como algumas tecnologias disponíveis para o tratamento destes efluentes.

Tabela 1.1. – Núcleos de acção prioritária para o desenvolvimento de estratégias de resolução dos problemas ambientais do sector lagareiro (adaptado de ENEAPAI, 2007)

Núcleos	Azeite		Lagares por Núcleo		Concelhos	Informação Ambiental
	Produzido/Núcleo		Nº	%		
	Kg	%				
A	10 544 700	23	89	15	Valpaços, Mirandela, Macedo Cavaleiros, Vila Flor, Vila Nova Foz Côa, S. João Pesqueira, Bragança, Torre de Moncorvo, Alfandega da Fé, Mogadouro	50% Unidades identificadas; 54% ligação a colector municipal; 46% realiza tratamento ou pré-tratamento
B	2 468 500	5	82	14	Castelo Branco, Fundão, Proença-a-Nova	70% Unidades identificadas; maioria espalha efluentes nos solos agrícolas; 15% ligação colector municipal
C	3 920 200	8	85	14	Santarém, Alvaiázere, Ourém, Torres Novas, Abrantes, Tomar, Ferreira do Zêzere	70% Unidades identificadas; maioria espalha efluentes nos solos agrícolas; 12% ligação colector municipal
D	4 840 000	10	17	17	Crato, Sousel, Estremoz, Elvas, Portalegre	100% Unidades identificadas; maioria ligação colector municipal
E	6 650 500	14	16	16	Moura, Serpa, Vidigueira, Beja	100% Unidades identificadas; maioria rejeita efluentes em linha de água

3.1. Águas residuais dos lagares de prensas

Como já foi referido, da produção de azeite a partir do sistema de prensas resultam, para além do azeite, o bagaço retirado dos capachos após prensagem e a água ruça resultante da separação por decantação, à qual é normalmente adicionada a água de lavagem da azeitona.

O bagaço, que contém a película e a polpa de azeitona, bem como o caroço, e ainda alguma matéria gorda (8 a 10%) apresenta algum valor comercial. Pode submeter-se a extracção de óleos através de solventes, que são depois refinados e ainda, uma vez que apresenta elevado poder energético, depois de seco, pode ser queimado. Em muitos lagares serve para o aquecimento da água da termobatedeira.

Quanto à água ruça, o seu valor económico é praticamente nulo, tornando-se um problema ambiental, a ser resolvido pelos lagareiros. É consensual, nas publicações científicas disponíveis, que as características físico-químicas destas águas e a sua grande variabilidade estão dependentes de numerosos factores: variedade de azeitona, tipo de solo, sistema de cultivo, grau de maturação do fruto, tempo de armazenamento do fruto e sistema de extracção usado, sendo este último o que mais influencia a composição da água ruça (Cabrera Capitán, 1995; Fiorentino *et al.*, 2003).



Numerosos estudos têm sido publicados mostrando que estas águas, de uma forma geral, e comparativamente com as geradas pelos outros sistemas de extracção, são mais concentradas (Pereira, 1992; Hamdi, 1993; Paixão *et al.*, 1999). Efectivamente, em média, o processamento de azeitona neste tipo de lagar gera entre 0,5 m³ a 0,8 m³ de água ruça por 1000 kg de azeitona processada, em oposição aos 1,1 m³ a 1,4 m³ de água ruça por 1000 kg de azeitona no sistema contínuo (Pereira, 1992; Ursinos e Padilla, 1992; Hamdi, 1993; Paixão *et al.*, 1999; Vitolo *et al.*, 1999), o que confirma a maior concentração de substâncias no efluente deste tipo de extracção.

A Tabela 1.2. mostra alguns dados publicados por diversos autores e que se reportam a águas ruças de lagares tradicionais.

É possível concluir, da análise da mesma tabela, que as águas ruças de lagares descontínuos apresentam um carácter ácido e possuem grandes quantidades de matéria orgânica, quer sob a forma de sólidos suspensos, quer sob a forma dissolvida.

No que se refere ao seu potencial poluidor, frequentemente com alusão à carga de Carência Química de Oxigénio (CQO) e/ou Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), os valores de CQO oscilam entre 75,86 e 224,1 g/L (média ≈ 133,1 g/L), mostrando, mais uma vez, a grande diversidade de valores obtidos, que depende de factores externos às medições propriamente ditas, referidos anteriormente. É importante perceber o que significa determinado resíduo apresentar uma carência de oxigénio elevada. Assim, para o caso desta média, significa que para oxidar este efluente seriam necessários 133,1 g de oxigénio dissolvido num litro de água. Considerando que o oxigénio dissolvido (OD) na água a 15°C ronda os 10 mg/L, seriam teoricamente necessários 13 300 L de água para depurar um litro deste efluente (Dias, 2004).

É de salientar também a presença, em quantidades significativas, de substâncias que têm sido apontadas como tóxicas a vários níveis biológicos, nomeadamente os polifenóis e taninos. Efectivamente, Fiorentino e colaboradores (2003), ao testarem o efeito deste efluente, considerando-o como um todo, e das suas frações, obtidas a partir do mesmo por vários métodos de separação, verificaram que todos os compostos apresentaram um forte potencial de toxicidade, quer em algas e rotíferos, quer em crustáceos, normalmente presentes nos meios hídricos receptores.

Por outro lado, devido à presença de quantidades significativas de nutrientes como azoto (N), fósforo (P), potássio (K) e magnésio (Mg) (Hamdi, 1993), têm sido realizadas inúmeras tentativas de utilizar este efluente na irrigação em agricultura, particularmente em regiões áridas e semi-áridas, onde é prática comum, em substituição de água pura (Angelakis *et al.*, 1999).

Este tipo de procedimento está legislado no nosso país, tal como já referido, através do Despacho Conjunto nº 626/2000 do MADRP e MAOTDR, onde é referida a

possibilidade de irrigação dos campos agrícolas com águas ruças previamente depositadas em bacias de evaporação, na dose de 80 m³/ha/ano de Março a Novembro. No entanto, num estudo publicado recentemente por Mekki *et al* (2006) foi concluído que não devem ser excedidos os 50 m³/ha/ano, sob pena de aumentar a salinidade do solo, e recomendam o tratamento terciário de polimento das águas ruças, de forma a reduzir a sua toxicidade e manter a actividade máxima da microflora dos solos.

Tabela 1.2. – Características físico-químicas apresentadas por amostras de águas ruças de lagares descontínuos.

Parâmetros	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]
pH	4,5- 5,0	4,5- 5,0	5,2	5,2	4,8	5,5	4,7/5,1	4,7	4,8	4,7
Cor	-	-	-	-	-	82,0 (abs ₃₉₅)	-	-	-	21,2 (abs ₄₆₅)
Densidade	-	-	-	1,03 g/L	-	-	-	1,06 g/L	-	-
Alcalinidade	-	-	-	-	-	-	-	9,1 gCaCO ₃ /L	-	-
Condutividade	-	-	-	-	-	8,7 dS/m	29,5/16,4 mS/cm	18,6 mS/cm	-	-
Salinidade	-	-	-	-	-	5,9 g/L	-	11,9 g/L	-	-
CQO (gO ₂ /L)	120- 130	120- 130	124	191,1	86,4	117	131,7	224,1	75,86	130,5
CBO (gO ₂ /L)	90- 100	90- 100	-	-	-	34,4	-	98,2	-	-
Óleos e Gorduras (g/L)	0,5- 1,0	0,5- 1,0	-	-	4,4	9,2	-	6,5	3,6	-
Polifenóis	-	-	8,2 gác.tânico/L	-	10,4 mg/L	9,2 g/L	11,5/9,6 gcatequina/L	64,8 gác.tânico/L	8,9 mg/L	4,0 g/L
Taninos e Lenhinas	-	-	-	-	7,2 g/L	-	-	-	5,9 g/L	-
Açucares solúveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1 g/L
Sólidos totais (g/L)	120	120	92,4	-	96,4	11,4 (% cinzas)	15,8/24,8	-	90,2	49,7
Sólidos suspensos (g/L)	1,0	1,0	-	27,9	5,4	8,9	-	4,9	-	1,8
N Kjeldhal (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,3
N amoniacal (mg/L)	-	-	150	-	-	-	-	60	-	31
N orgânico (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	0,77	-	-
N total (g/L)	-	-	-	-	0,7	1,6	-	-	0,63	-
C orgânico (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	103,1	-	-
Fósforo (g/K)	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
Fosfatos (g/L)	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-

[1] Ursinos e Padilla, 1992; [2] Hamdi, 1993; [3] Fadil *et al.*, 2003; [4] Vitolo *et al.*, 1999; [5] Rosa e Vieira, 1995; [6] Mekki *et al.*, 2006; [7] Sassi *et al.*, 2006; [8] Mouncif *et al.*, 1993; [9] Paixão *et al.*, 1999; [10] Dias, 2004.



Também Sassi e colaboradores (2006), ao testar a toxicidade de efluentes resultantes de diferentes processos de extracção, concluíram que os dos lagares tradicionais são mais tóxicos, devido ao efeito dos fenóis, que foram encontrados em concentrações muito elevadas (11,5 g/L), e à presença de metais pesados. Neste caso, mesmo com diluições inferiores de água ruça (1:2 para amostras de água de lagares contínuos e 1:4 para amostras de lagares tradicionais), a maior toxicidade foi apresentada pelas águas dos lagares descontínuos, o que estava directamente relacionado com a concentração de metais pesados, também superior nestas amostras.

Da bibliografia consultada referente a estes tipos de lagares conclui-se que, fundamentalmente devido ao pH ácido destas águas, bem como às elevadas concentrações de matéria orgânica, fenóis e taninos, e metais pesados, elas não podem ser utilizadas de forma viável (como fertilizante ou água de irrigação, por exemplo) sem serem previamente sujeitas a uma qualquer forma de tratamento (Paixão *et al.*, 1999; Vitolo *et al.*, 1999; Mekki *et al.*, 2006; Sassi *et al.*, 2006;).

É evidente que os valores medidos para os diferentes parâmetros por diferentes autores apresentam diferenças óbvias e aparentemente inesperadas. A justificação para este facto tem sido normalmente atribuída ao processo de extracção (Ursinos e Padilla, 1992; Cabrera Capitán, 1995), sendo, no entanto de salientar que outros factores poderão ser responsáveis por estas diferenças, como já referido anteriormente (Fiorentino *et al.*, 2003).

Em Portugal, com base em dados da campanha de 1994/1995, Rosa e Vieira (1995) compararam as águas ruças geradas pelos lagares tradicionais e lagares contínuos, mostrando que alguns parâmetros, tais como o pH, fenóis totais, açúcares redutores e taninos e lenhinas, não estão significativamente correlacionados com o processo de extracção. Por outro lado, gorduras, sólidos totais, sólidos suspensos, azoto (N) e CQO apresentam diferenças que podem ser atribuídas ao sistema operativo do lagar, sendo que para gorduras, sólidos totais e azoto total, os processos tradicionais apresentam valores mais elevados, passando-se o contrário com a CQO e sólidos suspensos.

3.2. Águas residuais dos lagares ecológicos

O “alpeorujo” ou lamassa é um subproduto gerado pelo sistema de extracção contínuo de duas fases, que resulta, como já referido, da junção da água ruça com o bagaço da azeitona.

O tratamento destes resíduos é difícil, à semelhança do que acontece com as águas ruças do sistema de três fases. Têm sido feitas tentativas de aplicar o “alpeorujo” como fertilizante, alimento animal, e/ou para extracção de produtos de elevado valor

(Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002; Giannoutsou *et al.*, 2004). Alternativamente, o “alpeorujo” pode ser seco e usado para cogeração de energia eléctrica. Infelizmente, surgiram alguns problemas, nomeadamente porque após a secagem, identificaram-se hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) na sua composição. Para além deste facto, a presença de açúcares dissolvidos torna o “alpeorujo” pegajoso e difícil de secar nos secadores preparados para secar o bagaço dos decanters de três fases. Estes problemas tornaram necessária a procura de alternativas de (re)utilização, tratamento e/ou armazenamento deste subproduto (Albuquerque *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004).

Apesar da produção deste tipo de resíduo ser elevada em Espanha (\approx 3,5 a 6 milhões de toneladas “alpeorujo”/ano) (Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002), poucos foram os estudos efectuados com o objectivo de caracterizar física e quimicamente o “alpeorujo”, ao contrário do verificado para as águas ruças.

Neste tipo de avaliações, a característica mais referida é o elevado teor em água (60-70%), que supera o apresentado pelo bagaço “seco” dos lagares de 3 fases (Borja *et al.*, 2002, 2006). Para além da água, apresenta lenhina (13-15%), celulose e hemicelulose (18-20%), azeite ainda retido na polpa (3%) e sólidos minerais (1,5%). Relativamente aos compostos orgânicos, os mais abundantes são os açúcares (3%), ácidos gordos voláteis (1%), poli-alcoóis (0,2%), proteínas (1,5%), polifenóis (0,2%) e outros pigmentos (0,5%) (Borja *et al.*, 2002).

Como consequência do aumento da produção deste tipo de efluentes, particularmente em Espanha, foram feitos alguns trabalhos objectivando a sua caracterização no sentido de encontrar uma solução integrada de tratamento. Na Tabela 1.3. apresentam-se algumas propriedades destes resíduos referidas em bibliografia recente.

Pela observação da Tabela 1.3, verifica-se que o bagaço húmido apresenta um teor em água, em média, superior a 60% do peso total e concentrações elevadas de matéria orgânica, com mais de 50% na forma particulada (Borja *et al.*, 2006). Com ligeiras variações, os valores de pH mantêm-se ácidos, à semelhança do que acontece com as águas ruças. Fundamentalmente devido ao seu elevado teor em água, mas também por possuir partículas de pequena dimensão, este material apresenta características, nomeadamente a sua plasticidade, porosidade e susceptibilidade à compressão, que o tornam um resíduo inadequado para determinadas reutilizações como a compostagem (Albuquerque *et al.*, 2004) ou a recuperação de óleos em refinarias, particularmente pelo facto dos secadores de lamas terem sido projectados para os bagaços gerados pelos lagares de três fases (Arjona *et al.*, 1999).



Tabela 1.3. – Características físico-químicas apresentadas por amostras de “alpeorujo” de lagares contínuos de duas fases.

Parâmetros	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]
Mistura (%peso fresco)	64	-	-	85,7	-
pH	5,3	5,3	5,8	4,9	4,9
Condutividade (dS/m)	3,4	-	-	-	-
Cinzas (g/kg)	67,4	-	-	-	-
TOC (g/kg)	519,8	-	-	-	-
CQO (gO ₂ /L)	-	-	150,3	133	10,9
CQO solúvel (gO ₂ /L)	-	-	66,5	60	8,7
Alcalinidade (gCaCO ₃ /L)	-	-	2,2	-	0,2
Sólidos Totais (g/L)	-	-	165,3	143	8,8
Sólidos Minerais (g/L)	-	-	21,1	-	-
Sólidos Voláteis (g/L)	-	-	144,2	122	7,8
Sólidos Minerais Suspensos (g/L)	-	-	15,7	-	-
Sólidos Voláteis Suspensos (g/L)	-	-	126,5	-	1,4
N Kjeldhal (g/L)	-	-	-	-	0,11
N Amoniacal (mg/L)	-	-	-	-	48
N Total (g/kg)	11,4	-	-	-	-
Razão C/N	47,8	-	-	-	-
Ácidos gordos voláteis (g/L de ácido acético)	-	-	2,9	0,9	0,2
Gorduras	121 g/kg	4,3 (p/p%)	-	-	7,1 g/L
Fenóis solúveis	14,2 g/kg	2,7 (p/p%)	2,4 g/L	-	38 mg/L
Açúcares solúveis	95,8 g/kg	2,3 (p/p%)	-	-	-
Lenhina (g/kg)	426,3	-	-	-	-
Celulose (g/kg)	193,6	-	-	-	-
Hemicelulose (g/kg)	350,8	-	-	-	-
Proteínas	71,5 g/kg	13,6 (p/p%)	-	-	-

[11] Albuquerque *et al.*, 2004; [12] Giannoutsou *et al.*, 2004; [13] Borja *et al.*, 2002; [14] Borja *et al.*, 2006; [15] Pelillo *et al.*, 2006.

Na tentativa de ultrapassar estas dificuldades tecnológicas, foram já publicados estudos relativos à degradação biológica destes efluentes. Assim, Pelillo *et al.* (2006) obtiveram reduções da CQO de 64,3% após cinco dias de digestão aeróbia, tendo desenvolvido equações modelo para a cinética da digestão, considerando que a fracção sólida e a sua hidrólise são o factor controlador de toda a cinética reaccional. Giannoutsou *et al.* (2004) apontam o “alpeorujo” como um possível fertilizante ou substrato para crescimento de cogumelos, após fermentação com leveduras adequadas. Albuquerque *et al.* (2004) fizeram uma análise detalhada das potencialidades agronómicas deste tipo de efluente, tendo verificado que, apesar de ricos em diversos nutrientes fundamentais ao solo e crescimento das plantas, apresentam nutrientes com concentrações inferiores às normalmente utilizadas nos

fertilizantes (como Fe, Cu, Zn, Mn). Referem, ainda, que apesar da aplicação destes materiais poder constituir uma forma fácil e barata de repor minerais no solo, o baixo pH, associado à presença de compostos antimicrobianos e inibidores da germinação e crescimento das plantas, bem como uma taxa C/N normalmente inadequada, não conferem ao “alpeorujo” as melhores características para uma utilização, em fresco, como correctivo orgânico do solo.

Actualmente, o método mais comum de gestão do “alpeorujo” consiste na sua deposição em bacias de evaporação, que não são mais do que buracos escavados nos terrenos próximos dos lagares. Nestes locais, por acção de condições naturais, alguns processos degradativos podem ocorrer, nomeadamente evaporação, com consequente diminuição do teor em água, e degradação, em maior ou menor extensão, de alguma matéria orgânica por acção de microrganismos que naturalmente se desenvolvem nestes habitats. Borja e colaboradores (2006) demonstraram que nas bacias de evaporação, o “alpeorujo” sofre um processo de degradação natural, durante o qual o conteúdo em água decresce linearmente com o tempo de deposição. Verificaram, ainda, a ocorrência de fenómenos de digestão anaeróbia, pela produção de metano e flutuações do teor de ácidos gordos voláteis (AGV) associados a estes fenómenos de metanogénese. Este tipo de deposição e tratamento é vantajoso relativamente a outras formas de tratamento, uma vez que é de baixo custo, e poderá ser utilizado em países em desenvolvimento ou em lagares com poucos recursos para investir em formas de tratamento mais avançadas, mas também mais onerosas.

A extracção de compostos de elevado valor a partir do “alpeorujo” poderá ser uma forma rentável de reutilizar este composto. A equipa de Fernandez-Bolaños (2002) patenteou um processo cromatográfico (PCT/ES02/00058) simples e não dispendioso, capaz de extrair hidroxitirosol de forma bastante purificada. Esta molécula apresenta propriedades antioxidantes e nutricionais muito interessantes, e as águas ruças e o alpeorujo são muito ricas neste fenol, sendo, juntamente com o tirosol, o mais abundante nestes resíduos.

Desta, ou de outras formas que continuam a ser investigadas por numerosas equipas, um resíduo aparentemente sem valor comercial, pode tornar-se uma fonte com alguma rentabilidade, diminuindo, assim, o impacto causado pelas grandes quantidades de lamassa geradas pelos lagares ditos “ecológicos”.

3.3. Águas residuais dos lagares contínuos de três fases

Como subprodutos, os lagares contínuos de três fases apresentam, para além do bagaço, um efluente líquido com elevada carga orgânica, que é libertado quando se efectua a separação de fases na centrifuga horizontal.



Este trabalho estuda em particular as características físicas, químicas e microbiológicas deste efluente e por essa razão as suas propriedades serão exploradas e discutidas nos capítulos seguintes.



Capítulo

2

*Caracterização físico-química das águas residuais de um
lagar contínuo de três fases*

1. Introdução

Em Portugal, a extracção do azeite é efectuada recorrendo, maioritariamente, ao processo de centrifugação contínuo de três fases, apesar de ainda subsistirem muitos lagares tradicionais. Como referido na Introdução Geral, o sistema contínuo de três fases, para além do azeite, origina uma massa com pouca água – **bagaço** – constituída fundamentalmente por resíduos de polpa e pelo caroço da azeitona, e um efluente de coloração castanha, vulgarmente designado por **água ruça** (Sierra *et al.*, 2001; Fernandez-Bolaños *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2004; Sampedro *et al.*, 2004; D'Annibale *et al.*, 2006; Pelillo *et al.*, 2006).

O bagaço tem algum valor comercial, pois a partir deste podem extrair-se óleos com rentabilidade financeira (Arjona *et al.*, 1999), e ainda é possível queimar o resíduo seco, que apresenta elevado poder calorífico. A água ruça, por seu lado, tornou-se um grave problema ambiental na zona mediterrânica pois ainda não foi encontrada uma forma satisfatória de solucionar todos os problemas que advêm da sua produção e armazenamento. Para os países produtores de azeite, estima-se que a produção anual de águas ruças ascenda aos 30 milhões de metros cúbicos (Hamdi, 1993; Mechichi e Sayadi, 2005; Mc Namara *et al.*, 2008), constituindo assim um problema ambiental que urge resolver. Apesar das várias tecnologias de tratamento estudadas e de alguns resultados encorajadores, as águas ruças ainda são depositadas directamente no ambiente, sem qualquer tipo de tratamento, em muitos países em desenvolvimento.

A bibliografia disponível versando a caracterização química das águas ruças é vasta. No entanto, também é grande a variabilidade encontrada nos resultados publicados, uma vez que esta está dependente de vários factores, impossíveis de controlar, como as condições climáticas, cultivares de azeitona, grau de maturação do fruto, tempo e condições de armazenamento, e procedimento de extracção (Fiorentino *et al.*, 2003).

As características que mais frequentemente são referidas na literatura para caracterizar este efluente são as que resultam da sua composição química. Assim, a carga orgânica, referida em termos de CQO (Carência Química de Oxigénio) apresenta valores muito elevados (100-200 g CQO/L) (Assas *et al.*, 2000), e uma baixa biodegradabilidade, verificada pela razão CQO/CBO (2,05-2,35) (Vlyssides *et al.*, 2004). Para além desta característica, está frequentemente associada, a este efluente, a toxicidade em relação a vários grupos de seres vivos como bactérias (Paredes *et al.*, 1987; Hamdi, 1992), sementes e plantas (Capasso *et al.*, 1992; Tsioulpas *et al.*, 2002, Casa *et al.*, 2003, Sassi *et al.*, 2006) e organismos aquáticos (Paixão *et al.*, 1999), entre outros. A toxicidade das águas ruças é atribuída à presença de compostos fenólicos em concentrações elevadas (até 10 g/L) (Martirani *et al.*, 1996, Ramos-Cormenzana *et al.*,

1996) bem como a outros compostos como taninos e lenhinas (Capasso *et al.*, 1992; Paixão *et al.*, 1999) e metais pesados (Bitton *et al.*, 1992; Sassi *et al.*, 2006).

Têm sido apresentados por diversas equipas de investigação numerosos processos para o tratamento destes efluentes, sendo bastante variável o resultado atingido. A escolha do tratamento a efectuar está dependente de vários factores, nomeadamente os relacionados com as características físico-químicas das águas ruças, a sua produção sazonal, e o fluxo de produção diário muito elevado (10 a 100 m³/dia). Os tipos de tratamento englobam processos **mecânicos, físicos, químicos, biológicos e térmicos**.

Na prática, o método de tratamento mais utilizado é a evaporação em bacias a céu aberto, dadas as condições meteorológicas favoráveis na região do Mediterrâneo, bem como o baixo investimento necessário para a sua implantação (Azbar *et al.*, 2004). A volatilização de maus odores, proliferação de insectos, necessidade de grandes áreas para a implantação das bacias, e a produção de grandes quantidades de lamas, levaram alguns investigadores a explorar a capacidade de revalorizar este resíduo através da compostagem com outros resíduos (Paredes *et al.*, 2001, 2002; Garcia-Gomez *et al.*, 2002; Baddi *et al.*, 2003).

Uma outra forma, também de uso frequente, especialmente em Portugal, Itália e Marrocos, é a utilização directa nos solos como correctivo orgânico e fonte económica de água. Os efeitos desta aplicação têm sido analisados, revelando-se positivos, quando se considera a presença de quantidades substanciais de nutrientes (Paredes *et al.*, 1999, Sierra *et al.*, 2001, Azbar *et al.*, 2004), melhoria da actividade biológica por aumento do teor em matéria orgânica (Sierra *et al.*, 2001), ou a actividade antimicrobiana das águas ruças, podendo ser utilizadas em tratamentos sanitários contra patogénios do solo (Kotsou *et al.*, 2004). Por outro lado, diversos aspectos negativos foram detectados, nomeadamente a presença de elevado conteúdo em sais minerais, gorduras e polifenóis, que condicionam a sua aplicação directa no solo (Paredes *et al.*, 1999, Azbar *et al.*, 2004).

Os tratamentos físico-químicos envolvem, geralmente, a adição de substâncias químicas, que em conjunto com processos físicos, promovem a coagulação, precipitação ou destruição da matéria orgânica (Azbar *et al.*, 2004; Roig *et al.*, 2006). As substâncias utilizadas são variáveis como o óxido de cálcio (Aktas *et al.*, 2001), hidróxido de cálcio, sulfato de alumínio (Tsonis *et al.*, 1989), quitosano, alum (Meysami e Kasaeian, 2005), cloreto férrico e sulfato ferroso (Azbar *et al.*, 2004), sendo também comum a adição de floculantes na forma de polielectrólitos comerciais (Sarika *et al.*, 2005). Os maiores rendimentos são obtidos em termos da remoção da CQO, podendo ocorrer reduções superiores a 90% do valor inicial e, em alguns casos, ser possível a



reutilização da água resultante da separação das substâncias floculadas/coaguladas para irrigação (Roig *et al.*, 2006).

Os tratamentos biológicos são consensualmente considerados os mais eficazes do ponto de vista ambiental e os que apresentam maior viabilidade económica (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005). Estes incluem tratamentos aeróbios (geralmente usando microrganismos adaptados) e anaeróbios. O que parece apresentar maior potencialidade é a digestão anaeróbia, pois produz menor quantidade de lamas, com redução efectiva da carga orgânica, geração de energia na forma de biogás, e apresenta ainda a vantagem de poder ser reactivada após períodos mais ou menos longos de inactivação, o que é compatível com a sazonalidade da actividade oleícola (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005). No entanto, as propriedades físico-químicas das águas ruças revelaram-se inibidoras e tóxicas para as bactérias metanogénicas, particularmente as concentrações e diversidade de compostos fenólicos encontrados nestes efluentes (Khoufi *et al.*, 2006). No sentido de melhorar o desempenho na digestão anaeróbia, vários processos biológicos de pré-tratamento têm sido testados, com o objectivo fundamental de reduzir o teor em compostos associados à toxicidade das águas ruças (fenóis), acompanhada com alguma redução da carga orgânica.

A bibliografia versando a remoção biológica da cor e desfenolização das águas ruças é vasta. Podem-se referir, a título de exemplo, alguns trabalhos em que são usados fungos filamentosos dos géneros *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Coriolopsis* e *Lentinula* (Robles *et al.*, 2000; Fontoulakis *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2004; Dhouib *et al.*, 2006a,b), bactérias pertencentes aos géneros *Azotobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pediococcus* (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Piperidou *et al.*, 2000; Di Gioia *et al.*, 2001a,b; Ayed e Hamdi, 2003; Ben Othman *et al.*, 2007) e ainda leveduras dos géneros *Candida* e *Yarrowia* (Scioli e Vollaro, 1997; Ettayebi *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Giannoutsou *et al.*, 2004; Lanciotti *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 2006; Martinez-Garcia *et al.*, 2007; Papanikolaou *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2008).

Para além destes tratamentos, recentemente tem-se investido na investigação de Processos de Oxidação Avançados (POA), os quais são adequados para efluentes industriais, e que se baseiam na acção de iniciadores químicos e energia para eliminar os poluentes (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005). Estes processos incluem ozonação, irradiação por UV, fotocatalise, oxidação por reagente de Fenton, oxidação electroquímica e oxidação húmida ou combinações entre estes (Benitez *et al.*, 1999; Rivas *et al.*, 2001; Cermola *et al.*, 2004; Gernjak *et al.*, 2003).

Apesar da maioria dos tratamentos apresentar resultados animadores, nenhum revelou potencialidades suficientes para passar da aplicação à escala piloto para a escala industrial. Este facto resulta, essencialmente, do elevado custo inicial de instalação dos sistemas mais eficientes (geralmente físico-químicos), bem como razões técnicas ligadas à manutenção dos mesmos (Mantzavinos e Kalogerakis, 2005; Roig *et al.*, 2006; Arvanitoyannis *et al.*, 2007).

Para se estabelecer qualquer uma das formas de tratamento descritas é necessário o conhecimento do efluente antes e após o tratamento. Assim, é fulcral conhecer a composição das águas ruças geradas pelo tipo de unidade extractora e perceber quais os parâmetros que afectam a sua composição, de forma a encontrar as soluções económicas e ambientais mais sustentáveis.

Nesse sentido, efectuou-se a caracterização físico-química das águas geradas após a extracção do azeite, por uma unidade cooperativa que faz extracção em regime contínuo (3 fases) localizada no Nordeste Transmontano – Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça (CAOM), com o objectivo de:

- 1 – Identificar os parâmetros físico-químicos que melhor caracterizam os efluentes gerados nas diferentes fases de extracção do azeite;
- 2 – Definir o menor número possível de parâmetros físico-químicos a medir, para caracterizar correctamente e identificar os diferentes fluxos de subprodutos.

Na unidade alvo de estudo, para além da água ruça é, ainda, gerado um efluente resultante da lavagem da azeitona, efectuada quando o fruto chega à Cooperativa, antes de ser armazenado. Durante a campanha 2003/2004, esta água era rejeitada directamente para o esgoto municipal, mas devido à mudança de instalações que a Cooperativa sofreu antes da campanha 2004/2005, estas águas passaram a juntar-se aos outros dois fluxos produzidos pela extracção propriamente dita (bagaço e água ruça). Os subprodutos passaram, então, a ser armazenados numa bacia de evaporação de grandes dimensões localizada nas imediações da Cooperativa.

Descrevem-se, seguidamente, as recolhas efectuadas e os parâmetros determinados para a caracterização destes efluentes.

2. Material e Metodologia

2.1. Amostragem

As águas residuais utilizadas para a caracterização química foram obtidas numa unidade processadora de azeitona localizada no nordeste transmontano, em Murça. Esta unidade, de tipo cooperativo, é constituída por cerca de 900 associados e funciona em regime contínuo, de três fases. As amostras foram recolhidas em períodos distintos



de cada campanha, durante duas campanhas sucessivas (2003/2004 e 2004/2005) e foram seleccionadas no sentido de obter uma caracterização de todos os tipos de efluentes gerados ao longo da cadeia de extracção. Definiram-se três locais de amostragem distintos, água de lavagem (AL), decanter (DEC) e água ruça (AR):

AL – designação da água resultante da lavagem das azeitonas efectuada em lavadoras mecânicas. O objectivo desta operação é remover da superfície dos frutos, poeiras, folhas e outros resíduos, resultantes do manuseamento, recolha e transporte da azeitona desde o local de produção até à unidade de extracção de azeite. Em 2003/2004, as águas foram recolhidas imediatamente após a lavagem. As amostras de 2004/2005 foram recolhidas do depósito das lavadoras novas, onde estiveram por períodos de tempo variáveis e indeterminados.

DEC – designação da água residual que é gerada imediatamente à saída da centrífuga vertical, após a separação das fases aquosa e oleosa.

AR – designação da água residual que resulta do depósito em bacia da água que sai da centrífuga vertical. Esta água é semelhante à água da centrífuga vertical, diferindo no facto desta última estar em depósito numa pequena bacia de sedimentação localizada ainda no interior das instalações da unidade de extracção.

Em cada uma das campanhas, foram seleccionadas três datas de amostragem: uma no início, outra no meio e outra no final. Para facilitar a apresentação dos resultados, estipulou-se designar as amostras de acordo com o local de recolha AL, DEC e AR, adicionando um índice numérico, de 1 a 6, para designar o mês e ano de colheita, respectivamente, AL1, DEC1 e AR1 para as amostras de Dezembro de 2003, AL2, DEC2 e AR2 para as amostras de Janeiro de 2004, AL3, DEC3 e AR3 para as amostras de Fevereiro de 2004, AL4, DEC4 e AR4 para as amostras de Dezembro de 2004, AL5, DEC5 e AR5 para as amostras de Janeiro de 2005, AL6, DEC6 e AR6 para as amostras de Fevereiro de 2005.

Todas as amostras foram recolhidas em garrafas de vidro tipo Duran® com 1L de capacidade, previamente esterilizadas em autoclave a 121°C e 0,1 MPa durante 15 minutos. Após a recolha, as garrafas foram mantidas a 4°C até análise, que foi efectuada até 24h após as recolhas.

2.2. Parâmetros Analisados

Para todas as amostras foram analisados os seguintes parâmetros: pH, temperatura (T), Oxigénio Dissolvido (OD), Carência Química de Oxigénio (CQO), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), Carbono Orgânico Dissolvido (COD), Sólidos Totais (ST), Óleos e Gorduras (OG), Polifenóis Totais (PT), teor em Potássio (K), teor

em Fósforo (P), Azoto Kjeldhal (N_{Kj}), Azoto amoniacal (N_{amon}), Azoto nítrico (N_{nit}) e Azoto orgânico (N_{org}).

pH, T e OD: estes três parâmetros foram medidos no local definido, imediatamente após a recolha. Para tal recorreu-se a um medidor multiparamétrico portátil, modelo 340i/SET da WTW. Para a calibração dos eléctrodos e medição propriamente dita, procedeu-se conforme as indicações do fabricante.

CQO: a carência química de oxigénio foi quantificada por espectroscopia de absorção molecular usando o método nº 8000 do Manual da HACH, baseado na digestão com dicromato de potássio usando um medidor HACH 2400.

CBO: a carência bioquímica de oxigénio foi avaliada por método manométrico usando os medidores da OXITOP®, de acordo com as indicações do fabricante. A medição foi efectuada durante 5 dias.

COD: o carbono orgânico dissolvido foi quantificado por espectroscopia de absorção molecular após digestão UV com persulfato.

ST: os sólidos totais foram calculados pela adição dos valores medidos de sólidos suspensos e sólidos voláteis, tendo estes sido medidos de acordo com o método 2540 do Standard Methods (APHA, 1992).

OG: os óleos e gorduras foram medidos após extracção com n-hexano de acordo com o método 5520 do Standard Methods (APHA, 1992).

PT: os polifenóis totais foram quantificados por espectroscopia de absorção molecular de acordo com o método modificado de Folin-Ciocalteu (Peres, 2001) sendo os resultados expressos em $mg_{ác. \text{ cafeico}}/L$.

Ktotal: o teor em potássio foi analisado por espectroscopia de emissão de chama após digestão sulfúrica.

Ptotal e N_{Kj} : o teor em fósforo e em azoto Kjeldhal foram quantificados por espectroscopia de absorção molecular após digestão sulfúrica.

N_{amon} : o azoto amoniacal foi analisado por espectroscopia de absorção molecular usando previamente a reacção de Bherlot.

N_{nit} : o teor em azoto nítrico foi avaliado por espectroscopia de absorção molecular após reacção com cádmio.

N_{org} : o azoto orgânico foi calculado pela diferença entre os valores de azoto Kjeldhal e os valores de azoto amoniacal.

Os resultados que se apresentam neste trabalho são médias de três réplicas de cada uma das medições indicadas anteriormente.



2.3. Análise numérica

A análise dos resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos foi efectuada recorrendo ao software STATISTICA 7 para Windows. Para os pontos de amostragem considerados foram analisadas as correlações entre os diversos parâmetros, e foi ainda realizada uma análise por componentes principais (ACP) considerando os três pontos de amostragem e todos os parâmetros em simultâneo.

3. Resultados e Discussão

Devido à sua origem e a outras variáveis incontrolláveis envolvidas no processo de produção do azeite, a composição química das águas residuais de lagares de azeite não é constante. Não obstante esta dificuldade, o conhecimento dos constituintes maioritários na sua composição é fundamental para delinear qualquer tipo de tratamento destes resíduos. Na Tabela 2.1. apresentam-se a média dos resultados obtidos para parâmetros físico-químicos determinados, durante as duas campanhas de produção de azeite.

3.1. Caracterização físico-química das águas de lavagem

As águas de lavagem a que se reportam estes resultados foram recolhidas na(s) lavadora(s). No decorrer deste trabalho as instalações da Cooperativa foram remodeladas, tendo como consequência a substituição das lavadoras existentes por lavadoras novas. Ao contrário das antigas instalações, onde as lavadoras estavam no interior do edifício, nas novas instalações as lavadoras foram instaladas no exterior. A recolha das amostras correspondeu ao momento em que as azeitonas chegaram à Cooperativa. No entanto, em algumas datas de amostragem, nomeadamente a correspondente ao início e ao final da campanha (Dezembro 2004, e Janeiro 2005) em 2004/2005, não foi possível recolher desta forma, tendo a água de lavagem sido retirada do interior do depósito da lavadora após diferentes períodos de armazenamento.

Os resultados das amostras recolhidas neste ponto de amostragem mostram que, dos parâmetros medidos *in situ*, *i.e.*, **pH**, **Temp** e **OD**, apenas a temperatura mostrou variações mais acentuadas na segunda campanha. Na campanha de 2003/2004 houve apenas uma data de amostragem em que a temperatura se apresentou baixa (cerca de 8°C), mas as outras medições mostraram-se mais concordantes. Nas amostras respeitantes à campanha 2004/2005, efectuadas já nas novas instalações da CAOM, verificou-se uma diminuição gradual dos valores medidos, como consequência provável da diminuição das temperaturas ambientais.

Tabela 2.1. Média dos parâmetros físico-químicos medidos nas amostras das AL, DEC e AR nas duas campanhas. Em cada ponto de amostragem, as três primeiras datas correspondem à campanha 2003/2004, e as três últimas datas referem-se à campanha de 2004/2005.

Ponto de Amostragem	Data Amostragem	pH	OD mgO ₂ /L	Temp °C	CQO mgO ₂ /L	CBO mgO ₂ /L	COD mgC/L	ST g/L	OG g/L	PT mg _{acidcafeico} /L	K mgK/L	P mgP/L	N _{Kj} mgN/L	N _{nit} mgN/L	N _{amon} mgN/L	N _{org} mgN/L	C/N ratio
AL	AL1	6,6	6,1	13,9	1276	550	144,6	0,84	0,20	11,7	47,4	2,0	8,2	<0,01	0,83	7.37	18
	AL2	6,4	6,1	8,8	1018	200	101,3	0,67	14,0	4,9	49,0	2,6	3,5	<0,01	0,87	2.63	29
	AL3	6,8	5,9	12,8	988	300	419,4	0,68	5,93	9,1	35,1	2,0	2,6	0,04	0,82	1.78	161
	AL4	5,5	6,8	12,7	1951	500	603,7	0,60	5,41	981,0	147,9	4,6	19,7	0,2	1,05	18.65	31
	AL5	7,5	8,0	10,3	1780	200	323,3	0,60	2,50	1027,0	26,9	2,8	1,2	<0,01	0,29	0.91	269
	AL6	5,2	8,0	5,0	-	-	1018,9	0,95	0,40	1000,0	208,7	6,1	11,4	<0,01	1,47	9.93	89
DEC	DEC1	5,7	-	23,3	17888	1000	1138,9	9,98	9,0	14,7	106,9	9,3	23,0	<0,01	0,80	22.2	50
	DEC2	5,4	7,9	22,0	76450	700	13311,7	51,9	55,6	82,0	1920,5	149,2	186,0	0,26	1,74	184.3	72
	DEC3	-	-	-	3725	0	764,8	1,49	9,1	7,1	22,0	1,8	5,5	<0,01	0,79	4.71	139
	DEC4	5,8	6,4	31,7	9510	2000	1157,9	4,31	16,0	853,0	232,9	22,9	40,7	0,28	0,83	39.87	28
	DEC5	6,2	6,4	29,5	13400	1500	2865,6	5,24	9,3	753,0	295,2	21,3	41,3	<0,01	1,80	39.5	69
	DEC6	6,2	5,3	24,2	-	-	1398,5	36,9	38,65	1043,0	104,4	10,4	20,2	<0,01	1,53	18.67	69
AR	AR1	5,3	0,2	25,7	18138	1500	3147,3	7,11	2,47	27,0	384,9	32,0	55,3	<0,01	0,84	54.46	57
	AR2	5,2	0,9	24,4	18550	2000	4739,3	5,26	8,6	40,0	669,3	52,2	77,4	0,16	1,47	75.93	61
	AR3	5,1	3,4	29,0	7450	500	1893,9	3,13	6,93	41,0	169,4	11,5	22,6	<0,01	1,01	21.59	84
	AR4	5,2	2,9	23,6	28640	8000	13372,9	7,78	22,4	993,0	1586,5	115,6	102,4	0,28	0,99	101.4	130
	AR5	5,8	0,2	26,3	68480	9500	17279,5	30,22	62,3	955,0	2210,5	162,5	302,7	<0,01	6,40	296.3	57
	AR6	5,6	1,4	23,8	-	-	5584,3	6,17	9,3	1051,0	581,0	43,9	52,6	<0,01	1,90	50.70	106

AL1 – água lavagem Dezembro 2003; AL2 – água lavagem Janeiro 2004; AL3 – água lavagem Fevereiro 2004; AL4 – água lavagem Dezembro 2004; AL5 – água lavagem Janeiro 2005; AL6 – água lavagem Fevereiro 2005; DEC1 – centrífuga vertical Dezembro 2003; DEC2 – centrífuga vertical Janeiro 2004; DEC3 – centrífuga vertical Fevereiro 2004; DEC4 – centrífuga vertical Dezembro 2004; DEC5 – centrífuga vertical Janeiro 2005; DEC6 – centrífuga vertical Fevereiro 2005; AR1 – água ruça Dezembro 2003; AR2 – água ruça Janeiro 2004; AR3 – água ruça Fevereiro 2004; AR4 – água ruça Dezembro 2004; AR5 – água ruça Janeiro 2005; AR6 – água ruça Fevereiro 2005.

De facto, nesta região do Nordeste transmontano, a temperatura é normalmente baixa nesta época do ano, e como a lavadora se encontra ao ar livre, as variações termométricas ambientais terão reflexos na temperatura das águas residuais.

No que diz respeito ao pH e OD, as medições efectuadas mostraram-se constantes. Pode contudo referir-se, que para o pH, nas amostras obtidas na campanha de 2003/2004 os valores se mostraram mais constantes, enquanto na campanha de 2004/2005 oscilaram, mostrando um valor mais básico no mês de Janeiro de 2005 (AL5), enquanto na amostra de Dezembro de 2004 (AL4) e no mês de Fevereiro de 2005 (AL6) os valores registados mostraram um ambiente mais ácido. Estes valores estão bastante próximos da neutralidade, no entanto, relembra-se que estas são as águas que resultam da lavagem da azeitona. Nesta, é utilizada água da rede pública e a diminuição de pH poderá resultar da presença de alguns frutos com a pele degradada, permitindo assim a libertação para o meio de alguns ácidos (gordos e/ou fenólicos) que levarão à acidificação do líquido. Estas medições poderão ter sido influenciadas pelo facto destas amostras terem estado armazenadas, temporariamente, no interior da lavadora. As concentrações de oxigénio dissolvido mantiveram-se constantes nas amostras da campanha de 2003/2004 e aumentaram com o decorrer do tempo na campanha de 2004/2005, tendo-se registado os teores mais elevados na última recolha efectuada.

Os valores para a matéria orgânica, medida em carga de **CQO** e **CBO** das amostras, foram 1402 mgO₂/L e 350 mgO₂/L, respectivamente. A carga média medida para a CQO foi muito maior na segunda campanha de amostragem. Este facto pode ser atribuído ao momento da recolha, que nas amostras de 2004/2005, como já foi referido, não correspondeu exactamente ao momento da lavagem, tendo surgido a necessidade de recolher as amostras a partir do depósito da lavadora. Estabelecendo a relação CQO/CBO, vulgarmente utilizada para determinar a biodegradabilidade de um efluente, verifica-se que o seu valor não ultrapassa os 30%. Esta razão é tanto maior quanto mais biodegradável é o efluente. Por exemplo, em ETARs municipais, o valor desejável deve rondar os 80%, significando que cerca de 80% de toda a matéria orgânica presente poderá ser metabolizada recorrendo a processos de degradação biológica. Verifica-se como esperado, que este tipo de efluente, mesmo não sendo o efluente final do processo de laboração da azeitona, apresenta já algumas propriedades que poderão inibir a actividade microbiana, impedindo assim a sua oxidação biológica.

É consensual, entre a bibliografia consultada, que a toxicidade destes efluentes se prende com a presença de compostos fenólicos de tipos variados e de ácidos gordos. No sentido de quantificar o seu valor nos efluentes da CAOM, mediram-se os

teores em polifenóis e a concentração de óleos e gorduras. Os valores medidos para os polifenóis são apresentados em mg de ácido cafeico.

No que diz respeito aos **compostos polifenólicos**, os valores aumentaram entre as duas campanhas de recolha de amostras (Tabela 2.1.). De facto, de um valor médio de 8,5 mg_{ác.caf.}/L obtido na campanha de 2003/2004, passou-se para 1003 mg_{ác.caf.}/L na campanha de 2004/2005. Estas diferenças poderão ser consequência do diferente estado de maturação e conservação dos frutos no momento da entrega na Cooperativa. O despejar os frutos na balança, transportá-los em tapetes rolantes até à lavadora e finalmente a lavagem propriamente dita são operações que podem afectar a resistência do fruto, levando a que compostos presentes na polpa sejam libertados para o meio, por destruição do epicarpo. Atendendo aos resultados obtidos, é de supor que na campanha de 2004/2005 poderiam ter surgido frutos em avançado estado de maturação.

Relativamente à concentração em matéria gorda, os resultados mostram que os teores em **óleos** e **gorduras** no efluente sofreram oscilações significativas, particularmente na campanha de 2003/2004. Os óleos e gorduras presentes neste efluente serão consequência do rebentamento das células constituintes da polpa do fruto (mesocarpo). Para que tal aconteça, o fruto tem de apresentar roturas do epicarpo e um maior ou menor esmagamento. Nesta fase do processo de extracção do azeite, as azeitonas ainda não sofreram nenhuma operação física com esse objectivo, podendo estes valores resultar da presença de diferentes proporções de azeitonas com proveniências mistas (do chão e da árvore), particularmente na campanha 2003/2004.

Os parâmetros **sólidos totais** e **COD** não apresentaram variações estatisticamente significativas (dados não apresentados), apesar de, na segunda campanha, se terem obtido valores superiores para ambos os parâmetros, que foram concordantes com os medidos para a CQO. Infere-se que os seus valores na água de lavagem da CAOM sejam independentes da data escolhida para a recolha de amostras e, aparentemente, não influenciados pelas variáveis independentes estabelecidas para análise, nomeadamente, campanha de extracção de azeitona e fase da campanha – início, meio ou final. Aparentemente os Sólidos Totais e o COD estão directamente relacionados com o teor em carbono das azeitonas e dos sólidos que são lavados da superfície do fruto. As diferenças observadas entre campanhas parecem mais uma vez ser consequência da recolha de amostras do depósito das lavadoras.

Os macronutrientes como **K**, **P** e formas de azoto reduzidas (**N_{kj}**, **N_{org}**, **N_{amon}**) e oxidadas (**N_{nit}**) foram também analisados. De um modo geral, as amostras apresentaram teores relativamente elevados destes nutrientes. São de particular interesse os *ratios* calculados para os teores de carbono e azoto. Estes valores, que se mostraram sempre bastante elevados, indicam nesta fase um baixo grau de



mineralização de compostos de carbono, e baixa oxidação do azoto (Paredes *et al.*, 1999).

As relações entre os teores das diferentes formas de azoto apresentam oscilações concordantes em todas as amostragens. Relativamente às concentrações de N_{Kj} e N_{org} foram elevadas contrastando com as outras formas de azoto medidas – N_{nit} e N_{amon} – que surgem sempre com valores muito reduzidos. Os elevados valores de azoto orgânico medido podem estar relacionados com a presença de teores elevados de matéria orgânica vegetal. Os baixos valores de compostos oxidados de azoto pode, eventualmente, dever-se ao reduzido período de estabilização do efluente, diminuindo a capacidade de alguma flora microbiana presente para oxidar o azoto orgânico noutras formas químicas.

No que diz respeito aos teores em **potássio e fósforo**, é mais uma vez notável a sua elevada concentração. É importante referir que as concentrações dos mesmos durante a campanha 2004/2005 apresentaram valores mais elevados, que poderão ser resultado de processos de solubilização nas águas que ficaram temporariamente depositadas, em oposição à campanha anterior, em que as amostras foram recolhidas imediatamente após a lavagem.

3.1.1. Análise estatística dos resultados das águas de lavagem

Como já foi referido, a caracterização de um efluente implica a determinação de vários parâmetros de carácter físico, químico e biológico. Neste capítulo são apresentados resultados determinados para 15 parâmetros físico-químicos. Os parâmetros seleccionados foram alguns dos mais referenciados na bibliografia, bem como referidos na legislação nacional para a caracterização de águas. A determinação de um número de parâmetros tão elevado consome muito tempo e é dispendiosa se aplicada de forma rotineira, como desejável. Tendo estes considerados presentes, a análise que se apresenta seguidamente foi realizada com o objectivo de determinar qual o menor número de parâmetros que possa fielmente caracterizar o efluente gerado. Efectuou-se uma análise de correlação linear ou de Pearson, a qual se encontra sumariada na Tabela 2.2.

A análise de correlação de Pearson (Pearson, 1986) é designada por um coeficiente (**r**) ao qual se associa uma determinada probabilidade (**p**), e que determina quanto duas variáveis são proporcionais uma à outra. Considera-se que duas variáveis estão correlacionadas quando o valor de **p** for inferior a 5%. Na Tabela 2.2. e seguintes, com análises de correlação de Pearson, não se representaram os parâmetros físico-químicos que não se correlacionaram.

Tabela 2.2. Correlações de Pearson entre os parâmetros físico-químicos medidos nas amostras da água de Lavagem (AL), durante as duas campanhas de amostragem.

AL		pH	CQO	PT	K _{total}	P _{total}	N _{Kj}	N _{amon}	N _{nit}	N _{org}
Correlações (n=6)										
pH		1,0								
CQO		ns	1,0							
PT		ns	0,95*	1,0						
K		-0,91*	ns	ns	1,0					
P		ns	ns	ns	0,90*	1,0				
N _{Kj}		-0,89*	ns	ns	0,97**	ns	1,0			
N _{amon}		-0,90*	ns	ns	ns	ns	ns	1,0		
N _{nit}		ns	ns	ns	0,96**	0,90*	0,91*	ns	1,0	
N _{org}		-0,88*	ns	ns	0,97**	ns	1,00***	ns	0,91*	1,0

(ns) não significativo; (*) significativo para $p < 0,05$; (**) muito significativo para $p < 0,01$; (***) altamente significativo para $p < 0,001$. Os parâmetros medidos e não apresentados não revelaram significância estatística para a análise dos dados.

De acordo com a mesma tabela, infere-se que as águas geradas neste local de amostragem apresentam um carácter muito variável, pois são poucas as correlações com significância estatística. As correlações significativas resultam, fundamentalmente, da relação entre os compostos de azoto, e destes com o teor em fósforo e potássio totais. Na análise destes resultados é necessário ter em consideração a alteração das condições nos momentos de recolha das amostras. A mudança de máquinas lavadoras e de localização das mesmas afectou nitidamente os resultados obtidos para este ponto de amostragem. Assim, serão necessárias mais medições, considerando a nova localização das lavadoras, para que com alguma segurança se possam determinar quais os parâmetros que melhor caracterizam este efluente.

Ainda em referência à Tabela 2.2. a correlação negativa entre o pH, e outros parâmetros como teores em potássio e formas de azoto orgânicas ($p < 0,05$) mostra mais uma vez que maiores tempos de deposição levam a uma maior solubilização dos compostos, com conseqüente diminuição do pH e aumento dos teores de macronutrientes minerais.

3.2. Caracterização físico-química das águas da centrífuga vertical

As águas a que se reportam estes resultados foram recolhidas no final do processo de extracção do azeite, à saída da centrífuga vertical. Estas resultam da afinação final, para separar a fase oleosa da fase aquosa, após a termobatedura, e são muito semelhantes às águas residuais finais geradas pelo processo, que diferirão apenas pelo facto destas serem sujeitas a períodos maiores de deposição em bacias.



A **temperatura** medida neste efluente foi elevada, variando entre os 22 e os 32°C, sendo que este facto é uma consequência da fase de extracção que precede a sua recolha. O **pH** medido apresenta-se ácido (valor médio de 5,9). Os baixos valores de pH medidos, também obtidos por outros autores (Robles *et al.*, 2000; D'Annibale *et al.*, 2004; Sassi *et al.*, 2006) são consequência da diluição dos ácidos (gordos e fenólicos) do citoplasma das células das azeitonas, que depois de esmagadas e com adição de água quente, facilitam a sua dispersão no meio. Os valores medidos em ambas as campanhas (2003/2004 e 2004/2005), quer para o pH, quer para a temperatura, não apresentaram variações.

Devido a problemas dos aparelhos de medição e ainda de paragem temporária de laboração, alguns valores de OD não foram medidos na campanha de 2003/2004. Já na campanha de 2004/2005, os teores de **OD** mantiveram-se bastante constantes ao longo da extracção. O teor de oxigénio nas águas da centrífuga vertical é, em média, 6,0 mgO₂/L, manifestamente baixo para a oxidação destas águas cujos valores de CQO são muito superiores aos medidos na água de lavagem.

De facto, os valores médios para a **CQO** nas amostras do DEC ascenderam aos 24 000 mgO₂/L. Comparando estes resultados com os descritos na bibliografia consultada, pode-se concluir que as amostras analisadas no presente estudo não são as que apresentam os maiores teores de matéria orgânica (Knupp *et al.*, 1996; Vitolo *et al.*, 1999; Robles *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2003; D'Annibale *et al.*, 2004, Sassi *et al.*, 2006). Na realidade, os valores medidos aproximam-se mais de efluentes considerados de baixa carga (Low strength wastewaters), como referem D'Annibale e colaboradores (2004). Um cálculo da razão **CQO/CBO** revela que os valores da mesma rondam os 5% o que é efectivamente baixo.

À semelhança do verificado para as amostras de água de lavagem recolhidas, também as amostras da centrífuga obtidas na campanha de 2004/2005 apresentam maior teor em **polifenóis**, passando de um valor médio de 34,6 mg_{ác.caf.}/L em 2003/2004 para uma média de 883 mg_{ác.caf.}/L em 2004/2005. A comparação destes valores com os medidos nas águas de lavagem é, contudo, surpreendente. Esperar-se-ia que os valores medidos deste parâmetro nas águas da centrífuga excedessem, em muito, os obtidos para as águas de lavagem, mas tal não corresponde ao resultado obtido. Muito provavelmente, a maior fracção dos compostos fenólicos é mais solúvel na fase oleosa, ficando retida junto com o azeite já extraído. Apenas a fracção mais polar se solubilizou no meio aquoso, fazendo com que os valores de polifenóis tenham sido muito similares aos obtidos para as águas de lavagem.

O conteúdo medido em **óleos** e **gorduras**, registou no primeiro ano de amostragens, um valor muito elevado na segunda data de recolhas (DEC2 – Tabela

2.1.) enquanto que no segundo ano, observou-se o mesmo, mas na última data de amostragem (DEC6). Este parâmetro, nas amostras da centrífuga vertical, mostrou ter variações concordantes com as observadas para os sólidos e com os teores de COD. Estes valores, anormalmente elevados, podem ter sido resultado da paragem temporária do sistema, que levou a um armazenamento mais prolongado das azeitonas.

Os **sólidos totais** e o **COD** apresentaram, em relação à água de lavagem, um aumento marcado. Os valores medidos para os sólidos totais variaram muito ao longo de ambas as campanhas de extracção. O mesmo se verifica para os valores medidos de COD. Os sólidos presentes nestas amostras resultaram do processo de esmagamento da azeitona com adição de água. São essencialmente pedaços da polpa do fruto e, como tal, a sua composição química será muito rica em carbono.

Ainda como consequência da operação de esmagamento e batedura, os **nutrientes** constituintes da polpa do fruto vão solubilizando para o meio aquoso, tendo como consequência um aumento das suas concentrações nas amostras recolhidas na centrífuga vertical. A maior abundância de **K**, **P** e **compostos de azoto** registada neste ponto de amostragem relativamente à água de lavagem, acompanha os maiores teores de COD, CQO, sólidos totais e óleos e gorduras registados.

3.2.1. Análise estatística dos resultados das águas da centrífuga vertical

À semelhança do que foi feito para as águas de lavagem, os resultados obtidos para as águas do decanter foram sujeitos a análise de correlações, utilizando o coeficiente de Pearson. A Tabela 2.3. mostra as correlações encontradas entre os parâmetros medidos neste efluente e as respectivas significâncias.

Tabela 2.3. Correlações de Pearson para os parâmetros físico-químicos medidos nas amostras da centrífuga vertical (DEC), durante as duas campanhas de extracção.

DEC	Temp	CQO	CBO	COD	ST	OG	PT	K	P	N _{Kj}	N _{org}
Temp	1,0										
CQO	ns	1,0									
CBO	0,95*	ns	1,0								
COD	ns	0,98**	ns	1,0							
ST	ns	1,00***	ns	0,98**	1,0						
OG	ns	0,97**	ns	0,97**	0,97**	1,0					
PT	0,98**	ns	ns	ns	ns	ns	1,0				
K	ns	0,98**	ns	1,00***	0,98**	0,99**	ns	1,0			
P	ns	0,98**	ns	0,99***	0,98**	0,99***	ns	1,00***	1,0		
N _{Kj}	ns	0,98**	ns	0,99**	0,98**	0,98**	ns	1,00***	1,00***	1,0	
N _{org}	ns	0,98**	ns	0,99**	0,98**	0,99**	ns	1,00***	1,00***	1,00***	1,0

(ns) não significativo; (*) significativo para $p < 0,05$; (**) muito significativo para $p < 0,01$; (***) altamente significativo para $p < 0,001$. Os parâmetros medidos e não apresentados não revelaram significância estatística para a análise dos dados.



Neste ponto de amostragem, e comparativamente com as águas de lavagem, o número de parâmetros correlacionados entre si é muito maior. Este facto leva a supor que as condições ambientais são mais homogêneas, promovendo uma menor variação dos parâmetros escolhidos para a sua caracterização. É observável, na Tabela 2.3. um conjunto de correlações, que inclui os parâmetros associados aos teores em matéria orgânica (CQO, COD, ST, OG) e aos valores de nutrientes (K, P, N_{kj} , N_{org}).

Os macronutrientes apresentaram correlações altamente significativas ($p < 0,001$) entre si e com os teores em carbono orgânico dissolvido (COD) e muito significativas ($p < 0,01$) em relação aos parâmetros COD, OG e ST. A característica de maior importância parece ser o teor em COD, uma vez que é o que apresenta mais e maiores correlações com os outros parâmetros referidos. Tendo como objectivo a redução do número de parâmetros capazes de caracterizar os efluentes gerados, verificaram-se as correlações determinadas na tabela anterior analisando o coeficiente de correlação. Esta análise foi feita pela projecção dos pontos medidos do parâmetro COD, em correlação com os outros parâmetros, e estabeleceram-se as rectas de regressão, bem como os respectivos coeficientes de determinação (r^2), que expressam a quantidade de variação entre as duas variáveis. Os gráficos da Figura 2.1. mostram esta análise. Como o COD é a variável que mais correlação apresentou com as outras variáveis em análise, as equações de regressão linear foram calculadas com base neste parâmetro.

O COD apresenta também correlações altamente significativas ($p < 0,001$) com os valores de sólidos totais e óleos e gorduras. No entanto, a análise dos seus coeficientes de determinação não se revelou estatisticamente significativa. A análise mostrou, ainda, que a ausência de significância no coeficiente de determinação (r^2) é resultado de um valor, obtido para ambos os parâmetros na campanha de 2003/2004, que surge como um “outlier” (por definição, valor atípico com observações pouco frequentes). Para a análise de correlações e rectas de regressão, a existência de um único outlier é suficiente para alterar consideravelmente o declive da recta e consequentemente o valor da correlação em si. O risco de considerar valores mais afastados da média dos valores medidos como outliers diminui com o aumento do número de observações efectuadas. Neste caso, como o número de observações não é elevado ($n=6$), não se considerou nenhuma das medições como atípica e, consequentemente, as correlações estabelecidas nestes parâmetros serão consideradas com alguma ponderação.

Com base na análise das correlações referidas, que apresentaram significância, e na análise dos coeficientes de correlação, considerou-se que para este ponto de

amostragem, a determinação dos valores de P, K, N_{Kj} e N_{org} poderão ser calculados medindo apenas o parâmetro COD de acordo com as equações seguintes:

Fósforo (P) mgP/L: $4,0156E-16 + 0,9919 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9839$; $p=0,0001$)

Potássio (K) mgK/L: $2,3545E-16 + 0,9958 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9916$; $p=0,00003$)

Azoto Total (N_{Kj}) mgN/L: $3,040E-16 + 0,9883 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9768$; $p=0,0002$)

Azoto orgânico (N_{org}) mgN/L: $-1,2622E-16 + 0,9881 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9763$; $p=0,0002$)

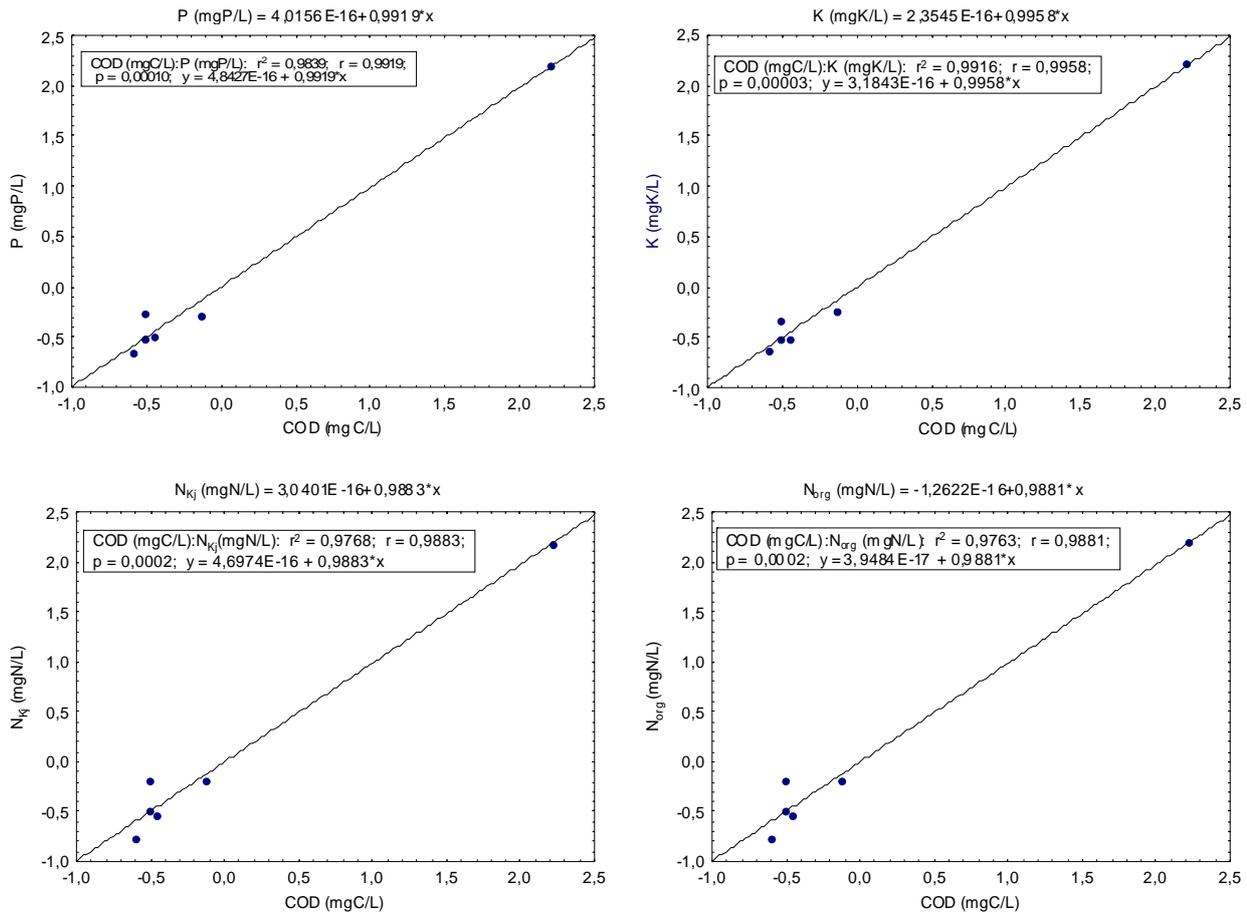


Figura 2.1. Projecção das correlações de Pearson entre o COD e P, K, N_{Kj} e N_{org} , com as respectivas rectas de regressão linear e probabilidade associada nas águas da centrífuga vertical (DEC).

3.3. Caracterização físico-química das águas ruças

As águas que são designadas por AR apresentaram características muito semelhantes às da centrífuga vertical. As amostras AR, recolhidas numa bacia localizada no interior das instalações, tiveram tempos de retenção variáveis.

No que diz respeito às características medidas no local, obtiveram-se valores de pH ligeiramente mais ácidos ($pH_{\text{médio}} = 5,3$) associados a **temperaturas** médias mais



elevadas ($Temp_{médias} = 25,5 \text{ } ^\circ\text{C}$). O parâmetro que registou as maiores diferenças em relação aos outros pontos de amostragem foi o **OD**, para o qual se mediram valores muito baixos (média = $1,47 \text{ mgO}_2/\text{L}$). Os registos obtidos não apresentaram diferenças entre campanhas. Verificou-se que, para o OD, os valores mais elevados corresponderam a momentos em que a carga orgânica do efluente foi mais baixa.

A carga orgânica deste efluente, avaliada pela **CQO**, revelou-se muito elevada, tendo aumentado em relação aos dois pontos de amostragem anteriores. O valor médio para a CQO atingiu os $28\,252 \text{ mgO}_2/\text{L}$. A elevada carga orgânica, associada aos baixos valores de OD registados, podem tornar este efluente muito resistente aos tratamentos biológicos. Notou-se a existência de flutuações entre os valores medidos para a CQO em ambas as campanhas, que se julga estarem associadas a fenómenos de sedimentação na bacia de onde foram recolhidas as amostras. Quanto à **CBO**, a média dos valores medidos foi de $9500 \text{ mgO}_2/\text{L}$. As oscilações verificadas na CQO mantiveram-se nas medições da CBO.

Os **polifenóis** apresentaram um comportamento semelhante ao registado nos outros pontos de amostragem, isto é, a média dos valores medidos na campanha 2004/2005 ($999,7 \text{ mg}_{ac.ca}/\text{L}$) foi muito superior à obtida em 2003/2004 ($36 \text{ mg}_{ac.ca}/\text{L}$). A justificação para este facto será a mesma que se referiu para as amostras da centrífuga vertical.

A bacia de sedimentação onde se recolheram as amostras referenciadas com AR é chamada pelos funcionários da CAOM de “inferno”. Esta designação tem raízes muito antigas, quando se utilizavam os sistemas tradicionais de extracção com prensas. Os infernos eram bacias onde se podia ainda recuperar algum azeite que não tinha sido bem separado, que ficava à superfície por processos de sedimentação naturais, associados às diferenças de densidade dos líquidos água/azeite. Este facto faz com que também nestas amostras, os teores em **óleos e gorduras** tenham sido muito elevados, quando comparados, fundamentalmente, com as medições obtidas na água de lavagem. Entre as duas campanhas não houve diferenças significativas neste parâmetro. É de referir que, em ambas as campanhas, se mediu um valor mais baixo que os restantes. Esta medição correspondeu a momentos de recolha, em que a CAOM tinha procedido previamente a uma limpeza da bacia, diminuindo assim a quantidade de água em depósito, bem como os resíduos.

Os **sólidos totais** e o **carbono orgânico dissolvido** apresentaram oscilações que acompanharam as verificadas para a CQO.

Os **macronutrientes** apresentaram um aumento relativamente às amostras da centrífuga vertical (DEC). Neste ponto de amostragem, provavelmente devido a fenómenos de dissolução após períodos variáveis de tempo, associados a diminuições

do pH, que favorecem os fenómenos de dissolução, os valores medidos de K e P foram muito elevados.

3.3.1. Análise estatística dos resultados das águas ruças

A Tabela 2.4. mostra as correlações obtidas pelo coeficiente de Pearson. À semelhança do verificado para as águas da centrífuga vertical, também neste ponto foram identificadas muitas correlações, indicando uma menor variabilidade das condições ambientais.

Analisando os dados apresentados na tabela, a significância encontrada não é a mesma entre os diferentes parâmetros. O que apresenta maior número de correlações é a CQO. Assim, em relação a este parâmetro, registaram-se correlações altamente significativas ($p < 0,001$) com o teor em azoto Kjeldhal, e azoto orgânico, correlações muito significativas ($p < 0,01$) com os sólidos totais e o teor em óleos e gorduras, e finalmente correlações significativas ($p < 0,05$) entre a CQO e COD, K, P e N_{amon} .

Analisando o coeficiente de determinação (r^2) das correlações referidas e as respectivas rectas de regressão, verificou-se que quanto às correlações com o N_{Kj} e com o N_{org} , se obteve uma validação pelos coeficientes de determinação – Figura 2.2. A correlação entre as duas formas de azoto é muito elevada ($p < 0,001$), e as concentrações de azoto orgânico podem ser calculadas pelas concentrações de azoto Kjeldhal. Estes factos ajudam a corroborar a ideia de que este efluente apresenta baixa actividade microbiana, pois o azoto ainda está maioritariamente na forma reduzida.

Tabela 2.4. Correlações de Pearson para os parâmetros físico-químicos medidos nas amostras da água ruça (AR), durante as duas campanhas de extracção.

AR												
Correlações(n=6)	pH	CQO	CBO	COD	ST	OG	PT	K	P	N_{Kj}	N_{amon}	N_{org}
pH	1,0											
CQO	0,96**	1,0										
CBO	ns	ns	1,0									
COD	ns	0,90*	1,00***	1,0								
ST	0,99**	0,98**	ns	ns	1,0							
OG	0,91*	0,97**	ns	0,91*	0,96**	1,0						
PT	ns	ns	0,98**	0,96**	ns	ns	1,0					
K	ns	0,92*	0,99**	1,00***	ns	0,92*	0,94*	1,0				
P	ns	0,93*	0,98**	0,99***	ns	0,92*	0,93*	1,00***	1,0			
N_{Kj}	0,96**	1,00***	ns	0,88*	0,99**	0,98**	ns	0,91*	0,91*	1,0		
N_{amon}	0,96**	0,94*	ns	ns	0,98**	0,95*	ns	ns	ns	0,97**	1,0	
N_{org}	0,96**	1,00***	ns	0,88*	0,99**	0,98**	ns	0,91*	0,91*	1,00***	0,96**	1,0

(ns) não significativo; (*) significativo para $p < 0,05$; (**) muito significativo para $p < 0,01$; (***) altamente significativo para $p < 0,001$. Os parâmetros medidos e não apresentados não revelaram significância estatística para a análise dos dados.



Quanto às correlações entre a CQO e o COD, apresentaram um coeficiente (r^2) muito baixo. Entre a CQO e os nutrientes P, K e azoto amoniacal também se obtiveram coeficientes muito baixos.

Como o COD apresentou correlações elevadas com o K e o P, analisaram-se estas correlações e verificou-se (Figura 2.2.) que os coeficientes se revelaram elevados bem com a probabilidade (p) associada.

As correlações entre a CQO e os sólidos totais, e óleos e gorduras, também foram analisadas e os resultados apresentados na Figura 2.2.

As correlações referidas e que se apresentam na figura permitem estabelecer, mais uma vez, um conjunto de equações, que para este ponto de amostragem, e nas condições do ensaio, diminuem o número de parâmetros a determinar para o caracterizar.

Fósforo (P) mgP/L: $1,1842E-15 + 0,9928 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9857$; $p=0,00008$)

Potássio (K) mgK/L: $4,0543E-16 + 0,9953 \cdot \text{COD (mgC/L)}$ ($r^2=0,9907$; $p=0,00003$)

Azoto Total (N_{Kj}) mgN/L: $2,0791E-15 + 0,9636 \cdot \text{CQO (mgO}_2\text{/L)}$ ($r^2=0,9284$; $p=0,002$)

Azoto orgânico (N_{org}) mgN/L: $3,7308E-16 + 0,9647 \cdot \text{CQO (mgO}_2\text{/L)}$ ($r^2=0,9307$; $p=0,0018$)

Sólidos Totais (ST) (g/L): $6,826E-16 + 0,9364 \cdot \text{CQO (mgO}_2\text{/L)}$ ($r^2=0,8769$; $p=0,0059$)

Óleos e Gorduras (OG) (g/L): $5,2906E-16 + 0,9354 \cdot \text{CQO (mgO}_2\text{/L)}$ ($r^2=0,8749$; $p=0,0061$)

Após esta análise, verifica-se que o número de parâmetros a utilizar para caracterizar este ponto de amostragem diminuiu comparativamente com os outros pontos de amostragem. De facto, para as AR, de 15 parâmetros que foram efectivamente medidos e posteriormente analisados, e considerando as significâncias estatísticas obtidas conclui-se que a caracterização recorrendo aos parâmetros OD, pH, Temp, CQO (permite o cálculo de ST, OG, N_{Kj} , N_{org}), CBO, COD (permite o cálculo de K e P), PT, N_{nit} e N_{org} será suficiente.

3.4. Análise geral das relações entre os parâmetros físico-químicos

De forma a determinar se todos ou apenas alguns grupos de parâmetros físico-químicos poderiam ser utilizados para distinguir pontos de amostragem ou períodos da campanha de extracção, foi analisado o conjunto de todas as amostras obtidas na CAOM.

O pH, PT, OG, N_{amon} e N_{nit} foram parâmetros que não apresentaram diferenças significativas entre os pontos de amostragem (dados não apresentados), enquanto que a **Temp**, **CQO**, **CBO**, **COD** e **ST** apresentaram, de um modo geral, valores distintos para

as águas de lavagem, distinguindo este ambiente dos outros dois pontos de amostragem (Figura 2.3.).

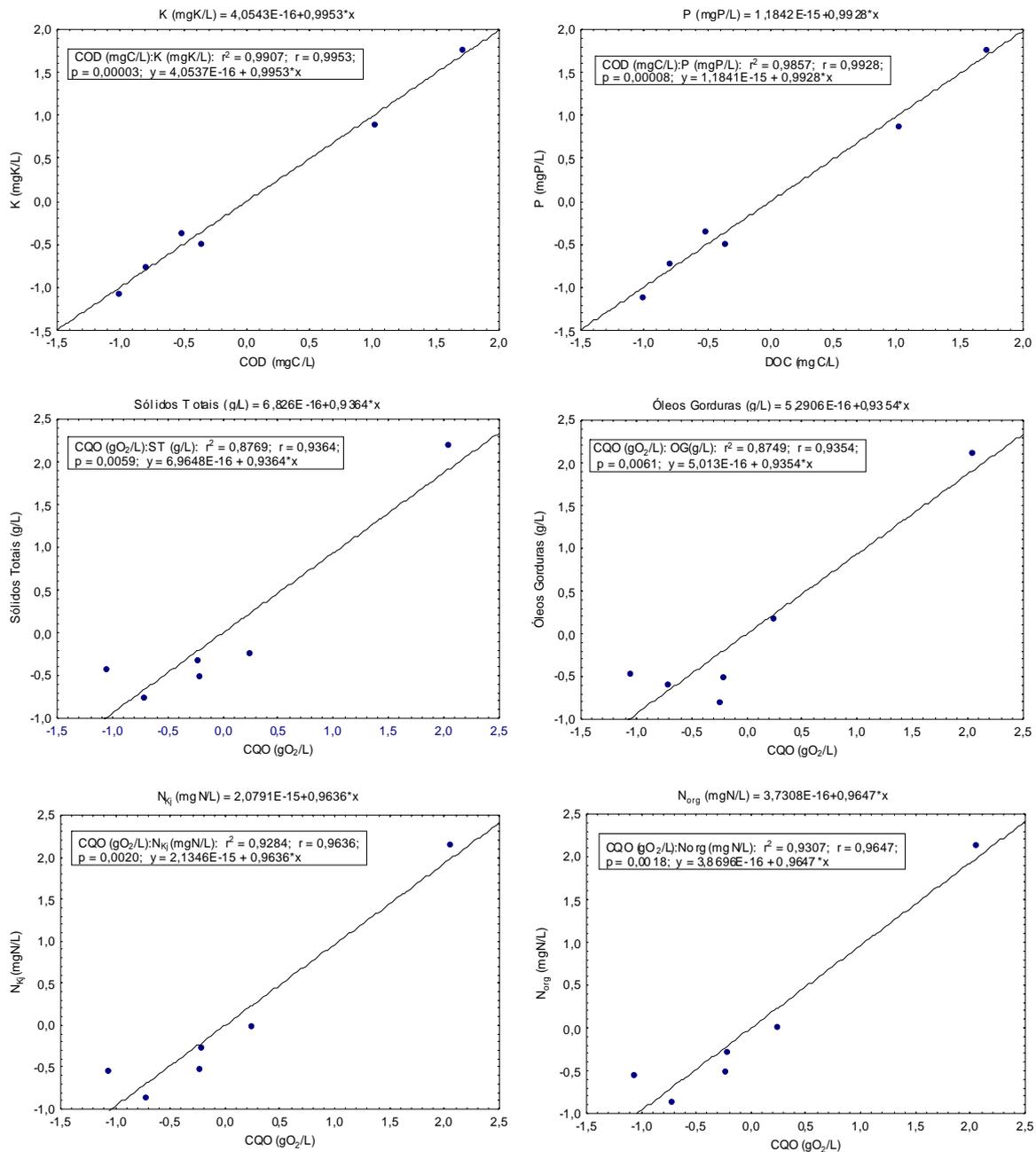


Figura 2.2. Projecção das correlações de Pearson entre o COD e P, K, e entre CQO e sólidos totais, óleos e gorduras, azoto total e azoto orgânico, com as respectivas rectas de regressão linear e probabilidade associada nas águas ruças (AR).

O OD é o único parâmetro que não apresenta diferenças significativas entre as águas de lavagem com as águas da centrífuga vertical, apresentando valores significativamente diferentes para a água ruça (Figura 2.4.).

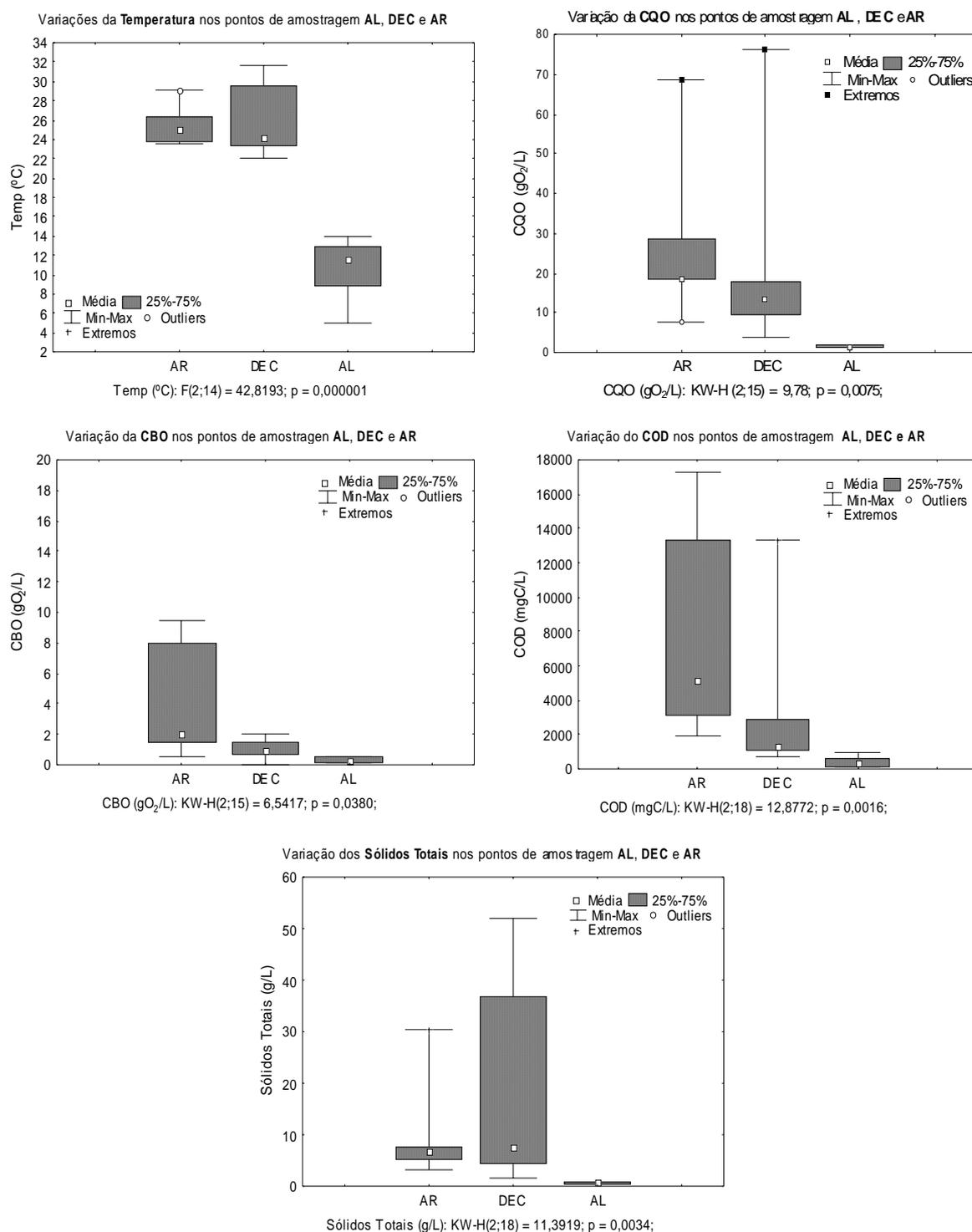


Figura 2.3. Projecção dos parâmetros físico-químicos que distinguem as águas de lavagem, dos outros pontos de amostragem. Projecção da Temperatura, Carência Química de Oxigénio (CQO), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), Carbono Orgânico Dissolvido (COD), e Sólidos Totais. Os valores de p referem-se à análise pelo teste de Kruskal-Wallis (KW-H).

Já os macronutrientes **P**, **K**, o **N_{Kj}** e o **N_{org}** surgem com medições significativamente diferentes nos três pontos de amostragem (Figura 2.5.).

Estes resultados foram corroborados pela Análise de Componentes Principais (ACP) efectuada. Os melhores eixos factoriais extraídos (F1 e F2) estão representados na Figura 2.6. Estes, contribuíram, respectivamente, com 58% e 11% da variância total da amostra.

A análise da figura permitiu a identificação de agrupamentos que, com algumas excepções, correspondem aos três pontos de amostragem seleccionados. Assim, o grupo 1 diz respeito às amostras das águas de lavagem. O grupo 2 agrega maioritariamente amostras das águas da centrífuga vertical, e o grupo 3 inclui as amostras de água ruça.

É visível um gradiente crescente de poluição desde o grupo 1 até ao grupo 3. As primeiras apresentam teores mais elevados de OD, e menor concentração de matéria orgânica, e no grupo 3 surgem amostras com elevado grau de poluição orgânica.

A ACP permitiu a extracção de quatro eixos factoriais, com base no critério de Kaiser (Eigenvalues>1). Analisaram-se as correlações de Pearson entre estes factoriais e os parâmetros físico-químicos medidos e os resultados apresentam-se na Tabela 2.5.

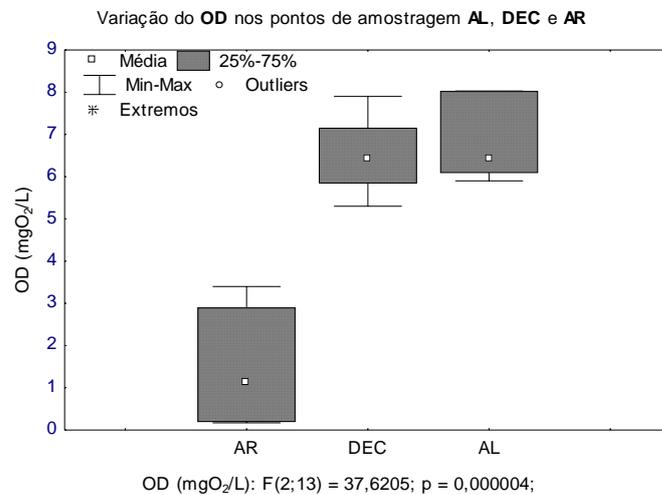


Figura 2.4. Projecção do parâmetro Oxigénio Dissolvido (OD), que apresenta valores significativamente distintos entre as águas ruças e os outros pontos de amostragem. O valor de p refere-se à análise ANOVA.

Com base nas correlações apresentadas e considerando a representação dos pontos de amostragem nos planos factoriais (Figura 2.6.b), as amostras das AL mostraram baixos teores de CQO, CBO, OG e nutrientes (K, P, e compostos azotados). Os valores destes parâmetros aumentaram nas amostras representadas no quadrante

esquerdo relativamente ao Factorial 1. Considerando as informações do plano Factorial 2, que apresenta elevadas correlações com o OD e com a Temp (Tabela 2.5.), as amostras da AR são aquelas que apresentam temperaturas médias mais elevadas associadas a teores baixos de OD, e cargas elevadas de matéria orgânica.

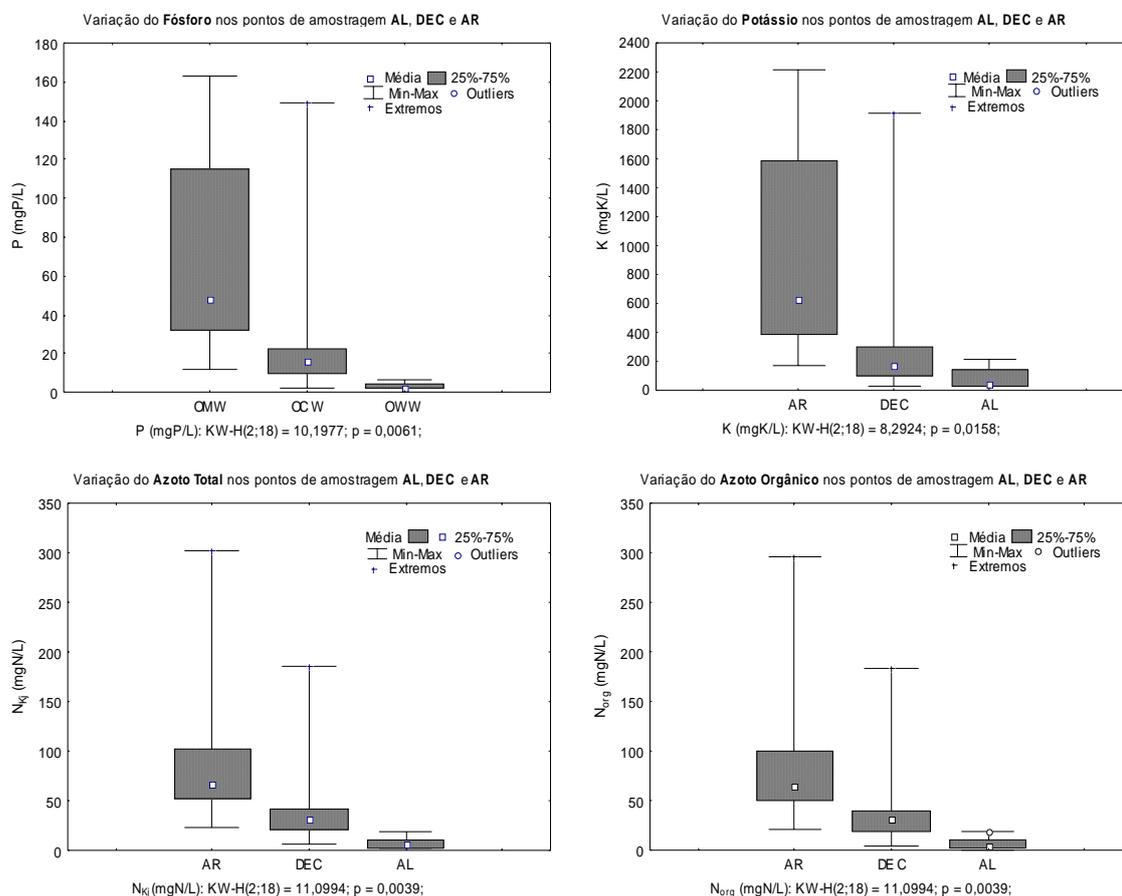
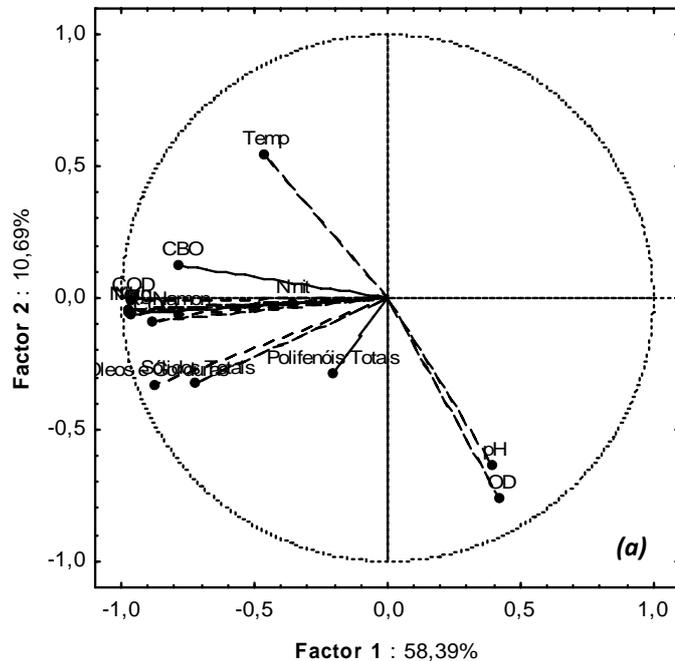


Figura 2.5. Projecção dos parâmetros físico-químicos cujas medições são significativamente diferentes entre os três pontos de amostragem. Projecção do Fósforo (P), Potássio (K), Azoto Total (N_{Kj}), e Azoto orgânico (N_{org}). Os valores de p referem-se à análise pelo teste de Kruskal-Wallis (KW-H).

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho e outros trabalhos previamente publicados (Paredes *et al.*, 1999), as águas residuais dos lagares de azeite apresentam algumas características físico-químicas, como sejam os teores elevados de nutrientes das plantas, que possibilitam a sua utilização como correctivos orgânicos. Os teores destes nutrientes, especialmente P, K, e compostos de N, são importantes factores para a fertilidade dos solos. Esta característica, associada às necessidades crescentes de racionalizar o uso de um recurso que escasseia – a água –, torna as águas ruças potenciais fertilizantes do solo, bem como fonte de irrigação para poupar

água limpa. Esta poderia ser uma forma económica de resolver parte do problema ambiental associado à eliminação de águas ruças (Paredes *et al.*, 1999, 2000, 2001; Casa *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2004; Mekki *et al.*, 2006).

Projectão dos Parâmetros Físico-Químicos no Plano Factorial



Projectão dos Pontos de Amostragem para o efeito dos Parâmetros Físico-Químicos no Plano Factorial

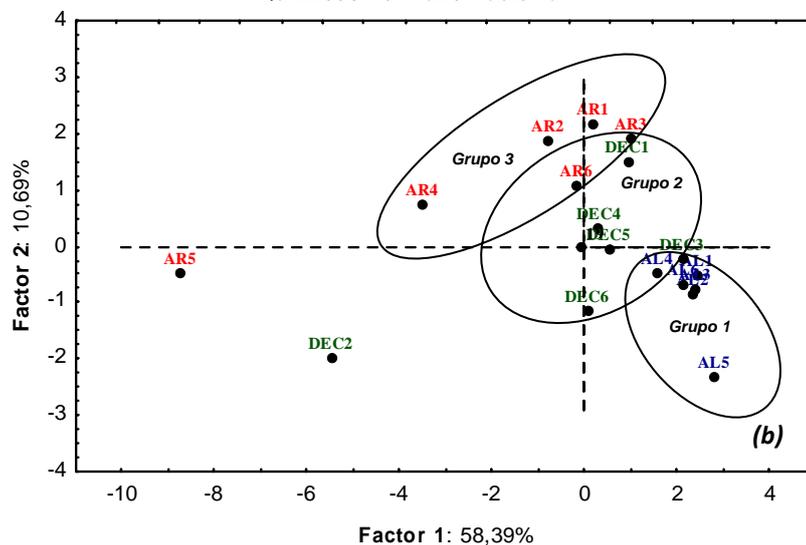


Figura 2.6. Projectão dos parâmetros físico-químicos no plano factorial **(a)** e projectão dos pontos de amostragem no primeiro plano factorial (F1 versus F2) obtido por Análise de Componentes Principais (ACP) **(b)**. Para projectar pontos de amostragem, onde existam dados em falta usou-se a opção “Mean substitution” (substituição pela média).

No entanto, a presença das fracções fenólica e lipídica limitam a sua aplicação directa nos solos sem tratamento prévio, devido à demonstrada actividade fitotóxica destes efluentes (Tsioulpas *et al.*, 2002; Casa *et al.*, 2003). Estes efeitos fitotóxicos, podem, no entanto, ser modificados e minimizados por processos químicos ou biológicos a ter lugar no próprio solo.

Tabela 2.5. Correlações de Pearson calculadas para os factores físico-químicos e os mais importantes planos factoriais extraídos da ACP. Os **E** representam os “Eigenvalues” de cada plano factorial extraído.

Parâmetros Físico-químicos	Factorial 1 E = 8.758	Factorial 2 E = 1.604	Factorial 3 E = 1.426	Factorial 4 E = 1.274
OD	ns	-0,76**	ns	ns
Temp	ns	0,55*	ns	ns
CQO	-0,88***	Ns	ns	ns
CBO	-0,78***	Ns	ns	ns
COD	-0,97***	Ns	ns	ns
ST	-0,72**	Ns	ns	ns
OG	-0,87***	Ns	ns	ns
PT	ns	Ns	ns	-0,71**
K	-0,97***	Ns	ns	ns
P	-0,97***	Ns	ns	ns
N _{Kj}	-0,98***	Ns	ns	ns
N _{amon}	-0,79***	Ns	ns	ns
N _{nit}	ns	Ns	0,65*	-0,60*
N _{org}	-0,98***	Ns	ns	ns

ns – correlação não significativa; * correlação significativa para $p=0,05$; ** correlação muito significativa para $p=0,01$; *** correlação altamente significativa para $p=0,001$.

Casa e colaboradores (2003) referem que a aplicação das águas ruças no solo, feita com bastante antecipação relativamente ao período de germinação, evita a sua toxicidade. Não referem, no entanto, que intervalo temporal deve, no mínimo, ser respeitado. Os compostos tóxicos ficarão retidos pelos minerais ou serão biologicamente alterados pelos microrganismos do solo.

Uma outra forma de utilização das águas ruças, sem recorrer a tratamentos específicos prévios, é a produção de composto com outros resíduos orgânicos (Paredes *et al.*, 2000, 2001; 2002). De uma forma geral, mesmo variando o outro material usado, obtêm-se bons compostados, revelados pelas concentrações elevadas de azoto orgânico, matéria orgânica estabilizada, e substâncias húmicas polimerizadas em maior quantidade (Paredes *et al.*, 2002).

Outras formas de utilização das águas ruças, como seja a produção de substâncias de valor acrescentado, produção de biogás ou reutilização de água para consumo, implicam tratamentos secundários e/ou terciários. O estabelecimento do

tratamento a aplicar é complexo e não é, ainda, conhecido um método com comprovada eficiência e rentabilidade económica, de aplicação a todos os sistemas de extracção, sendo numerosas as equipas de investigação que se dedicam a analisar as alternativas disponíveis.

4. Conclusões

Este trabalho demonstrou que na CAOM se geram dois tipos de efluentes com características distintas.

As águas de lavagem, caracterizadas por um menor índice de poluição, com menores teores em matéria orgânica, pH próximos da neutralidade e teores em OD mais elevados.

As águas da centrífuga vertical, juntamente com as águas ruças, formam outro tipo de efluente. Caracterizam-se por apresentarem elevados teores em matéria orgânica, altas temperaturas, e baixos valores de pH e oxigénio dissolvido.

Dada a elevada variabilidade encontrada nas características destes efluentes, a sua completa caracterização é fundamental para o estabelecimento do seu destino final. A análise dos parâmetros definidos de acordo com a legislação em vigor é morosa e dispendiosa. Este estudo permitiu definir parâmetros adequados, que em menor número, permitem, de forma estatisticamente significativa, determinar os restantes, e caracterizar adequadamente os fluxos de subprodutos gerados na CAOM.

Quanto às águas de lavagem, não foi possível indicar nenhum parâmetro capaz de permitir prever o comportamento de outros, o que confirmou o carácter distinto deste fluxo.

Os parâmetros CQO, COD, K, P, e compostos de azoto (N_{Kj} , N_{org}) revelaram ser os mais adequados para caracterizar cada um dos efluentes gerados na centrífuga vertical e na bacia da água ruça. A CQO e o COD surgem como os parâmetros que apresentam maiores correlações com os demais. A medição destes parâmetros permitirá calcular a maioria dos restantes.

Actualmente, os três fluxos são reunidos numa única bacia de sedimentação. Dado que as características das águas de lavagem são significativamente diferentes das apresentadas pelos outros fluxos, considera-se que estas poderiam ser reutilizadas para lavagem das azeitonas. Para tal, teria de se proceder a um processo de tratamento que incluiria sedimentação seguida de decantação. Após estes processos, seguir-se-ia um tratamento aeróbio utilizando leveduras adaptadas e isoladas a partir do próprio efluente. Estas foram já isoladas e já estão disponíveis no grupo de trabalho. Esta forma poderá reduzir o fluxo de água residual que aflui à bacia de sedimentação e, ainda, reduzir o consumo de água potável que é usada para lavar os frutos.





Capítulo

3

Caracterização microbiológica das águas residuais de um lagar contínuo de três fases

1. Introdução

Os microrganismos são importantes em todos os ecossistemas e a sua ubiquidade é devida, essencialmente, ao seu pequeno tamanho, à capacidade de crescer e multiplicar-se, em condições aeróbias e anaeróbias, e à grande versatilidade metabólica que lhes permite utilizar uma vasta gama de compostos, simples ou complexos, como nutrientes para o seu crescimento (Kumar *et al.*, 2004).

O potencial de adaptação dos microrganismos aos diversos ambientes atrai a atenção de várias áreas da indústria, uma vez que conseguem utilizar uma vasta gama de substâncias complexas, que convertem em moléculas simples: aminoácidos, nucleótidos, glúcidos e ácidos gordos (metabolitos primários) que depois utilizam para produzir proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, polissacáridos e lípidos, que são redireccionados para o seu crescimento.

São também bem conhecidas as capacidades que os microrganismos têm para quebrar moléculas complexas de origem natural ou xenobiótica, sob condições ambientais stressantes. Em todo o mundo, rios e pontos de água recebem descargas de águas residuais das mais diversas actividades humanas, que são primariamente biorremediados devido à presença de populações autóctones de microrganismos que, rapidamente, se adaptam a estas condições (Sánchez e Olson, 2005).

Vários autores procederam à caracterização microbiológica de diversos habitats, quer naturais, que incluem amostras de solos em rios e oceanos (Brusa *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2004; Wuczkowski e Prillinger, 2004), quer industriais. Estes últimos reportam-se a produtos lácteos, vínicos e de outras fermentações alcoólicas, manufactura de enchidos e outros produtos alimentares (Silva *et al.*, 2000; Baruzzi *et al.*, 2006; Floréz e Mayo, 2006; Laitila *et al.*, 2006; Lopandic *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006). A caracterização microbiológica de águas residuais surge, frequentemente, associada a efluentes domésticos, devido à sua importância para a vida humana, ou ainda a alguns tipos de águas residuais industriais e agro-industriais (Liu *et al.*, 2002; Eschenhagen *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2008).

As águas ruças, sendo um tipo de efluente agro-industrial, apresentam algumas características particulares, já discutidas anteriormente, que tornam o seu tratamento difícil pelas formas convencionais. A utilização de tratamentos biológicos, economicamente mais viáveis e tecnicamente fiáveis, fica restringida pelas capacidades dos consórcios microbianos em resistir às características desfavoráveis das águas ruças. Este efeito é notório nos processos de digestão anaeróbia, aparentemente os mais adequados para tratar efluentes com características de carga orgânica como as apresentadas pelas águas ruças.



Muitos tratamentos biológicos, quer aeróbios (Piperidou *et al.*, 2000), quer anaeróbios (Borja *et al.*, 1996; Dalis *et al.*, 1996; Gharsallah *et al.*, 1999), têm sido investigados para valorização das AR. De acordo com Azbar *et al.* (2004), os filtros anaeróbios ou reactores anaeróbios de fluxo ascendente são os mais adequados, mas reforça a necessidade de tratar previamente as AR, no sentido de remover os compostos mais recalcitrantes ou que possam inibir a digestão.

Os trabalhos de investigação sobre as formas de tratamento ou valorização das AR têm-se centrado, principalmente, na remoção dos compostos fenólicos, responsáveis pela cor escura apresentada por estas águas (Tsioulpas *et al.*, 2002), já que a degradação destes é considerado o factor limitante para o biotratamento das águas ruças (Martirani *et al.*, 1996).

Apesar de todos os problemas ambientais inerentes a este subproduto, já foi testada a sua utilização como uma fonte de açúcares simples e complexos, passíveis de fermentação (Crognale *et al.*, 2003) ou meio de crescimento de microrganismos capazes de produzir enzimas lipolíticas (Scioli e Vollaro, 1997, D'Annibale *et al.*, 2006).

São vários os trabalhos publicados que utilizam microrganismos para o tratamento ou pré-tratamento das águas ruças (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Scioli e Vollaro, 1997; Piperidou *et al.*, 2000; Robles *et al.*, 2000; Di Gioia *et al.*, 2001a,b; Fontoulakis *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Ayed e Hamdi, 2003; Ettayebi *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2003, Dias *et al.*, 2004; Giannoutsou *et al.*, 2004; Lanciotti *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 2006; Dhouib *et al.*, 2006a,b; Martinez-Garcia *et al.*, 2007; Ben Othman *et al.*, 2008; Papanikolaou *et al.*, 2008). Nestes trabalhos incluem-se bactérias, fungos filamentosos e leveduras. No entanto, os isolados, referidos na bibliografia anteriormente citada, foram obtidos de forma mais ou menos aleatória.

Dois publicações apresentam uma caracterização microbiológica de águas residuais de lagares de azeite marroquinos, onde se mostra que, contrariamente ao esperado, existe uma grande abundância e diversidade microbiana nestes meios (Mouncif *et al.*, 1993; Sassi *et al.*, 2006). Giannoutsou e colaboradores (2004) procederam, também, a uma caracterização microbiológica que contemplou apenas amostragens para leveduras e em lagares de duas fases (ecológicos). Em Portugal, Eusébio e colegas (2007) procederam a uma caracterização das comunidades microbianas existentes em águas ruças, mas quando sujeitas a tratamento aeróbio.

Dado o comprovado efeito benéfico de muitos isolados microbianos na eliminação de características recalcitrantes das águas ruças, uma caracterização microbiológica acurada das águas residuais dos lagares, seguida do isolamento e identificação de espécies com características adaptativas provadas, será uma fonte de



informação imprescindível para estabelecer formas de tratamento biológico, simultaneamente eficazes e economicamente viáveis.

Assim, efectuou-se uma caracterização microbiológica das águas geradas após a extracção do azeite na Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça (CAOM), com o objectivo de:

1 – Quantificar três grupos de populações microbianas existentes nos fluxos de águas residuais do lagar: heterotróficos totais, fungos filamentosos e leveduras, determinando as suas abundâncias relativas;

2 – Determinar a existência de variações na abundância microbiana influenciadas pela campanha de extracção, período da campanha, e tipo de efluente gerado ao longo do processo de extracção;

3 – Avaliar os efeitos dos diferentes parâmetros físico-químicos sobre a flora microbiológica presente nos diferentes pontos do processo de extracção.

2. Material e Metodologia

2.1. Amostragem e Contagens de Microrganismos

Para atingir os objectivos propostos foram utilizadas as mesmas amostras recolhidas para a caracterização físico-química. A forma como foi realizada a amostragem e os locais seleccionados foram descritos no capítulo anterior.

Para quantificar grupos microbianos foram escolhidos meios de cultura selectivos para efectuar contagem em placa, nomeadamente específicos para **Heterotróficos Totais, Fungos Filamentosos e Leveduras**. Após diluição de 1 mL de cada amostra em 10 mL de água peptonada (0,1% p/v), prepararam-se diluições decimais seriadas, de forma a obter contagens de Unidades Formadoras de Colónias (**UFC**) entre 30 e 300 por placa. 100 µL das correspondentes diluições decimais foram inoculadas em três meios de cultura distintos: Plate Count Agar (**PCA** – Difco) para Heterotróficos Totais, Potato Dextrose Agar (**PDA** – Difco) para fungos filamentosos, Yeast Malt Agar (**YMagar** – Difco) suplementado com Rose Bengal (0,1% p/v) para leveduras. Os meios de cultura foram preparados em conformidade com as indicações do fabricante.

Após inoculação, as placas foram incubadas a 20°C, 25°C e 30°C durante oito dias, tendo-se efectuado a contagem das UFC. Os valores médios obtidos com três réplicas por amostra, por meio de cultura e por temperatura de incubação foram usados para a análise numérica que se apresenta nos resultados.



2.2. Análise numérica

A análise dos resultados obtidos para as contagens microbiológicas foi efectuada recorrendo ao software STATISTICA 7 para Windows. Para os pontos de amostragem considerados, foram analisadas as correlações entre os parâmetros microbiológicos e os parâmetros físico-químicos responsáveis pela toxicidade apresentada por estas águas residuais.

3. Resultados e Discussão

As águas residuais analisadas neste estudo tiveram três proveniências distintas, águas de lavagem (AL), águas da centrífuga vertical (DEC) e águas ruças (AR), como já referido no capítulo dois. Os resultados obtidos, relativamente à caracterização microbiológica, serão apresentados considerando de forma separada cada um dos pontos de amostragem e cada grupo microbiológico. Foram efectuadas recolhas de amostras em períodos distintos das campanhas de extracção. As culturas para contagem em placa foram incubadas a três temperaturas distintas: 20°C, 25°C e 30°C. Não se detectaram diferenças estatisticamente significativas entre as contagens obtidas nas três temperaturas de incubação testadas, em nenhum dos pontos de amostragem considerados. Por esta razão, os resultados apresentados resultam da média das contagens de UFCs efectuadas nas placas incubadas a 25°C.

As contagens médias obtidas para o grupo heterotróficos totais foram sempre superiores às obtidas para os grupos de fungos filamentosos e leveduras. Estas diferenças foram notórias nas recolhas efectuadas nas águas de lavagem, comparativamente com as contagens resultantes das recolhas efectuadas na centrífuga vertical e nas águas ruças.

Os heterotróficos, e de forma semelhante, os fungos e as leveduras, mostraram uma pequena diminuição da abundância, a meio das campanhas de extracção, que depois aumentou para contagens próximas das obtidas no início das campanhas de extracção.

Não houve diferenças significativas entre as contagens de UFC das amostras recolhidas nos anos 2003/2004 comparativamente com as obtidas para a campanha de 2004/2005 em nenhum ponto de amostragem.

3.1. Caracterização Microbiológica das Águas de Lavagem

A Tabela 3.1. resume as contagens obtidas para as amostras efectuadas nas águas de lavagem. A sua análise permite verificar que a abundância microbiana encontrada é elevada. Este facto reflecte-se em todos os grupos microbianos estudados, mas particularmente nos heterotróficos.



Relativamente a este grupo, comparando as contagens de colónias obtidas para as três datas de amostragem em cada campanha, AL1, AL2, AL3 para a campanha 2003/2004 (média = $1,64 \times 10^9$) e AL4, AL5 e AL6 para a campanha 2004/2005 (média = $1,50 \times 10^9$) verifica-se que não existem diferenças significativas entre as duas campanhas de extracção.

Tabela 3.1. Variação das médias de contagens de UFC obtidas durante e entre campanhas de extracção das amostras recolhidas nas águas de lavagem (AL). Os valores de p foram calculados com base nas contagens efectuadas entre datas de amostragem em cada campanha.

Ponto Amostragem	Data Recolha	Heterotróficos		Fungos Filamentosos		Leveduras	
		Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p
Água de Lavagem	AL1	$3,96 \times 10^9$		$5,62 \times 10^8$		$4,49 \times 10^8$	
	AL2	$2,17 \times 10^8$	0,0000	$8,45 \times 10^6$	0,0002	$6,16 \times 10^6$	0,0000
	AL3	$7,40 \times 10^8$	(***)	$3,29 \times 10^7$	(***)	$3,11 \times 10^7$	(***)
	AL4	$1,57 \times 10^9$		$5,74 \times 10^7$		$1,79 \times 10^8$	
	AL5	$3,90 \times 10^8$	0,0462	$1,44 \times 10^8$	0,1796	$5,56 \times 10^7$	0,0024
	AL6	$2,55 \times 10^9$	(*)	$4,39 \times 10^8$	(n.s.)	$3,63 \times 10^8$	(**)

AL1 – água lavagem Dezembro 2003; AL2 – água lavagem Janeiro 2004; AL3 – água lavagem Fevereiro 2004; AL4 – água lavagem Dezembro 2004; AL5 – água lavagem Janeiro 2005; AL6 – água lavagem Fevereiro 2005. (ns) Não Significativo; (*) Significativo para $p < 0,05$; (**) Muito Significativo para $p < 0,01$; (***) Altamente Significativo para $p < 0,001$.

Quando se estabelece uma comparação para verificar se existem diferenças significativas entre datas de amostragem, em cada campanha, obtêm-se resultados distintos. De facto, na campanha 2003/2004, em todos os grupos microbianos estudados existem diferenças significativas entre as datas de amostragem (Tabela 3.1). As amostras recolhidas à data correspondente ao meio da campanha de extracção (AL2 e AL5) apresentaram uma diminuição altamente significativa ($p < 0,001$) da abundância microbiana em todos os grupos estudados. Os microrganismos apresentaram, para o final da campanha, uma subida das suas populações, mas ainda sem atingir os valores obtidos no início do processo de extracção.

Observou-se um comportamento semelhante nas populações estudadas, na segunda campanha de extracção analisada (2004/2005). No entanto, neste segundo período de análise, a significância estatística não foi a mesma para todas as populações microbianas analisadas, nem tão expressiva, como na campanha anterior. As diferenças mais significativas observaram-se no grupo das leveduras ($p < 0,01$), sendo significativas para o grupo dos heterotróficos ($p < 0,05$) e sem significância estatística no caso dos fungos filamentosos.



Nas águas de lavagem, verificou-se que as variáveis dependentes definidas inicialmente – campanhas de extracção diferentes, e momentos distintos de recolha de amostras durante cada campanha – não afectaram, de igual forma, as comunidades microbianas encontradas nas águas. Já foi referido no Capítulo dois que durante o período em análise, as instalações da Cooperativa sofreram alterações, não só de localização física, como de alguma maquinaria, nomeadamente a que serve para a lavagem das azeitonas. Efectivamente, na primeira campanha de extracção analisada, as lavadoras estavam localizadas dentro das instalações, enquanto na segunda campanha, a sua localização era no exterior. Para além deste facto, na segunda campanha, as águas resultantes da lavagem poderiam ficar armazenadas dentro das lavadoras por períodos de tempo indeterminados. Apesar destes factores, que se julgava terem algum efeito nos resultados obtidos para as contagens microbianas, tal não foi verificado.

Já no que diz respeito ao período da campanha em que se efectuam as amostras, os resultados parecem demonstrar algum efeito. Verificou-se, em ambas as campanhas, mas de forma mais notável na campanha 2003/2004, que na segunda data de amostragem ocorre uma redução significativa na abundância relativa dos três grupos microbianos estudados. Esta diminuição é acompanhada por um incremento dos teores de óleos e gorduras e diminuição marcada da temperatura das águas (Tabela 2.2. – Capítulo 2).

3.2. Caracterização Microbiológica das Águas da Centrífuga Vertical

As águas da centrífuga vertical foram recolhidas imediatamente à saída da mesma, após a separação das fases oleosa e aquosa. Este efluente é constituído maioritariamente pela água de vegetação da azeitona, que foi esmagada, e por alguma água que foi adicionada no processo de termobatedura. Estas duas operações físicas precedentes criaram uma emulsão de onde o azeite foi separado. Como apresentado e discutido no capítulo anterior (Tabela 2.2), a água da centrífuga possui quantidades mais elevadas de matéria orgânica em suspensão, teores elevados de elementos minerais e gordura e compostos fenólicos que não ficaram retidos na fase oleosa.

As populações de microrganismos, contabilizadas neste ponto de amostragem, foram elevadas em todas as datas de amostragem, nas duas campanhas de extracção (Tabela 3.2.). É, no entanto, de ressaltar, que as contagens efectuadas nas placas com heterotróficos foram maioritariamente dominadas por fungos. Relativamente a este grupo microbiano (heterotróficos totais) destaca-se o facto de seu número ter apresentado uma diminuição significativa, quando comparado com as contagens das águas de lavagem (Tabela 3.1.). Os valores médios para heterotróficos na campanha



2003/2004 desceram de $1,7 \times 10^9$ para $1,1 \times 10^7$, e na de 2004/2005 de contagens com $1,5 \times 10^9$ passou-se para $3,5 \times 10^6$. Verificou-se, ainda, uma quase sobreposição entre os valores medidos para fungos e leveduras, com os obtidos para heterotróficos. Estes resultados corroboram a ideia de que as bactérias apresentam maiores dificuldades de adaptação a habitat com pH baixos e com alguns compostos que inibem o seu crescimento, mas comumente encontrados nas águas ruças, como os fenóis, ou os taninos (Sayadi *et al.*, 2000; Sassi *et al.*, 2006).

Tabela 3.2. Variação das médias de contagens de UFC obtidas durante e entre campanhas de extracção das amostras recolhidas nas águas da centrífuga (DEC). Os valores de p foram calculados com base nas contagens efectuadas entre datas de amostragem em cada campanha.

Ponto Amostragem	Data Recolha	Heterotróficos		Fungos Filamentosos		Leveduras	
		Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p
Centrifuga	DEC1	$1,15 \times 10^7$	0,2851	$1,48 \times 10^7$	0,0435	$7,78 \times 10^5$	0,0459
Vertical	DEC2	$4,03 \times 10^6$	(n.s.)	$3,77 \times 10^6$	(*)	$4,98 \times 10^6$	(*)
	DEC3	$1,69 \times 10^7$		$2,05 \times 10^7$		$8,15 \times 10^6$	
	DEC4	$2,93 \times 10^6$		$1,31 \times 10^6$		$6,06 \times 10^5$	
	DEC5	$5,50 \times 10^6$	0,3645	$3,54 \times 10^6$	0,1426	$4,12 \times 10^6$	0,0019
	DEC6	$2,03 \times 10^6$	(n.s.)	$1,36 \times 10^6$	(n.s.)	$5,82 \times 10^5$	(**)

DEC1 – centrífuga vertical Dezembro 2003; **DEC2** – centrífuga vertical Janeiro 2004; **DEC3** – centrífuga vertical Fevereiro 2004; **DEC4** – centrífuga vertical Dezembro 2004; **DEC5** – centrífuga vertical Janeiro 2005; **DEC6** – centrífuga vertical Fevereiro 2005. (ns) Não Significativo; (*) Significativo para $p < 0,05$; (**) Muito Significativo para $p < 0,01$; (***) Altamente Significativo para $p < 0,001$.

De forma distinta aos resultados obtidos para as águas de lavagem, neste ponto de amostragem, foram poucas as diferenças significativas entre datas de recolha, nos grupos microbianos estudados. Na primeira campanha de extracção apenas houve diferenças significativas ($p < 0,05$) para fungos e leveduras. Já na segunda campanha, apenas as leveduras apresentaram diferenças muito significativas ($p < 0,01$) entre as datas de amostragem. Também nos grupos fungos filamentosos e leveduras, houve uma marcada diminuição das populações entre este ponto de amostragem e as águas de lavagem. Tal facto não é inesperado, uma vez que as águas deste local apresentaram já características de carga orgânica muito elevada, baixos pH, e presença de compostos menos favoráveis ao desenvolvimento de comunidades microbianas.

3.3. Caracterização Microbiológica das Águas Ruças

Este efluente, muito semelhante às águas da centrífuga vertical, difere destas, pois fica depositado numa pequena bacia localizada logo após a centrífuga, sendo depois enviado para o exterior das instalações.



Estas águas apresentam características muito semelhantes às referidas para as da centrífuga vertical, o que pode ser confirmado pela análise das tabelas e gráficos analisados no capítulo dois, e as diferenças encontradas poderão ser consequência de períodos mais ou menos longos de deposição.

Aparentemente, o período de deposição não afectou o microbiota, já que as contagens médias de UFC obtidas para os heterotróficos, fungos filamentosos e leveduras, não foram muito diferentes dos verificados nas águas da centrífuga vertical (Tabela 3.1, Tabela 3.2 e Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Variação das médias de contagens de UFC obtidas durante e entre campanhas de extracção das amostras recolhidas nas águas ruças (AR). Os valores de p foram calculados com base nas contagens efectuadas entre datas de amostragem em cada campanha.

Ponto Amostragem	Data Recolha	Heterotrófico		Fungos Filamentosos		Levedura	
		Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p	Média UFC/mL	valor p
Água Ruça	AR1	1,68x10 ⁸	0,0000	4,89x10 ⁶	0,0047	5,12x10 ⁶	0,2931
	AR2	1,14x10 ⁷	(***)	3,67x10 ⁶	(**)	1,66x10 ⁶	(n.s.)
	AR3	6,10x10 ⁶		2,73x10 ⁶		1,63x10 ⁶	
	AR4	9,98x10 ⁵		3,54x10 ⁵		8,12x10 ⁵	
	AR5	7,63x10 ⁶	0,3645	5,50x10 ⁶	0,5325	4,35x10 ⁶	0,4866
	AR6	6,56x10 ⁶	(n.s.)	5,56x10 ⁶	(n.s.)	4,14x10 ⁶	(n.s.)

AR1 – água ruça Dezembro 2003; AR2 – água ruça Janeiro 2004; AR3 – água ruça Fevereiro 2004; AR4 – água ruça Dezembro 2004; AR5 – água ruça Janeiro 2005; AR6 – água ruça Fevereiro 2005. (ns) Não Significativo; (*) Significativo para p <0,05; (**) Muito Significativo para p <0,01; (***) Altamente Significativo para p <0,001.

Efectivamente, e no que respeita aos **heterotróficos**, também neste ponto de amostragem a população apresentou contagens mais baixas do que as verificadas para as águas de lavagem, e com valores semelhantes aos da centrífuga. No DEC passou-se de 1,1x10⁷ (2003/2004) e 3,5x10⁶ (2004/2005), para, na AR de 6,2x10⁷ (2003/2004) e 5,1x10⁶ (2004/2005). Os outros grupos estudados apresentaram um comportamento semelhante. Os **fungos filamentosos** variaram de 1,3x10⁷ (2003/2004) e 2,1x10⁶ (2004/2005) da centrífuga, para 3,8x10⁶ (2003/2004) e 3,8x10⁶ (2004/2005) na bacia de sedimentação. Já no que diz respeito ao grupo das **leveduras** as contagens médias obtidas na campanha 2003/2004 baixaram apenas ligeiramente de 4,6x10⁶ para 2,8x10⁶, enquanto na campanha seguinte se verificou para este grupo um aumento ligeiro do número médio de colónias obtidas de 1,8x10⁶ para 3,1x10⁶.



À semelhança do que aconteceu relativamente às águas do decanter, a diminuição das populações relativamente à obtida para as águas de lavagem é a mais expressiva. Entre as amostras da centrífuga e as finais, não se encontram diferenças significativas.

Considerando as contagens obtidas neste ponto de amostragem, no que respeita às campanhas, não houve, mais uma vez, diferença estatística significativa. Entre datas de amostragem, as situações variaram. Assim, na campanha de 2004/2005, o momento da recolha não interferiu nas contagens obtidas em nenhum dos grupos microbianos estudados. Na campanha anterior, apenas as leveduras não revelaram diferenças entre datas de amostragem, enquanto que os heterotróficos apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) e os fungos filamentosos diferenças muito significativas ($p < 0,01$).

Estas diferenças estarão relacionadas com as condições ambientais verificadas neste ponto de amostragem. O grupo mais afectado foi o dos heterotróficos, como consequência provável do aumento do teor em polifenóis totais, óleos e gorduras e carga orgânica, em associação à diminuição de pH e quantidade de oxigénio dissolvido no meio. Estas observações levam ainda a inferir que a população de leveduras presente estará bem adaptada ao ambiente em questão.

3.4. Correlações estatísticas entre parâmetros microbiológicos e parâmetros físico-químicos

Efectuou-se uma análise estatística de forma a identificar possíveis correlações entre as variações verificadas nas abundâncias dos grupos microbianos estudados, e os parâmetros físico-químicos medidos, nos diferentes pontos de amostragem.

Considerando uma distribuição normal das amostras, uma análise de variância (ANOVA) dos parâmetros microbiológicos mostra que apenas o ponto de amostragem **água de lavagem** (AL) pode ser discriminado em relação aos outros dois locais de amostragem (Figura 3.1).

Nas contagens efectuadas, apenas os heterotróficos apresentaram diferenças significativas, enquanto as efectuadas para os outros dois grupos se sobrepõem nos três locais. A significância estatística não é a mesma, isto é, para heterotróficos as diferenças são muito significativas ($p < 0,01$) e para leveduras e fungos, apenas significativas ($p < 0,05$). A abundância relativa de fungos e leveduras é muito semelhante quer em DEC, quer em AR.

Efectuou-se ainda uma Análise de Componentes Principais (ACP), considerando as contagens dos microrganismos, tendo-se verificado que estes não são capazes de distinguir nem os pontos de amostragem, nem as datas de amostragem (dados não



apresentados). Testou-se ainda o efeito dos parâmetros físico-químicos nas contagens microbianas, com o objectivo de identificar, qual ou quais os que mais afectavam o tamanho das populações microbianas. Também neste caso os resultados obtidos não se mostraram conclusivos.

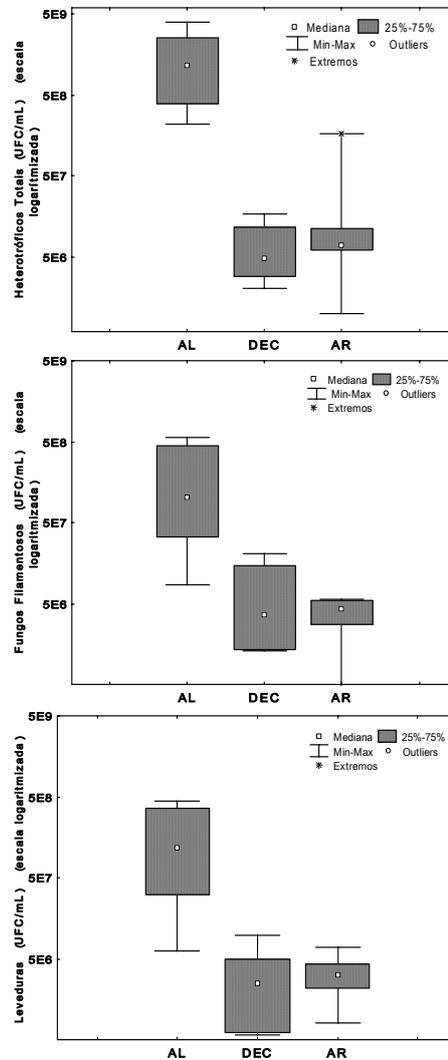


Figura 3.1. Representação da distribuição dos parâmetros microbiológicos Heterotróficos, Fungos Filamentosos e Leveduras nos pontos de amostragem considerados AL, DEC e AR no conjunto das duas campanhas de amostragem (2003/2004 e 2004/2005).

É, no entanto, importante ressaltar que, apesar do aumento da toxicidade ambiental, já analisada no capítulo anterior, e que se revelou essencialmente pelo aumento dos teores em matéria orgânica, em gordura e polifenóis e nutrientes, e diminuição do pH, os heterotróficos pareceram ser o grupo mais afectado, já que em média as suas contagens desceram de $9,1 \times 10^8$ UFC/mL nas AL para $7,2 \times 10^6$ e $3,3 \times 10^7$ UFC/mL no DEC e AR, respectivamente. Já no que se refere aos fungos e às leveduras,



a diminuição da abundância das populações não foi tão marcada, levando a crer que estes organismos apresentam maiores capacidades de adaptação a estes ambientes.

Resultados semelhantes foram já publicados por vários autores que usaram isolados de fungos dos géneros *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Coriolopsis* e *Lentinula* (Robles *et al.*, 2000; Fontoulakis *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2004; Dhouib *et al.*, 2006a,b), ou isolados de leveduras dos géneros *Candida* e *Yarrowia* (Ettayebi *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Giannoutsou *et al.*, 2004; Lanciotti *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 2006; Martinez-Garcia *et al.*, 2007; Papanikolaou *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2008) para procederem a tratamentos ou pré-tratamentos de águas ruças. Apesar destes trabalhos não terem tido como objectivo caracterizar os ambientes de onde foram obtidos os isolados estudados, reflectem a existência de diversas espécies de microrganismos com capacidade de se desenvolverem em ambientes stressantes. No trabalho que aqui se apresenta, foi possível também obter contagens significativas de vários grupos microbianos a partir das águas de lavagem, águas da centrífuga vertical e águas ruças da CAOM, reflectindo mais uma vez as capacidades adaptativas dos microrganismos.

A maior parte da literatura disponível refere que a toxicidade destas águas residuais, para além da sua elevada carga orgânica, resulta, essencialmente, da presença de elevados teores de compostos fenólicos e ácidos gordos livres (Sayadi *et al.*, 2000; Sassi *et al.*, 2006). Os fungos da podridão branca estão entre os microrganismos capazes de degradar fracções dos compostos fenólicos, nomeadamente as de baixo peso molecular, referenciadas como as mais tóxicas. Conseguem metabolizá-las recorrendo à acção de enzimas lenhínicas como a peroxidase da lenhina (LiP) ou a peroxidase dependente do manganésio (MnP) (Sayadi *et al.*, 2000). Apesar da acção dos fungos, o efeito de toxicidade não desaparece das AR tratadas. Este facto resulta, provavelmente, da formação de compostos mais tóxicos como os radicais fenoxi, ou ainda porque as enzimas lenhínicas referidas acima são inibidas pelas fracções fenólicas de elevado peso molecular (Sayadi *et al.*, 2000), que continua recalcitrante mesmo após o tratamento com os fungos.

A determinação do(s) factor(es) de toxicidade destas águas residuais é ainda pouco consensual, e até em parte desconhecido. Num trabalho efectuado em Portugal, Paixão e colaboradores (1999) provaram a elevada toxicidade destas águas, independentemente do processo de extracção do azeite utilizado. No mesmo estudo, que tinha como objectivo determinar parâmetros físico-químicos responsáveis pela toxicidade das AR, ficou clara a dificuldade na sua determinação. Efectivamente, este grupo de trabalho encontrou correlações entre a toxicidade para espécies como



Tamnocephalus platyurus ou *Daphnia magna* e parâmetros como a CQO, sólidos, compostos de azoto, taninos e lenhinas, mas não encontrou correlações significativas com parâmetros vulgarmente referidos na bibliografia, como os fenóis ou óleos e gorduras. Outras publicações referem, também, que estirpes de fungos (Sayadi *et al.*, 2000) ou leveduras (Peixoto *et al.*, 2008) usadas para pré-tratar AR revelaram que a diminuição da concentração de taninos diminui o seu efeito inibidor, enquanto outros mostraram ainda que a diminuição na concentração de fenóis não diminuiu o efeito tóxico das águas tratadas (Tsioulpas *et al.*, 2002). Ainda Hamdi *et al.* (1992) apresentaram conclusões similares, referindo que os compostos fenólicos apresentam pouca toxicidade mas não são biodegradáveis, em oposição aos taninos, que são altamente tóxicos, mas biodegradáveis.

Os resultados encontrados nesta tese aproximam-se dos referidos no parágrafo anterior, já que a variação do conteúdo em polifenóis não foi acompanhada por variações correlacionadas das contagens de UFC em nenhum dos grupos microbianos analisados, ou em qualquer dos pontos de amostragem. Por outro lado, o aumento da carga orgânica, principalmente CQO, COD, sólidos totais e óleos e gorduras, a diminuição do pH e teor em OD, pareceram afectar as contagens.

Devido às elevadas contagens de microrganismos encontradas, particularmente no que se refere aos grupos fungos filamentosos e leveduras, é de supor que estes microrganismos apresentam maior resistência às condições de toxicidade destes meios.

Das publicações consultadas, apenas se encontraram referências a caracterizações microbiológicas de efluentes de lagares de azeite em três artigos. Destas, duas referem-se a lagares de azeite que fazem a extracção em contínuo e de forma tradicional (Mouncif *et al.*, 1993; Sassi *et al.*, 2006) e a terceira analisa o microbiota encontrado na lama proveniente de um lagar de duas fases (ecológico) (Giannoutsou *et al.*, 2004). O trabalho de Sassi e colaboradores (2006) apenas faz uma caracterização da abundância média de microrganismos encontrados em vários lagares, mas não procedem a nenhuma identificação das espécies. Os resultados destes investigadores mostram, que à semelhança do que se obteve neste trabalho, a abundância microbiana é elevada e inclui bactérias (aeróbias), leveduras e fungos filamentosos. Também fica evidente que as colónias contabilizadas são maioritariamente dominadas por leveduras e fungos.

O trabalho de Mouncif e seus colaboradores (1993) mostra que a contagem de colónias é bastante elevada, e também se obtiveram quer bactérias, quer leveduras e fungos filamentosos. Este grupo identificou alguns isolados de leveduras, tendo encontrado indivíduos pertencentes aos géneros *Pichia* e *Debaryomyces* (os mais abundantes), *Saccharomyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* e *Rhodotorula*. Estas



identificações foram, contudo, realizadas com base apenas em testes fisiológicos e bioquímicos.

Das lamas resultantes da extracção em duas fases Giannoutsou e colaboradores (2004) apenas procuraram conhecer a diversidade em leveduras não tendo efectuado estudos para determinar a abundância dos diferentes grupos do microbiota.

4. Conclusões

Este trabalho revelou uma elevada abundância de microrganismos nos três pontos de amostragem de águas residuais, sendo o seu número particularmente e significativamente elevado nas águas de lavagem.

A campanha de extracção não influenciou a abundância dos grupos microbianos amostrados. O período da campanha em que as amostras foram recolhidas afectou as contagens de formas distintas.

No início das campanhas, as populações estavam presentes em números elevados que decrescem a meio da mesma, como consequência provável da laboração nesse momento ser mais intensiva. As populações de heterotróficos, fungos filamentosos e leveduras, tendem a mostrar uma recuperação no final das campanhas de extracção, como resposta adaptativa às condições do meio ambiente.

As populações de leveduras e fungos filamentosos revelaram maior capacidade de resistir ao ambiente menos favorável, uma vez que as suas abundâncias, relativamente à população de heterotróficos, se mantiveram mais elevadas, dominando as contagens dos heterotróficos.

Não foi possível estabelecer correlações com significância estatística entre as populações microbianas investigadas, e os parâmetros físico-químicos medidos. No entanto, o aumento da carga orgânica, diminuição do pH e teor em oxigénio dissolvido, foram identificados como os factores físico-químicos que mais contribuíram para a diminuição das populações microbianas, e determinaram os diferentes equilíbrios entre elas.





Capítulo

4

Isolamento e caracterização das leveduras das águas residuais do lagar contínuo de três fases

1. Introdução

Na sequência da caracterização microbiológica das águas residuais apresentada no capítulo anterior verificou-se que os fungos, em particular as leveduras, são bastante abundantes ao longo do processo de extracção do azeite. Desta forma, o seu conhecimento e caracterização poderão ser determinantes para a selecção de novas espécies com potencial para ser utilizadas no tratamento das águas residuais dos lagares.

Neste trabalho, o processo de selecção de isolados fez-se apenas no grupo das leveduras. A justificação reside no facto conhecido de que muitas espécies bacterianas são inibidas pelas águas ruças (Kotsou *et al.*, 2004; Khoufi *et al.*, 2006). Já no que se refere aos fungos filamentosos, apesar de ser reconhecida a sua eficiência na degradação de compostos fenólicos, também é conhecida a dificuldade de aplicação destes isolados em tratamentos a escalas de dimensão superior à laboratorial, particularmente devido a problemas de esponjamento (“foaming”) que provocam em ETAR, pela sua constituição filamentosa (Assas *et al.*, 2000; López *et al.*, 2002).

As leveduras são um grupo com elevada importância económica (medicinal, alimentar e agrícola entre outras) e a descoberta de novas espécies ou de novas estirpes de espécies já descritas, bem como a sua correcta identificação é muito importante (Wuczowski e Prillinger, 2004). É assumido que apenas pouco mais de 1% desta comunidade existente na natureza é conhecida (Fell *et al.*, 2000).

No que respeita a leveduras isoladas de habitats naturais, na sua maior parte, a identificação é efectuada recorrendo a características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de acordo com os testes convencionais (Barnett *et al.*, 2000). No entanto, estas análises são muito morosas e laboriosas, sendo necessária uma experiência relevante para analisar e interpretar correctamente cerca de 60 a 90 testes específicos (Fell *et al.*, 2000; Sabate *et al.*, 2002; Wuczowski e Prillinger, 2004; Lopandic *et al.*, 2006). Apesar das dificuldades, o conhecimento das propriedades bioquímicas e fisiológicas de leveduras pode ser importante em termos biotecnológicos, especialmente para a diferenciação de estirpes envolvidas em processos de fermentação ou maturação (Lopandic *et al.*, 2006).

A distribuição por numerosos habitats, o seu papel como organismos benéficos em muitos processos industriais, a sua ocorrência como organismos inibidores dos processos fermentativos em produtos lácteos ou a sua actividade como agentes de muitas patologias em seres humanos, fez crescer, nas últimas décadas, a investigação de processos expeditos e fiáveis para a identificação inequívoca das leveduras, para o que muito contribuíram os conhecimentos e avanços em técnicas de biologia

molecular (Frutos *et al.*, 2004). Estas técnicas além de possibilitarem a caracterização dos isolados a nível genómico permitem, ainda, a análise simultânea de um número elevado de amostras (Sabate *et al.*, 2002; Lopandic *et al.*, 2006).

Os diferentes métodos moleculares, baseados em estudos comparativos do DNA, podem ser divididos, em termos gerais, nos que examinam a estrutura primária de genes individuais por “fingerprinting” e os baseados em técnicas de hibridação (Lopandic *et al.*, 2006). As técnicas baseadas em reacções de PCR – *fingerprinting* (Polymerase Chain Reaction – fingerprinting) desenvolveram-se em várias vertentes, incluindo RAPD (Random Amplified Polymorphic DeoxiriboNucleicAcid), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e sequenciação de algumas regiões do genoma, entre outras. Relativamente à sequenciação, revelaram-se cruciais as regiões codificantes dos Ácidos Ribonucleicos Ribossomais (RNAr), sobre as quais se sabe que evoluíram pouco entre os diferentes seres vivos, mas apresentam muitos polimorfismos, sendo ideais para estabelecer relações filogenéticas (no caso de organismos distantes) e distinguir entre espécies (no caso de organismos com relações filogenéticas próximas) (Frutos *et al.*, 2004).

Os PCR-*fingerprints* podem ser indicadores adequados de distâncias genéticas, uma vez que amplificam ao acaso polimorfismos distribuídos ao longo de todo o genoma. A relação entre espécies/estirpes é deduzida a partir do número de fragmentos amplificados que as amostras têm em comum. Como estes fragmentos são normalmente não alélicos, o processo de comparação simplifica-se, uma vez que apenas se reporta a presença ou ausência do fragmento (Thanos *et al.*, 1996). No início da década de 90 do séc. XX, desenvolveu-se um método simples e reproduzível de analisar genomas complexos, que passou a ser designado por RAPD (Welsh e McLelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Esta técnica pode ser aplicada a qualquer organismo a partir do qual se possa extrair DNA, sendo o seu poder discriminativo dependente do próprio organismo e dos *primers* utilizados. O método consiste na amplificação aleatória de segmentos de DNA, usando *primers* de sequência curta (oligonucleótidos) e arbitrária. As interações entre o *primer* e a porção de DNA molde vão determinar os perfis electroforéticos obtidos, que serão diferentes de indivíduo para indivíduo (Meunier e Grimont, 1993). Estas diferenças podem resultar de inserções, deleções ou alterações de um nucleótido na sequência do DNA molde, que impede a ligação do *primer*, alterando a dimensão do fragmento amplificado (Williams *et al.*, 1990). Esta tecnologia apresenta várias vantagens destacando-se a rapidez, simplicidade, e baixo custo do processo (Anjos, 2003). A análise por RAPD-PCR mostrou ser um método adequado para distinguir estirpes de leveduras pertencendo à mesma espécie (Senses-Ergul *et al.*, 2006). A reprodutibilidade dos



padrões de bandas obtidos por esta técnica, o facto destes marcadores serem dominantes e sequências diferentes de DNA originarem fragmentos de dimensão idêntica tem sido alvo de várias críticas (Meunier e Grimont, 1993). Contudo, a maioria destes problemas pode ser superada com condições experimentais cuidadas, sendo muito útil na identificação e delimitação de espécies no grupo das leveduras (Thanos *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2004; Baruzzi *et al.*, 2006; Lopandic *et al.*, 2006; Senses-Ergul *et al.*, 2006).

O conhecimento da biodiversidade e relações inter específicas entre leveduras aumentou marcadamente nos últimos anos com a análise filogenética de sequências génicas (Kurtzman, 2001). A sequenciação dos operões de RNAr 26S, 18S, 5,8S e 5S passaram a ser utilizados como regiões preferenciais, por apresentarem pouca evolução (Frutos *et al.*, 2004). Os estudos iniciais focaram-se na subunidade 18S do RNAr (James *et al.*, 1997) e no domínio D1/D2 do RNAr 26S (Kurtzman e Robnett, 1998). A partir do melhoramento das técnicas de PCR e da sequenciação directa, bem como a disponibilidade para toda a comunidade científica de numerosas bases de dados de sequências nucleotídicas, estas técnicas ganharam uma importância crescente e justificada. A sequência nucleotídica da região D1/D2 do RNAr 26S emergiu como o alvo mais importante na identificação de leveduras e é aceite universalmente como a mais importante ferramenta na sua taxionomia estando as sequências conhecidas desta região disponíveis em várias bases de dados. A importância desta região genómica na taxionomia de leveduras revelou-se, após 15 anos de intensiva investigação, pois comprovadamente exibe diferenças suficientes entre leveduras, para serem usadas na predição de relações inter e intra específicas (Kurtzman e Robnett, 1998; Fell *et al.*, 2000; Lopandic *et al.*, 2006). Para determinar os limites na denominação e relações entre espécies, Kurtzman e Robnett (1998) sugeriram que leveduras ascomicetas que apresentem mais do que 1% de diferenças na sequência nucleotídica deste domínio (isto é 6 ou mais diferenças na sequência de nucleótidos em 600 pares de bases (bp)), pertencem a espécies diferentes. Até agora, e em todas as espécies descritas esta regra tem-se verificado (Kurtzman, 2001). Nas leveduras basidiomicetas, Fell e colaboradores (2000) consideram espécies diferentes quando no mesmo domínio (portanto 600 bp) existem diferenças em dois nucleótidos. Alguns casos publicados (Lopandic *et al.*, 2006) mostraram que, em espécies muito próximas, existe uma grande homologia nas sequências desta região, e só recorrendo a outra técnica, nomeadamente perfis RAPD, se conseguiu distinguir espécies muito relacionadas, por terem apresentado perfis electroforéticos distintos.

Dada a abundância encontrada nas amostras de águas residuais do lagar em estudo, indicadora da capacidade adaptativas das leveduras que aí vivem, a sua correcta identificação será uma fonte de informação imprescindível.

Assim, neste capítulo, efectuou-se a caracterização das leveduras encontradas nas águas geradas após a extracção do azeite na Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça (CAOM), com o objectivo de:

1 - Conhecer a diversidade da flora de leveduras presente nas águas residuais geradas nos fluxos de efluentes do lagar contínuo de três fases;

2 – Comparar a diversidade da flora de leveduras entre os fluxos de efluentes gerados no lagar contínuo de três fases.

3 – Identificar os isolados de leveduras que demonstrem capacidades adaptativas a ambientes desfavoráveis, nomeadamente as águas ruças;

4 – Seleccionar os isolados mais abundantes para utilização em testes de degradação de compostos fenólicos e tratamento de águas ruças.

2. Material e Metodologia

2.1. Obtenção dos isolados

As colónias de leveduras foram isoladas e purificadas a partir das amostras resultantes das contagens de UFC usadas no capítulo anterior. A partir das placas de YMagar resultantes das incubações das amostras das águas de lavagem, águas da centrífuga vertical e águas ruças, às três temperaturas de incubação (20 °C, 25 °C e 30 °C), durante as duas campanhas de extracção estudadas (ver capítulo três), repicaram-se para novas placas de YMagar (Difco) as colónias cuja morfologia aparentava serem de leveduras. O meio de cultura foi preparado de acordo com as indicações do fabricante. Após um período de incubação a 25°C durante 48h, a pureza da colónia, e o tipo de microrganismo presente foi confirmado por microscopia fotónica.

Os isolados de leveduras obtidos foram mantidos à temperatura ambiente e a 4°C em culturas puras com YMagar, sendo repicados regularmente. Após verificação microscópica da pureza da cultura, uma amostra de cada isolado foi ultra-congelada a -80°C, em caldo de YM suplementado com 30% (v/v) de glicerol.

2.2. Extracção de DNA

Procedeu-se à extracção de DNA genómico dos isolados de leveduras. Como para PCR *fingerprinting* não são necessárias grandes quantidades de DNA, utilizou-se um método de mini-preparação de acordo com Lee, citado em Thanos *et al* (1996),



com ligeiras alterações: culturas puras e jovens dos isolados em YMagar foram inoculadas em 20 mL de YPD (20 g glicose por litro, 10 g de extracto de levedura por litro, 10 g de peptona por litro), e incubadas durante a noite a 37°C com agitação. As células foram centrifugadas à temperatura ambiente a 5000 rpm por 5 minutos e, após eliminação do sobrenadante, ressuspensas em 1 mL de solução de Sorbitol 0,9M (pH 7,5 com Na₂EDTA 0,1M) com 10 µL de solução de Liticase 1mg/mL (Sigma). A mistura foi incubada a 37°C durante 1 hora e centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos, eliminando-se o sobrenadante. Os esferoblastos foram ressuspensos em 1 mL de solução de Tris-HCL 50mM (pH 7,4 com Na₂EDTA 20mM), à qual se adicionou 50 µL de solução a 10% (v/v) de Sódio Dodecil Sulfato (SDS) e incubados a 65°C durante 30 minutos. Após a adição de 250 µL de solução de acetato de potássio 5M, os lisatos foram colocados no gelo durante 1 hora, sendo depois centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos. Do sobrenadante anterior, 750 µL foram adicionados e misturados com um volume igual de isopropanol (previamente arrefecido a -20°C), após o que se procedeu a uma centrifugação a temperatura ambiente, a 5000 rpm durante 15 minutos. O *pellet* resultante da centrifugação foi lavado duas vezes com 1 mL de solução de etanol a 70% (v/v) e uma vez com solução de etanol a 95% (v/v). Os *pellet* foram secos à temperatura ambiente e ressuspensos em 200 µL de TE (pH 7,4). Esta suspensão foi centrifugada novamente a 10000 rpm durante 15 minutos, e o sobrenadante transferido para um novo tubo *ependorf* ao qual se adicionou 10 µL de solução de RNase (ribonuclease) 1mg/mL (Sigma). Após incubação a 37°C por 30 minutos, os *ependorf* foram armazenados a 4°C.

2.3. Tipagem molecular por PCR

Para o PCR *fingerprinting*, foi usado um oligonucleótido – T3B (5'-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C-3') – específico para a região conservada dos genes do RNAT, amplificando as regiões polimórficas intergénicas (McClelland *et al.*, 1992), que serviu como *primer* único. As reacções de amplificação foram efectuadas em tubos *ependorf* previamente esterilizados, com um volume final de 25 µL, contendo tampão de amplificação, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos 4 desoxirribonucleótidos (dTTP, dCTP, dGTP, dATP), 25 pmol de T3B, e 1 U de Taq DNA polimerase. As amostras de DNA genómico foram previamente diluídas 10x com água esterilizada, e 1 µL de cada amostra foi adicionado a 24 µL de solução de amplificação. A reacção em cadeia da polimerase foi efectuada num termociclador Perkin-Elmer (9600), usando o seguinte programa: desnaturaçã o inicial a 95°C durante 10 minutos, desnaturaçã o a 95°C durante 30 segundos, emparelhamento a 52°C durante 30

segundos, e extensão a 72°C durante 1 minuto. O número de ciclos de amplificação foi 34, seguidos de um ciclo de extensão final a 72°C durante 8 minutos. No final da reacção, as amostras foram mantidas a 4°C. Para obtenção do perfil, os produtos de amplificação foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TBE 0,5x, a uma voltagem de 3V/cm. Os géis foram corados com brometo de etídio, e fotografados num transiluminador Vilber-Lourmat (VL) para posterior análise.

2.4. Sequenciação da região D1/D2 da subunidade 26S do DNAr

Para a sequenciação desta região do genoma realizou-se um “nested PCR”. Amplificou-se o DNA utilizando os *primers* NS7 (5' – GAG GCA ATA ACA GGT ATG TGA TGC – 3') e LR6 (5' – CGC CAG TTC TGC TTA CC – 3'). Para estas reacções de PCR, 1 µL de DNA foi adicionado a 24 µL de solução de amplificação contendo tampão de amplificação 10x concentrado, MgCl₂ 25 mM, 12,5 µM de cada um dos *primers* NS7 e LR6, 0,25 mM de cada um dos desoxiribonucleótidos (dTTP, dCTP, dGTP, dATP), e 1U de Taq DNA polimerase. As reacções de amplificação foram feitas num termociclador Perkin-Elmer (9600) usando o seguinte programa: desnaturação inicial durante 10 minutos a 94°C; desnaturação durante 30 segundos a 94°C, emparelhamento durante 30 segundos a 55°C, e extensão durante 1 minuto a 72°C. O número de ciclos de amplificação foi 30, seguidos de um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C. No final da reacção, as amostras foram mantidas a 4°C. Para certificar a amplificação da região correcta do DNA, os produtos destas reacções foram sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE 1x durante 60 minutos à velocidade de 3V/cm. Os géis foram corados com brometo de etídio, e fotografados num transiluminador Vilber-Lourmat (VL). As amostras que apresentaram apenas uma banda, com peso aproximado de 600 a 650 bp, foram purificadas em colunas GenElute™ PCR Clean-Up Kit da Sigma, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram sequenciadas usando os *primers forward* F63 (5' – GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG – 3') e *reverse* LR3 (5' – GGT CCG TGT TTC AAG ACG G – 3'). As reacções de sequenciação foram feitas adicionando 2 µL dos produtos do PCR purificados a 2 µL de BigDyeTerminator Ready Reaction Mix e 1,5 µL de cada *primer* (2,5 µM). Após uma rápida agitação, as amostras foram amplificadas usando o seguinte programa: desnaturação inicial durante 10 minutos a 96°C, desnaturação durante 10 segundos a 96°C, emparelhamentos durante 20 segundos a 55°C, e extensão durante 4 minutos a 60°C. O número de ciclos de amplificação foi 35, seguidos de um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 60°C. No final da reacção, as amostras foram purificadas para retirar os dNTPs não incorporados durante as reacções. Para a purificação usaram-se



colunas AutoSeq G-50 (Amersham Biosciences) e as amostras foram sequenciadas num ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), usando protocolos estandardizados.

2.5. Análises numéricas

Os perfis de genotipagem por PCR foram analisados utilizando o Software Bio1D++ da Vilber Lourmat. Todas as bandas visíveis foram incluídas na análise independentemente da intensidade da banda. As bandas difusas, mesmo quando consistentemente reprodutíveis em ampliações múltiplas, não foram incluídas na análise.

Os coeficientes de semelhança entre as estirpes em estudo foram calculados utilizando um coeficiente de associação, o algoritmo de Dice. Os coeficientes de associação, também designados por coeficientes de semelhança ou de afinidade medem a concordância entre pares de objectos, neste caso pares de estirpes em relação a determinadas características. Com este coeficiente não é tido em consideração o número de bandas com ausência nas duas estirpes e têm também mais peso as presenças simultâneas do que as presenças desencontradas (Sneath e Sokal, 1973). A aplicação do coeficiente de Dice à matriz original resultou na obtenção de uma matriz de semelhança entre estirpes.

A análise dos agrupamentos foi efectuada por um método de agregação, tipo sequencial, aglomerativo, hierárquico e de não sobreposição, designado por “unweighted pair group method for arithmetic averages” (UPGMA) onde cada combinação é efectuada usando as médias aritméticas das semelhanças entre cada um dos objectos intervenientes (Sneath e Sokal, 1973). A aplicação do método UPGMA à matriz de semelhanças permitiu a representação dos resultados obtidos sob a forma de dendrogramas, isto é, sob a forma de uma estrutura ramificada, onde os vários níveis a que se unem os diferentes ramos estão relacionados com os valores das medidas de semelhança em que se baseou o método de agregação utilizado. Para cada dendrograma foi sempre calculado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de valores cofenéticos (implícita no dendrograma) e a matriz de semelhança. Este coeficiente de correlação cofenética, exprimindo o grau de concordância entre estas duas matrizes, permitiu ajuizar o grau de distorção introduzido com este método.

As sequências nucleotídicas da região D1/D2 obtidas foram corrigidas visualmente usando o software (freeware) Chromas versão 2.23 da Technelysium, e alinhadas por processo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

nucleotide/nucleotide do GeneBank disponível no “site” do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Diversidade das leveduras nas águas residuais do lagar de azeite

A análise dos perfis electroforéticos obtidos para cada isolado permitiu avaliar a diversidade na população de leveduras em cada ponto de amostragem. Apresentam-se os perfis obtidos para os isolados de leveduras recolhidos em todas as datas de amostragem, e nas duas campanhas de extracção, fazendo-se a análise das relações de proximidade entre isolados, com base nos dendrogramas resultantes da aplicação do coeficiente de DICE e aglomeração por UPGMA. Da análise das relações, infere-se sobre a diversidade específica característica de cada ponto de amostragem. Esta análise pretendeu, apenas, reflectir a diversidade, e não a abundância, com que surgem as espécies nos distintos pontos de amostragem. Os perfis electroforéticos encontrados mostraram ser diversificados, mas alguns repetem-se com similaridades muito altas entre diferentes isolados. Por essa razão, escolheram-se em cada ponto de amostragem os perfis, que se designaram representativos, e que apresentaram similaridades elevadas entre isolados (>50%). Esta similaridade serviu para estabelecer agrupamentos de isolados. Nesses agrupamentos seleccionaram-se para apreciação global os que apresentaram perfis semelhantes em pelo menos três isolados.

3.1.1. Água de Lavagem

Neste ponto de amostragem foram obtidos 156 isolados de leveduras, 58 resultantes das amostras da campanha de 2003/2004 e os restantes (99), da campanha seguinte.

Quanto à temperatura de incubação a partir da qual se isolaram estas amostras, verificou-se que na campanha de 2003/2004 se obtiveram 21 isolados resultantes da incubação a 30°C, 21 isolados a 25°C e 16 isolados resultantes da incubação a 20°C. Quanto à campanha seguinte obtiveram-se 44 isolados incubados a 30°C, 25 isolados incubados a 25°C e 30 isolados incubados a 20°C.

Os *fingerprints* dos isolados, obtidos após amplificação com o *primer* T3B, revelaram uma elevada diversidade de leveduras, com perfis distintos. A Figura 4.1 apresenta o dendrograma que resultou do agrupamento das amostras de 2003/2004 e o da Figura 4.2 corresponde à análise dos perfis obtidos com as leveduras isoladas em 2004/2005.



Foi possível distinguir 26 perfis electroforéticos diferentes em ambos os dendrogramas, considerando uma similaridade de 65%, para delimitar o agrupamento de indivíduos da mesma espécie.

A análise dos dendrogramas das figuras 4.1 e 4.2 permitiu verificar que a temperatura de incubação não pareceu afectar a diversidade em espécies que foi encontrada, uma vez que a aglomeração ocorreu, em vários casos, juntando isolados com perfis semelhantes, mas incubados a temperaturas distintas. Por outro lado, também se verificou que a data de amostragem não influenciou as espécies presentes nas amostras de água de lavagem, pois também amostras de datas diferentes se aglomeraram nos mesmos grupos, apresentando perfis semelhantes.

Os resultados revelaram um maior número de perfis electroforéticos diferentes nas amostras incubadas a temperaturas mais elevadas. A diversidade específica diminuiu com a diminuição da temperatura de incubação. O dendrograma da Figura 4.1 apresenta três ramos e dois isolados sem qualquer relação com os demais. O primeiro ramo agrupa apenas 3 isolados (221, 185 e 212). Em comum, partilham o facto de terem sido isolados a partir de amostras da segunda data de amostragem (AL2).

O segundo ramo, maior, aglomera os restantes, menos os isolados 29 e 180 que constituem os isolados agrupados no terceiro ramo.

Os isolados 177 e 192, obtidos a partir de incubações a 30°C, não partilham qualquer característica comum nos perfis electroforéticos, o que os coloca completamente separados no dendrograma. No entanto, quando se analisa os seus perfis em conjunto com as restantes amostras, verificou-se que apresentaram alguma similaridade com outros isolados, obtidos na AL, DEC e AR das duas campanhas de extracção.

O dendrograma da Figura 4.2 revela quatro isolados sem qualquer relação com os demais e entre si (isolados 696, 702, 704 e 705). Estes isolados foram obtidos à temperatura de incubação de 20°C, o que poderá ser o factor responsável por esta separação, podendo estas serem espécies com afinidade psicrófila.

As restantes leveduras isoladas na campanha de 2004/2005 e neste ponto de amostragem agrupam todas num mesmo ramo. Estas apresentam algumas similaridades entre si, pois a separação em dois grupos ocorre com 30% de semelhança. Relativamente à campanha anterior, onde o número de isolados foi inferior, não parece ter aumentado a diversidade, uma vez que com a mesma similaridade considerada para a campanha de 2003/2004, se identificou o mesmo número de perfis.

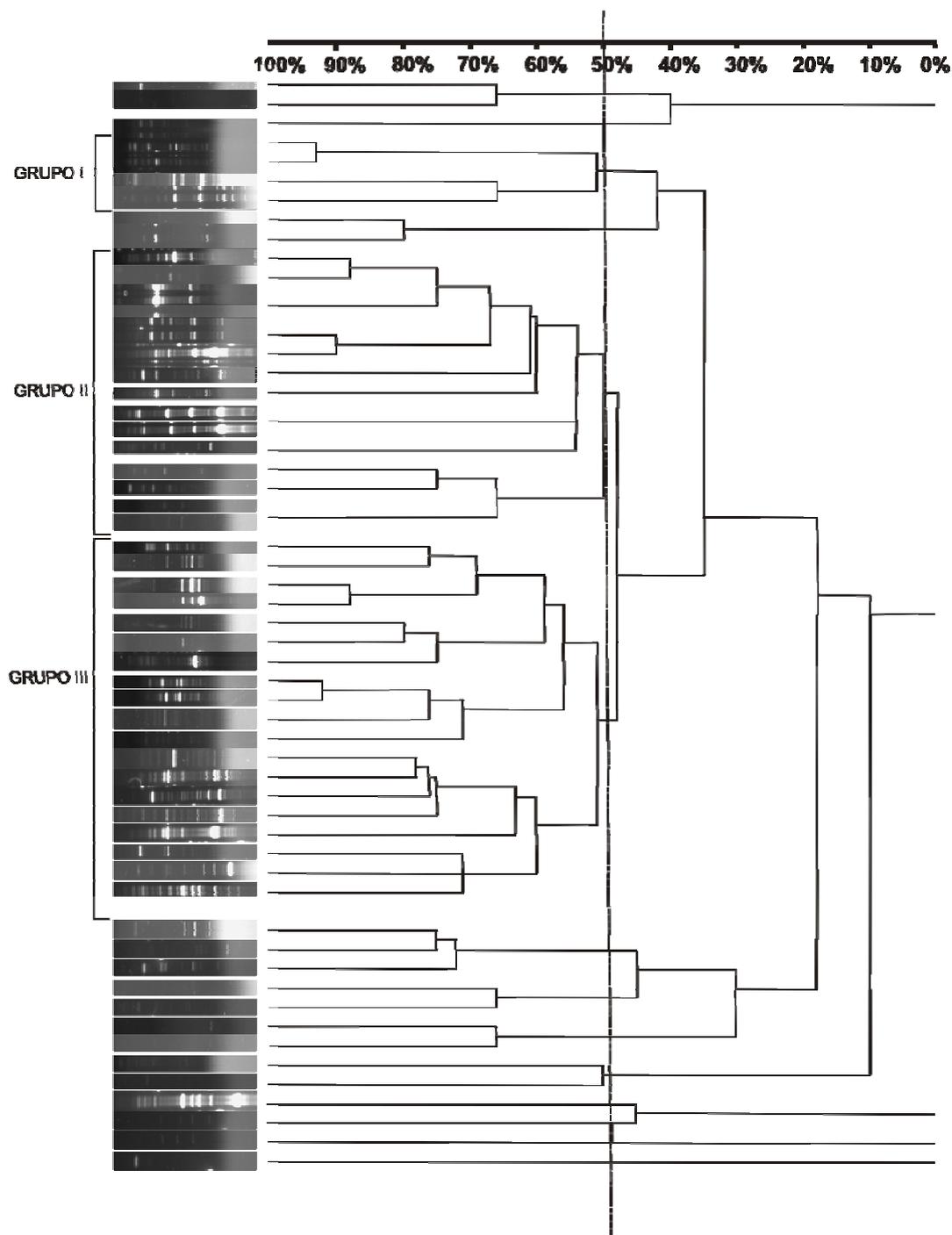


Figura 4.1. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas de lavagem respeitantes à campanha de 2003/2004, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B, usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA

Os perfis representativos estão englobados em três grupos nas amostras de 2003/2004 (GRUPO I, GRUPO II, GRUPO III) e quatro grupos nas amostras de 2004/2005 (GRUPO IV, GRUPO V, GRUPO VI e GRUPO VII) assinalados nos dendrogramas das figuras 4.1 e 4.2.

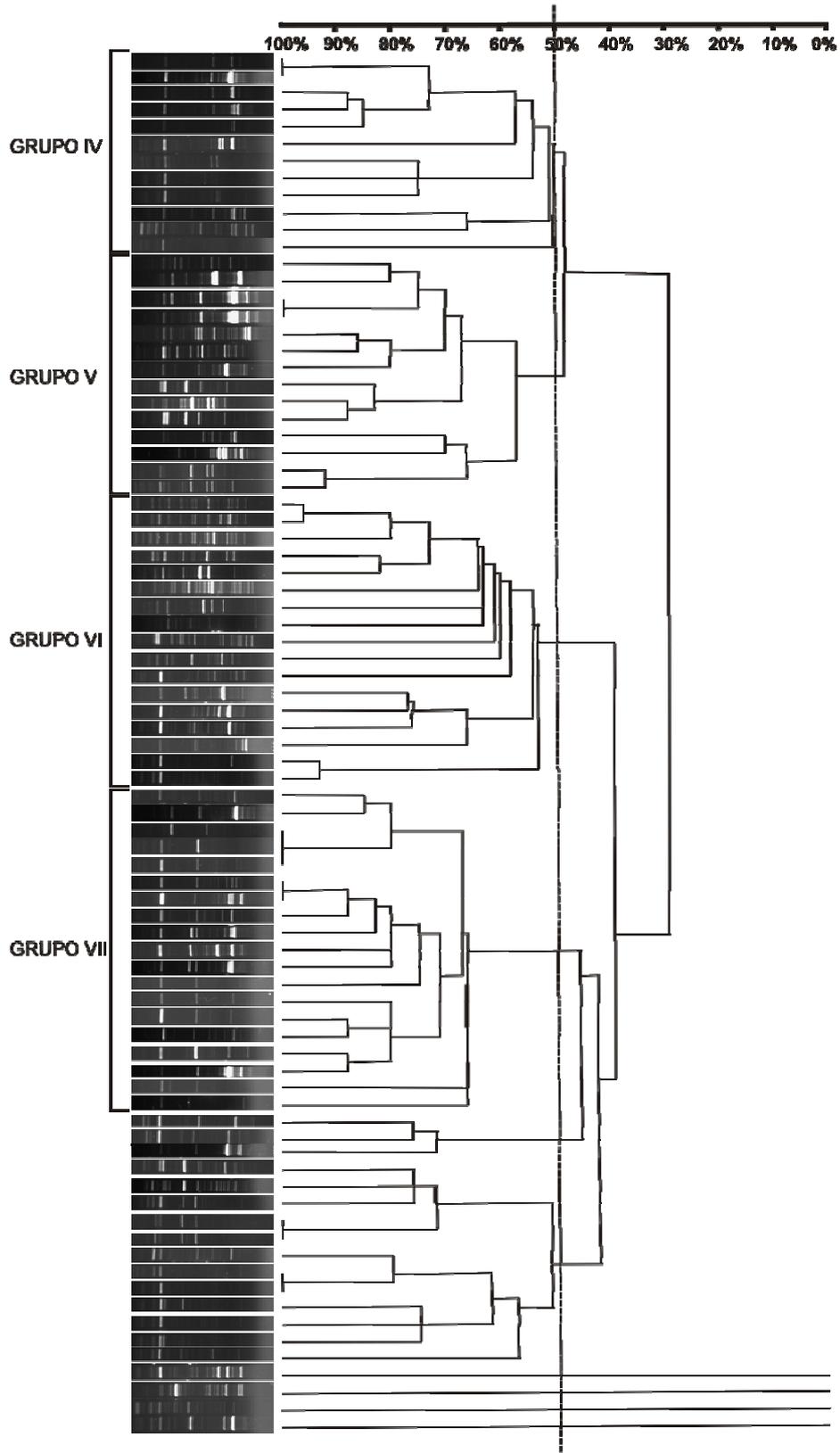


Figura 4.2. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas de lavagem respeitantes à campanha de 2004/2005, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA.

Para a análise global dos isolados de todos os pontos de amostragem, foram seleccionados dentro dos grupos referidos anteriormente, apenas um perfil das amostras cuja similaridade foi superior a 80%, e as restantes dentro do mesmo grupo. Por surgirem apenas uma vez, e terem apresentado menos de 50% de similaridade com os restantes isolados, os perfis que não se encontram englobados em nenhum grupo não foram considerados para a análise global. Este procedimento foi adoptado para os restantes pontos de amostragem nas duas campanhas de extracção.

3.1.2. Centrífuga Vertical

Neste ponto de amostragem, o número de isolados obtido diminuiu significativamente em relação aos obtidos para as águas de lavagem. No conjunto das duas campanhas, obtiveram-se 34 isolados, dos quais 21 referentes a 2003/2004, e os restantes 13 referentes à campanha de 2004/2005.

É notória a diminuição da diversidade uma vez que as amostras foram isoladas com base nas diferenças morfológicas encontradas nas colónias. Este resultado era esperado, pois as características físico-químicas apresentadas por estas águas residuais são menos favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos. Este resultado corrobora, ainda, a diminuição das contagens de UFC efectuadas neste ponto de amostragem (ver Capítulo três, Tabelas 3.1 e 3.2.).

Na Figura 4.3 está representado o resultado da aglomeração hierárquica baseado no coeficiente de similaridade de DICE, das amostras obtidas na primeira campanha de extracção.

À semelhança do ocorrido com as amostras das águas de lavagem, o número de isolados obtidos a 30°C foi superior ao das outras duas temperaturas de incubação. No entanto, quando se analisou o dendrograma (Figura 4.3), já não foi identificável uma separação visível entre estas amostras, e os isolados de diferentes temperaturas aglomeraram no mesmo grupo. Usando os critérios definido atrás e considerando uma similaridade entre perfis electroforéticos de 65%, foi possível distinguir nove tipos de perfil. Amostras com similaridade de 50% foram agrupadas nos conjuntos assinalados no dendrograma da Figura 4.3 (GRUPO VIII, GRUPO IX, GRUPO X e GRUPO XI). A escolha de perfis representativos deste ponto de amostragem, nesta campanha, foi dificultada pelo número de isolados ter sido mais baixo. Dos grupos referidos, seleccionaram-se para análise comparativa com os outros pontos de amostragem os isolados que com número mínimo de três, apresentaram elevada similaridade (>65%).

A análise do dendrograma permitiu, ainda, observar dois grandes ramos que não apresentam similaridade entre si. O primeiro, mais pequeno (com os isolados 63, 68, 60, 356 e 357), apresentou todas as amostras resultantes de incubações a 25 e



30°C, sendo que os isolados obtidos a 20°C surgiram todos no grupo maior. Ainda relativamente a este grupo, é de salientar que os isolados apresentaram afinidade apenas com amostras das águas de lavagem, ao contrário do que sucede com os outros isolados, que surgem em grupos com relações de similaridade não só com isolados obtidos a partir de águas de lavagem, mas também com amostras obtidas das águas ruças.

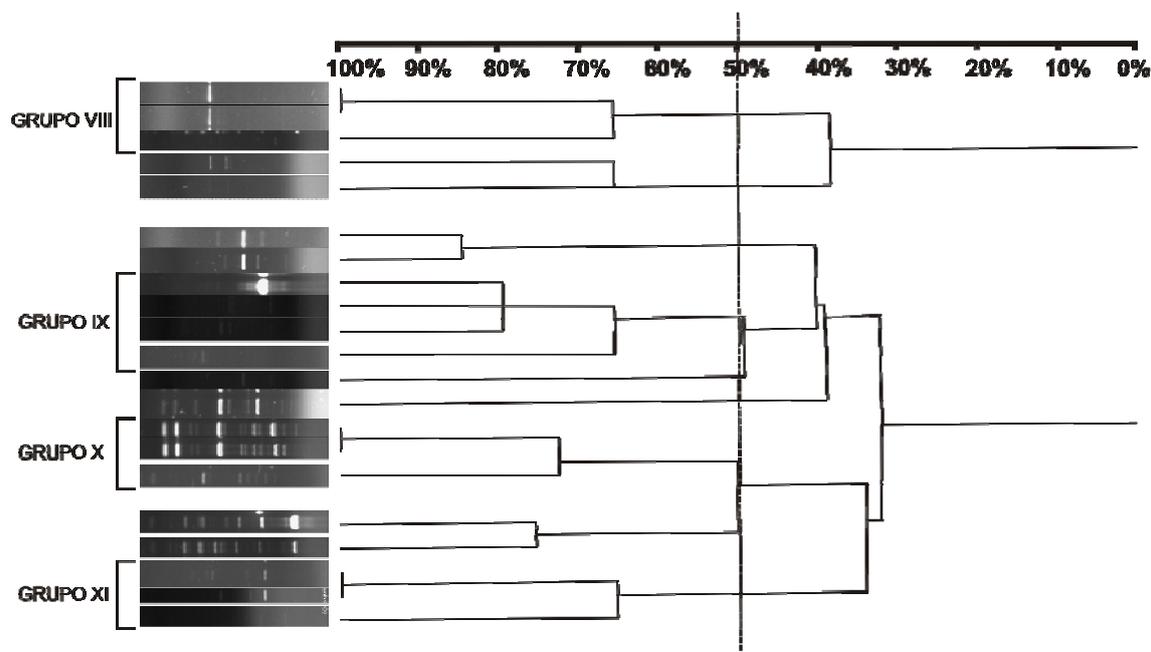


Figura 4.3. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas da centrífuga vertical respeitantes à campanha de 2003/2004, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA.

Das amostras obtidas na campanha de 2004/2005, não se isolaram leveduras a partir de colónias incubadas a 20°C. Já na campanha anterior, o menor número de amostras foi obtida a 20°C (apenas 3 isolados) facto que poderá ter sido consequência das temperaturas médias a que se encontravam as águas residuais neste ponto de amostragem, que foram elevadas (Tabela 2.1, capítulo dois).

O dendrograma relativo às amostras de 2004/2005 (Figura 4.4), mostra um isolado (929) que não apresenta qualquer similaridade com os demais.

Os restantes isolados no DEC formam dois grandes grupos, que com 65% de similaridade, apresentam oito perfis electroforéticos distintos. O perfil electroforético de alguns destes isolados pode ser encontrado com elevada similaridade em isolados de amostras de águas de lavagem, e das águas ruças (Figura 4.7, grupo D).

Desta campanha, e dada a elevada similaridade apresentada pelos perfis, bem como pelo reduzido número de isolados obtidos, seleccionou-se para análise global

dos isolados dois perfis do GRUPO XII, três perfis do GRUPO XIII e apenas um perfil do GRUPO XIV.

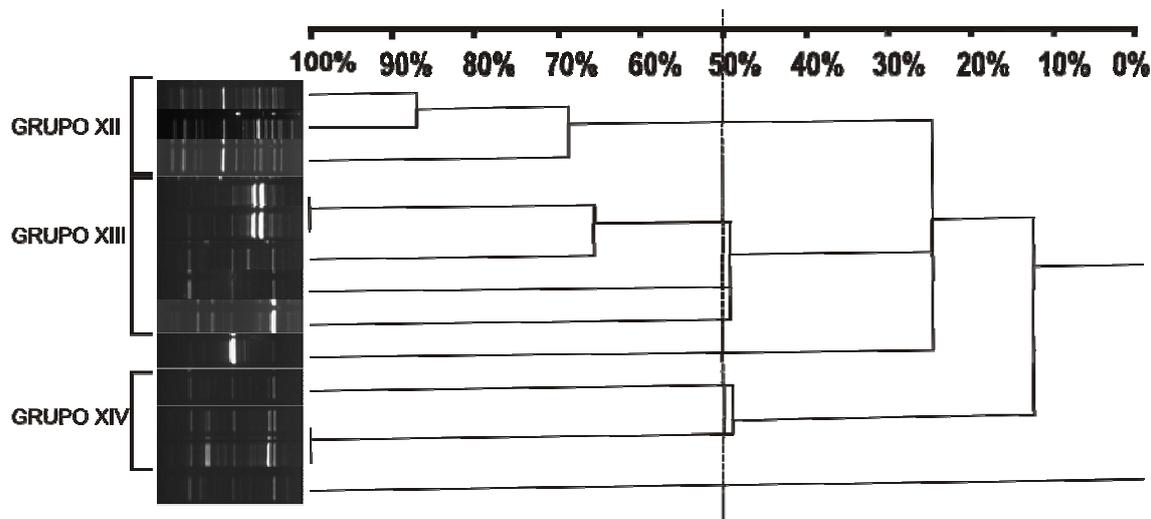


Figura 4.4. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas da centrífuga vertical respeitantes à campanha de 2004/2005, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA.

3.1.3. Águas Ruças

Neste ponto de amostragem, obtiveram-se, após selecção e purificação das culturas, 40 isolados. Destes, 10 são relativos a amostras recolhidas na campanha 2003/2004, e os restantes 30 obtidos de colónias isoladas em 2004/2005. Mais uma vez, e à semelhança do sucedido com amostras da centrífuga vertical, obtiveram-se poucos isolados a 20°C (apenas na segunda campanha) e a 30°C, sendo superior o número de leveduras obtidas a partir de incubações a 25°C. É de salientar que o número de isolados obtidos em 2004/2005, a 25°C, superou largamente os que se obtiveram em 2003/2004. A inexistência de isolados incubados a 20°C prender-se-á, mais uma vez, com as temperaturas mais elevadas que se registaram na bacia onde se recolheram as amostras.

De um modo geral, em 2003/2004 o número de leveduras foi baixo. Não se obtiveram amostras no início da campanha (Dezembro de 2003). Provavelmente as condições nas águas ruças ainda não estavam estabilizadas, e o microbiota não tinha passado por um período de adaptação. A Figura 4.5 mostra os perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B a partir das amostras da primeira campanha de extracção bem como o resultado da sua análise após agrupamento por UPGMA, usando o coeficiente de Dice.

Pela análise do dendrograma verifica-se que apenas um isolado se encontra mais afastado, sendo que os restantes nove se agrupam noutra ramo. Mais uma vez, as temperaturas de incubação não pareceram reflectir-se no processo de aglomeração pois os perfis electroforéticos dos isolados às duas temperaturas aglomeraram em conjunto.

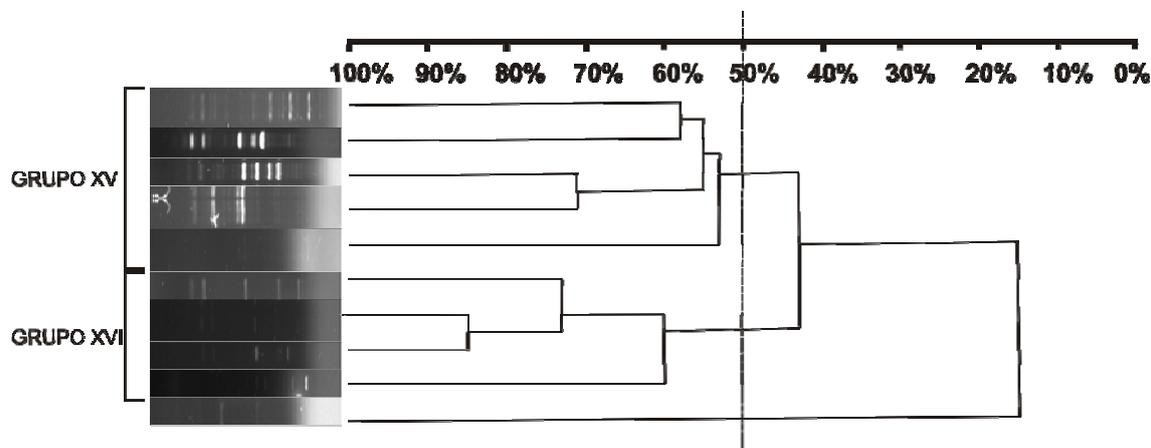


Figura 4.5. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas ruças respeitantes à campanha de 2003/2004, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA.

Procedendo de forma idêntica à dos pontos de amostragem anteriores, destes dez isolados, obtêm-se sete perfis electroforéticos cuja similaridade é de 65%.

Na campanha seguinte, obtiveram-se 30 isolados de leveduras, dos quais oito a 30°C, dezoito isolados a 25°C e apenas quatro a 20°C.

A Figura 4.6 apresenta os perfis electroforéticos obtidos na campanha de 2004/2005 organizados de acordo com o processo de aglomeração efectuado. A análise desses perfis mostra que a variabilidade específica entre as leveduras isoladas neste ambiente é grande, mesmo quando as condições físico-químicas são pouco favoráveis, como é o caso deste ponto de amostragem.

Dois isolados surgem sem apresentar qualquer relação de similaridade com os demais. Ambos foram obtidos a partir de amostras incubadas a 20°C, e esta razão, mais uma vez, poderá justificar o facto de se encontrarem separados dos restantes.

Quanto às restantes amostras, verifica-se que quase todas formam um grupo de grandes dimensões e com relações mais ou menos próximas entre si. Dois isolados formam outro ramo mais distante (isolados 758 e 759). Estes dois isolados não foram considerados para a análise global comparativa entre os diferentes pontos de amostragem, pois não cumpriam os critérios que se adoptaram para seleccionar perfis representativos (50% similaridade, e três isolados, simultaneamente). Verificou-se, no

entanto, que após identificação por sequenciação, a espécie a que pertencem (*Zygosaccharomyces fermentatii*) surge também em amostras da centrífuga vertical.

A aglomeração dos isolados não parece estar relacionada nem com a data de amostragem, nem com a temperatura de incubação das amostras, pois os isolados surgem a formar grupos onde se juntam datas e temperaturas de incubação distintas.

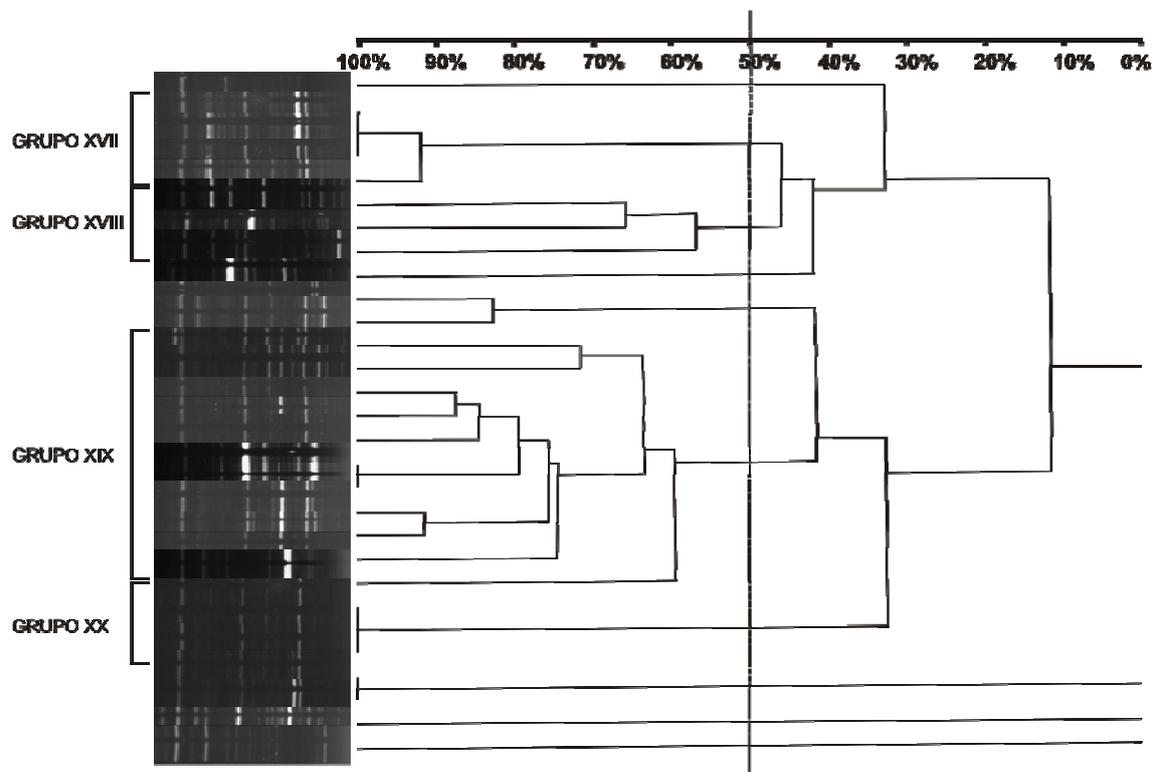


Figura 4.6. Dendrograma representando a semelhança entre os isolados das águas ruças respeitantes à campanha de 2004/2005, com base nos perfis electroforéticos obtidos com o *primer* T3B usando o coeficiente de Dice e agrupamento por UPGMA.

Quanto à diversidade de espécies, considerando uma similaridade de 65%, dos 29 isolados obtêm-se doze perfis electroforéticos diferentes.

Consideraram-se como perfis representativos deste ponto de amostragem e nesta campanha de extracção, quatro grupos. Do GRUPO XVII seleccionou-se um perfil, do GRUPO XVIII consideraram-se os três perfis dada a menor similaridade, do GRUPO XIX seleccionaram-se sete perfis, e do GRUPO XX optou-se por seleccionar apenas um perfil.

3.2. Identificação dos isolados

Um dos objectivos propostos para este capítulo foi a identificação de isolados de leveduras adaptados às condições físico-químicas deste efluente, para utilização

posterior em pré-tratamentos ou tratamentos biológicos do mesmo com o objectivo de remover ou diminuir compostos recalcitrantes aos tratamentos convencionais, nomeadamente os compostos fenólicos e gorduras.

Sendo as águas ruças, o último efluente a ser gerado nos locais de extracção do azeite, e onde prevalecerão características físico-químicas menos favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, como já foi discutido no capítulo 2, os isolados que se obtiveram a partir deste ponto de amostragem, deverão ter sido capazes de adaptar o seu metabolismo de forma a permitir o seu crescimento.

Foram 40 os isolados obtidos neste ponto de amostragem durante as duas campanhas de extracção estudadas. Destes, foi significativamente superior o número de amostras obtidas a 25°C, sendo menor o número de amostras resultantes de incubações a 30°C e marcadamente diminuto o número de amostras obtidas a partir de incubações a 20°C. Procedeu-se à extracção do DNA nuclear de todas as amostras das águas ruças (para obtenção do perfil electroforético, já apresentado), seguida de sequenciação da região D1/D2 do DNAr 26S, para analisar, usando sequências já conhecidas e disponíveis em bases de dados, para a identificação inequívoca da espécie.

A Tabela 4.1 mostra o resultado do processo de BLAST nucleotide/nucleotide efectuado na base de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com as sequências obtidas dos isolados das águas ruças.

Como resultado da análise global dos perfis electroforéticos dos isolados obtidos nas duas campanhas de extracção, verificou-se que alguns isolados obtidos de amostras da AL e do DEC apresentaram perfis com similaridade elevada, e outros até idênticos a amostras da AR. Assim procedeu-se também à identificação por sequenciação desses isolados.

A sua análise permite retirar diversas inferências com significado ecológico relevante. Apesar de ter sido possível obter numerosos perfis electroforéticos (dezanove perfis, no conjunto das duas campanhas oleícolas), que apresentaram similaridades maiores ou menores entre si, mas que faziam prever uma elevada diversidade em espécies de leveduras, verificou-se que o número de géneros foi, comparativamente com os perfis, reduzido. Identificaram-se espécies dos géneros *Acremonium*, *Candida*, *Geotrichum*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*.

As espécies predominantes nas águas ruças, com frequências maiores, foram a *Candida pomicola* e *Candida oleophila*. Seguem ainda espécies de *Pichia galeiformis* e *P. japonica*, *Candida boidinii*, *Geotrichum silvícola*, *Metschnikowia*

pulcherrima, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* e *Zygosaccharomyces fermentatii*.

Tabela 4.1. Identificação dos isolados das águas ruças e dos seleccionados das águas de lavagem e centrífuga vertical, por sequenciação da região D1/D2 do DNAr 26S.

Ponto/Data de amostragem - Temperatura de incubação	Identificação	Nº de Ocorrências	Frequência (%)
AR2.30; AR3.25	<i>Pichia galeiformis/membranifaciens</i>	2	9,6
AR2.25; AR5.25; AR6.25	<i>Candida pomicola/ishiwadae</i>	6	28,6
AR3.25	<i>Zygosaccharomyces fermentatii</i>	1	4,7
AR5.30	<i>Candida sp./Pichia kluyveri</i>	1	4,7
AR5.30	<i>Pichia japonica/Candida pataniensis</i>	2	9,6
AR5.25	<i>Candida boidinii</i>	1	4,7
AR5.25	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	1	4,7
AR5.20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	4,7
AR6.25	<i>Candida oleophila</i>	4	19,2
AR6.25	<i>Geotrichum silvicola</i>	1	4,7
AR6.20	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1	4,7
	Total	21	100
AL2.20; AL6.30; AL6.25; AL6.20; DEC2.25	<i>Candida oleophila</i>	7	41,2
AL2.30; AL4.25; AL4.20	<i>Metschnikowia aff fructicola</i>	4	23,5
AL5.30	<i>Acremonium strictum</i>	1	5,9
AL4.30	<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	1	5,9
AL4.30	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1	5,9
AL6.25	<i>Pichia fermentans</i>	1	5,9
AL4.20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	5,9
DEC2.20	<i>Zygosaccharomyces fermentatii</i>	1	5,9
	Total	17	100

No ponto de amostragem águas de lavagem (AL) e centrífuga vertical (DEC), a espécie predominante é a *Candida oleophila* (frequência = 41,2%), correspondendo a quase metade das leveduras identificadas. Identificaram-se, ainda, espécies de *Acremonium strictum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans* e *Zygosaccharomyces fermentatii*. Obtiveram-se seis isolados do género *Metschnikowia*, distribuídos pelas espécies *M aff fructicola*, *M. chrysoperlae* e *M. pulcherrima*.

Nos ambientes menos poluídos, particularmente nas águas de lavagem, parecem estar mais associadas espécies de *Metschnikowia*. Salienta-se o número maior de isolados de *M. aff fructicola* que será provavelmente uma levedura epifítica das azeitonas, pois tendo surgido em vários isolados de águas de lavagem, não foi identificada nem em amostras provenientes do DEC, nem provenientes das AR.

Os isolados de *C. oleophila* reflectem uma capacidade adaptativa muito importante nesta espécie. A sua presença verificou-se em toda a cadeia de produção de azeite e, conseqüentemente, nas águas residuais resultantes da actividade no lagar analisado. Salienta-se que se obtiveram vários isolados pertencentes a esta espécie, e



nas águas ruças, onde o número global de isolados foi baixo, obtiveram-se quatro isolados com classificação coincidente nesta espécie. Apesar do número de isolados de *C. pomicola* ter sido superior ao de *C. oleophila*, nas amostras de água ruça, não se identificaram isolados pertencentes à espécie *C. pomicola* em amostras provenientes das águas de lavagem ou das águas da centrífuga vertical. Julga-se então, que estes isolados estarão presentes no ambiente das instalações da indústria de extracção de azeite analisada.

O grupo de isolados, que foi identificado como pertencente ao género *Pichia*, também parece estar bem adaptado às condições físico-químicas características das águas residuais dos lagares de azeite. Foram identificados indivíduos deste género nas águas ruças e nas águas de lavagem. Como o número de isolados foi superior nas águas ruças, poderão tratar-se, à semelhança dos isolados de *C. oleophila* e *C. pomicola*, de espécies com uma maior capacidade adaptativa.

3.3. Análise de todos os isolados de leveduras obtidas nas campanhas de extracção

No final das duas campanhas de extracção, e considerando as condições experimentais referidas na Metodologia, obtiveram-se, a partir dos isolamentos efectuados, 229 isolados de leveduras. Destes isolados, após amplificação com o primer T3B registaram-se 213 perfis electroforéticos. A aglomeração de tão elevado número de perfis revelar-se-ia muito difícil e com probabilidade de ensombrar alguns resultados importantes. Por essa razão, optou-se por fazer a análise de todas as amostras de forma separada em cada ponto de amostragem, como foi apresentado anteriormente.

Para a análise global da diversidade de leveduras no lagar, e porque não foi analisada a abundância de cada isolado em particular, estipulou-se analisar os perfis que se definiram como significativos, de acordo com os critérios que já foram referidos anteriormente.

Com base nos mesmos critérios, definiram-se vinte grupos, e destes seleccionaram-se 65 perfis, que correspondem a 121 isolados de leveduras. Analisaram-se os mesmos, recorrendo mais uma vez ao coeficiente de DICE e aglomeração por UPGMA. Conseguiu-se desta forma reduzir para cerca de 30% o número inicial de perfis a analisar sem perder a variabilidade que foi registada. O dendrograma resultante desta análise encontra-se representado na Figura 4.7.

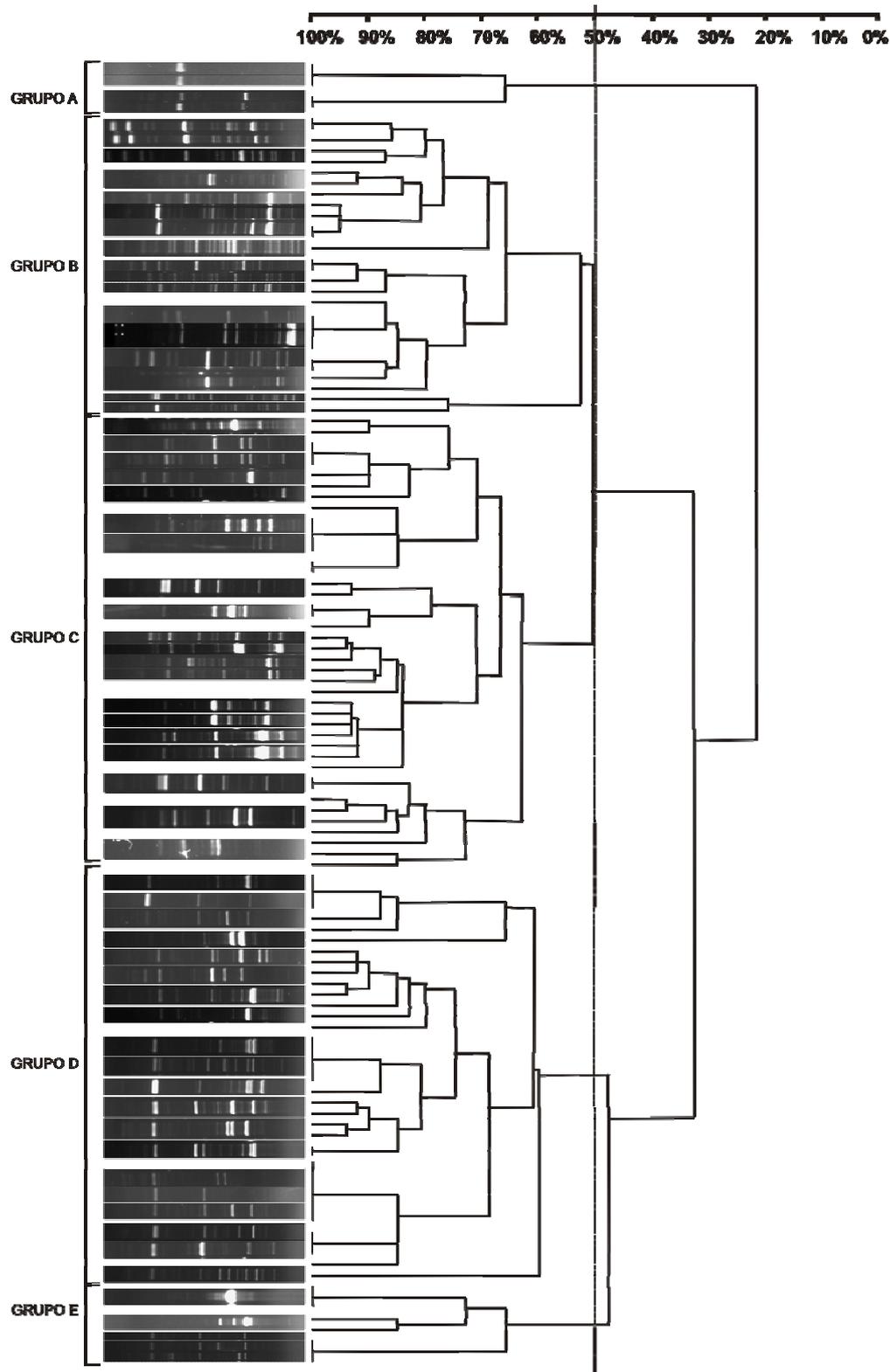


Figura 4.7. Dendrograma de agrupamento dos perfis representativos das leveduras isoladas nos três pontos de amostragem (AL, DEC, AR) nas duas campanhas de extração (2003/2004; 2004/2005), obtido a partir da análise de semelhança de perfis pelo coeficiente de DICE e aglomeração hierárquica pelo algoritmo UPGMA.

Os perfis representativos do ponto de amostragem AL contribuem em 75% do total de perfis analisados. Quase em simultâneo, surgem os perfis seleccionados a partir das amostras do DEC e AR, que representam respectivamente, 10,7% e 15% dos perfis analisados neste dendrograma. Estas percentagens estão de acordo com o esperado, pois revelam não só a diminuição da dimensão das populações de leveduras, bem como a diminuição da sua diversidade. As condições físico-químicas nos dois ambientes com menor número de espécies e isolados, são bem diferentes das encontradas no ambiente AL. Estes factos foram já explorados no capítulo 2. Apesar de não ter sido possível obter correlações com significância estatística entre a abundância dos grupos microbianos, e algum ou alguns parâmetros físico-químicos analisados, ficou claro que as comunidades microbianas, e em particular as de leveduras, são capazes de se adaptar a habitats com condições físico-químicas bem diferentes.

Estas adaptações poderão ocorrer dentro da mesma espécie, quando se consiga obter isolados idênticos nos três pontos de amostragem, ou podem ocorrer por sucessões ecológicas, em que espécies menos resistentes surgem nos ambientes mais favoráveis, surgindo depois outras espécies, quando as condições ambientais se alteram para menos favoráveis.

Considerando o modo como se processa a extracção do azeite (ver Capítulo 1) as espécies encontradas nas águas de lavagem corresponderão, essencialmente, a leveduras epifíticas do fruto, bem como leveduras frequentemente encontradas no ar ou ambientes aquáticos. Já as encontradas na centrífuga ou águas ruças poderão ser originárias das anteriores, que se adaptaram, ou terem como origem a maquinaria utilizada para a extracção.

No sentido de pesquisar a existência de relações do tipo indicado nos parágrafos anteriores, pesquisou-se se haveria relação entre os perfis e os pontos de amostragem, as campanhas de extracção ou as temperaturas de incubação de onde foram obtidos.

O dendrograma da Figura 4.7 apresenta a complexidade que resultou da elevada variabilidade de espécies encontrada entre os isolados de leveduras estudadas. Esta variabilidade tinha ficado patente quando se analisaram os dendrogramas de cada ponto de amostragem, em cada campanha de extracção.

De forma semelhante ao já efectuado com os perfis dos isolados em cada ponto de amostragem, os perfis representativos foram agrupados considerando uma proximidade de 50% entre os perfis em análise. Os perfis representativos aglomeram formando dois ramos, separando o agrupamento A dos restantes agrupamentos.

Neste GRUPO A, não se encontram perfis obtidos em amostras de águas ruças. O segundo conjunto de perfis deste grupo associou amostras das águas de lavagem que se repetiram em ambas as campanhas de extração. Sequenciou-se um isolado pertencente a este grupo, tendo-se obtido, como resultado mais próximo na base de dados do GenBank, um fungo não cultivado (uncultured fungus). Estes isolados, que se encontram já em processo extensivo de identificação, recorrendo a outros marcadores genéticos e testes morfológicos, foram os que apresentaram menor similaridade com os restantes. Pode-se especular que serão característicos de zonas de olival, uma vez que surgem apenas nas águas de lavagem, indicando que poderiam estar presentes na superfície dos frutos, nas folhas da oliveira, ou ainda no solo do olival, fazendo parte integrante das poeiras que se removem da azeitona quando são lavadas. Por outro lado, houve isolamento de amostras em duas campanhas oleícolas consecutivas. Como não ocorreram perfis semelhantes nas águas ruças, mas apenas nas amostras da centrífuga vertical, e ainda assim, com similaridade de 70%, pode pensar-se que esta espécie terá dificuldades de adaptação e manutenção nas águas residuais com maior carga poluente, como ocorre nas águas ruças.

O outro ramo do dendrograma agrupa os restantes perfis representativos. Na metade superior deste ramo, onde se estabeleceram os agrupamentos B e C, encontram-se amostras dos três pontos de amostragem e das duas campanhas oleícolas analisadas. Dos isolados que foram identificados pertencentes a estes grupos encontram-se espécies de *C.oleophila*, *C.pomicola* e *C.ishiwadae*, *Pichia membranifaciens*, *P.japonica* e *P.manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces fermentatii*. Estas espécies revelaram capacidade adaptativa aos três ambientes em análise, sendo de referir que os isolados do género *Candida* (*C.oleophila*, *C.pomicola*, *C.ishiwadae*) foram encontrados em maior número em amostras de águas de lavagem, enquanto os isolados de *Pichia* (*P.manshurica*, *P.galeiformis*, *P.japonica*) bem como as de *Zygosaccharomyces fermentatii* estão exclusivamente presentes em amostras das águas ruças. O isolado de *Saccharomyces cerevisiae* deste grupo surge apenas nas águas de lavagem.

Na metade inferior do ramo maior do dendrograma estabeleceram-se, pelo mesmo critério referido anteriormente, dois grupos, GRUPO D e GRUPO E. Também nestes, os perfis representativos englobam amostras da AL, DEC e AR.

No grupo D e no grupo E o número de perfis obtidos com amostras das águas ruças aumenta. As espécies identificadas constantes destes grupos pertencem ao género *Candida* com representantes das espécies *C.oleophila*, *C.pomicola* e *C.ishiwadae*. Encontrou-se ainda um isolado de *Acremonium strictum*, isolados de



Pichia membranifaciens, e vários isolados do género *Metshnikowia* que não foi possível identificar até à espécie.

Apesar de terem surgido, nos grupos B e C, como isolados provenientes de incubações de amostras de AL, os isolados de *C. oleophila* e *C. pomicola* identificados nos agrupamentos D e E apenas foram obtidos em amostras de água ruça. Este facto pode mostrar que estas espécies revelaram capacidades adaptativas marcantes e vantajosas, uma vez que resistiram às condições mais desfavoráveis registadas nas amostras das águas ruças.

Os isolados de *C. oleophila* em questão, e cujos perfis são encontrados nos grupos B e C, obtidos nas amostras de AL, e nas amostras de DEC, e os encontrados nos grupos D e E, isolados de AR, resultaram na mesma identificação relativamente à espécie, após processo de sequenciação. No entanto, as amostras têm perfis electroforéticos com similaridades que justificam a sua colocação em grupos diferentes. Este facto pode sugerir que se trata de indivíduos pertencentes a estirpes distintas.

São escassas as publicações referentes à identificação de leveduras encontradas em águas residuais de lagares de azeite. Das referências consultadas, apenas se encontraram caracterizações microbiológicas de efluentes de lagares de azeite resultantes da investigação e publicação feitos por Mouncif *et al* (1993), Giannoutsou *et al* (2004), e mais recentemente Sassi *et al* (2008). Estes autores procederam à identificação de microrganismos que obtiveram a partir de águas ruças de lagares de três fases e efluentes de um lagar de duas fase (ecológico).

O grupo de Mouncif *et al*. (1993) identificou alguns isolados de leveduras, tendo encontrado indivíduos pertencentes aos géneros *Pichia* e *Debaryomyces* (os mais abundantes), *Saccharomyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* e *Rhodotorula*. Estas identificações foram realizadas com base apenas em testes fisiológicos e bioquímicos, mas as espécies referidas por estes autores foram também identificadas no lagar em análise neste trabalho.

Das lamas resultantes da extracção em duas fases, Giannoutsou e colaboradores (2004) procuraram conhecer a diversidade em leveduras, não tendo efectuado estudos para determinar a abundância dos diferentes grupos do microbiota. Isolaram 12 leveduras que posteriormente identificaram. A representatividade associada a este número tão pequeno de isolados é uma desvantagem para o estudo. No entanto, os autores identificaram as leveduras como pertencentes aos géneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Geotrichum*. Mais uma vez, os resultados que se obtiveram com a análise efectuada aos isolados obtidos no lagar em estudo nesta tese são concordantes com os obtidos pela equipa de Giannoutsou *et al* (2004).

Sassi *et al* (2008) isolou 105 leveduras a partir de lagares de azeite em Marrocos, tendo identificado, por métodos moleculares, oito dos isolados que revelaram capacidade de crescer em meio com água ruça. Estes pertencem às espécies *Pichia guilliermondii*, *Candida ernobii*, *C. diddensiae* e *C. holstii*. Os géneros de leveduras a que pertencem estes isolados marroquinos são concordantes com os géneros encontrados no lagar que foi analisado neste trabalho.

As publicações referidas, corroboram também a conclusão referida após análise do dendrograma da Figura 4.7, de que as leveduras dos géneros *Candida* e *Pichia* podem apresentar melhores capacidades de adaptação a ambientes com níveis altos de compostos fenólicos e ácidos gordos voláteis.

Os procedimentos normalmente utilizados para a identificação de leveduras baseiam-se nos aspectos morfológicos distintos apresentados pelas colónias e nas respostas dessas colónias a uma série de testes de fermentação e assimilação de diversos compostos (normalmente glúcidos e compostos azotados). Os resultados são muitas vezes ambíguos devido às pequenas diferenças que podem ocorrer entre estirpes, levando a identificações erróneas. Do mesmo modo, quando o número de amostras a analisar é elevado, como é o caso deste trabalho, o tempo dispendido, bem como o material e reagentes utilizados, que são dispendiosos, podem dificultar a realização dessa tarefa. Assim, o recurso a comparações baseadas em características moleculares das amostras foi a opção tomada.

Realizaram-se experiências que permitiram a obtenção de um perfil molecular do genoma nuclear das amostras isoladas, recorrendo à técnica de tipagem com um *primer* único – T3B, e ainda se procedeu à sequenciação da região D1/D2 do DNAr 26S em algumas amostras. Esta escolha recaiu sobre as que foram isoladas a partir de amostras das águas ruças, pelas razões já indicadas atrás. Alguns isolados obtidos nos outros pontos de amostragem estudados, apresentaram perfis electroforéticos semelhantes às seleccionadas, e por essa razão foram também sequenciados.

Devido ao número elevado de amostras que se obtiveram neste trabalho, o recurso à técnica de tipagem, como forma rápida de rastrear espécies iguais ou próximas, foi a opção óbvia. É necessário, de futuro, um trabalho de caracterização mais aprofundado dos restantes isolados que se obtiveram, que será, com certeza, efectuado.

As espécies mais representadas, obtidas após uma observação das águas residuais geradas no lagar em estudo, durante duas campanhas oleícolas consecutivas, foram *C. oleophila* (com onze isolados) e *C. pomicola* (seis isolados).

Para além de ter sido a espécie mais representada, os isolados de *C. oleophila* apresentaram uma distribuição/presença em todos os pontos de amostragem. Estes



factos revelam capacidades de adaptação a ambientes “stressantes”, indicando estes isolados como potenciais candidatos a modelos biológicos para o pré-tratamento e /ou tratamento das águas residuais geradas pelo lagar de azeite da cooperativa Murcense.

Estes isolados de *C. oleophila*, juntamente com os isolados de *C.pomicola* foram utilizados em ensaios preliminares de crescimento em meios com compostos fenólicos, cujos resultados são apresentados no capítulo 5.

4. Conclusões

A metodologia escolhida para responder aos objectivos definidos para esta parte do trabalho revelou ser adequada permitindo, num curto espaço de tempo, obter um rastreio de um número muito elevado de amostras, e ainda extrair inferências de interesse ecológico sobre os isolados em análise.

Relativamente ao primeiro objectivo, concluiu-se que a maior diversidade em espécies de leveduras é encontrada nas amostras de águas de lavagem. Foi também nestas amostras que se obteve o maior número de isolados.

As condições físico-químicas das águas da centrífuga vertical e das águas ruças não favoreceram o isolamento de um número elevado de leveduras. Concluiu-se que nestes locais o baixo número de isolados é concordante com a menor diversidade em espécies de leveduras encontrada.

Nas águas de lavagem, a espécie identificada predominante, foi a *C.oleophila*, seguida da espécie *Metschnikowia aff fructicola*. Nos outros pontos de amostragem surge também a espécie *C. oleophila*.

Nas águas ruças, as espécies mais abundantes são a *C. pomicola* e a *C. oleophila*. Estas águas, cujas condições físico-químicas têm elevado teor poluente, apresentam várias outras espécies de leveduras, sendo também de salientar o número de isolados do género *Pichia* que foram identificados neste local.

A técnica de tipagem seleccionada mostrou-se adequada para rastrear de forma rápida um número elevado de amostras, permitindo analisar a diversidade específica em ambientes cujo microbiota é desconhecido. O *primer* utilizado revelou capacidades discriminativas muito boas, sendo, inclusive, capaz de discriminar entre indivíduos da mesma espécie.

Concluiu-se, ainda, que para a identificação inequívoca dos isolados é necessário o recurso a outras técnicas de biologia molecular, nomeadamente a sequenciação. A região D1/D2 do DNAr 26S revelou ser adequada para, face às bases de dados disponíveis, permitir classificações ao nível da espécie.

A caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica das amostras deve ser efectuada para corroborar as diferenças encontradas pela tipagem, entre indivíduos provavelmente pertencentes a diferentes estirpes da mesma espécie.

As espécies com maior número de isolados e encontradas nas águas ruças foram a *Candida oleophila* e a *Candida pomicola*. Estes isolados foram seleccionados para ensaios de crescimento em meios ricos em compostos fenólicos como fonte única de carbono.





Tratamento de águas ruças por uma estirpe de Candida oleophila isolada de águas residuais de um lagar contínuo de três fases

Capítulo

5

1. Introdução

Como referido nos capítulos anteriores, as azeitonas e seus derivados são ricos em compostos fenólicos (Landete *et al.*, 2008; Saitta *et al.*, 2009) sendo o seu teor e distribuição no fruto ou nos derivados dependentes das cultivares de azeitona, do local de produção e do grau de maturação do fruto (Ryan *et al.*, 1999). Adicionalmente, alguns compostos fenólicos podem ainda formar-se durante o processo de extracção do azeite (Rodis *et al.*, 2002). Uma vez libertados durante o processo de extracção, os fenóis permanecem, quer na fase aquosa, quer na fase oleosa ou, ainda, na fase sólida. A quantidade retida em cada uma das fases depende da solubilidade dos compostos. De um modo geral, apenas 1 a 2% ficam retidos no azeite (apenas nos azeites não refinados – Saitta *et al.*, 2009). Os restantes ficam repartidos pelas águas ruças (53%) e nos resíduos sólidos (45%) (Rodis *et al.*, 2002; De Marco *et al.*, 2007), dependendo do processo de extracção (Di Giovachino *et al.*, 2002). As proporções dos compostos nas três fases (azeite, água, massa sólida) dependem das polaridades relativas das substâncias, presença de surfactantes, temperatura, e composição e proporções relativas de cada uma das fases (Rodis *et al.*, 2002).

Dada a elevada proporção de compostos fenólicos que se encontram nas águas residuais da indústria de extracção do azeite, as águas ruças possuem grande diversidade de compostos. A sua actividade fitotóxica e antibacteriana tem sido frequentemente atribuída à presença de fenóis monoméricos (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Sayadi *et al.*, 2000; Casa *et al.*, 2003, Sampedro *et al.*, 2004a, Ergul *et al.*, 2008), referenciados como biodegradáveis (Assas *et al.*, 2000). Por outro lado a sua composição em fenóis de elevado peso molecular é indicada como responsável pela sua característica cor castanha escura, particularmente recalcitrante à descoloração (Asses *et al.*, 2002; D'Annibale *et al.*, 2004, Ergul *et al.*, 2008), apesar de apresentar baixa toxicidade (Assas *et al.*, 2000).

A caracterização deste grupo de compostos era, tradicionalmente, feita considerando todos os extractos obtidos (Roncero *et al.*, 1974; Martirani *et al.*, 1996; Scioli e Volaro, 1997), utilizando o método colorimétrico (mais ou menos modificado) de Folin-Ciocalteau (Zafra *et al.*, 2006). No entanto, um conhecimento mais aprofundado, veio provar que, nesses extractos fenólicos o peso molecular varia grandemente, tendo surgido a necessidade de perceber, qual ou quais a(s) fracção (fracções) responsáveis, pelas propriedades antioxidantes, pelas propriedades antimicrobianas, e pelas propriedades fitotóxicas. Assim, em publicações mais recentes, foi dada uma atenção especial a processos de separação das fracções fenólicas, baseadas no peso molecular, e na avaliação da toxicidade de cada uma

dessas fracções (Hamdi, 1993; Sayadi *et al.*, 2000; Ettayebi *et al.*, 2003; Fiorentino *et al.*, 2003; De Marco *et al.*, 2007; Zafra *et al.*, 2006).

De acordo com a bibliografia, o hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) e o tirosol (4-hidroxifeniletanol) são os compostos fenólicos referidos como os mais abundantes nas águas ruças (Vinciguerra *et al.*, 1995; Knupp *et al.*, 1996; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Casa *et al.*, 2003; Sampedro *et al.*, 2004b; De Leonardis *et al.*, 2007; Ergul *et al.*, 2008). Para além destes, são referidos outros fenóis simples ou compostos fenólicos monoméricos como os ácidos siríngico, p-hidroxifenilacético, vanílico, verátrico, cafeico, protocatéquico, p-cumárico, 3,4 – dihidroxibenzóico, p-hidroxibenzóico, ferúlico e ainda o catecol (Hamdi, 1992; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Casa *et al.*, 2003; De Leonardis *et al.*, 2007). As caracterizações referidas não apresentam, em simultâneo, todos os compostos indicados. As razões apontadas relacionam-se com os processos de extracção dos fenóis, com a variedade de azeitona e com o processo de extracção de azeite utilizado (Sampedro *et al.*, 2004b).

Dos fenóis usualmente presentes nas águas ruças, os orto-difenóis, especialmente o hidroxitirosol e o ácido cafeico, são os que apresentam a melhor actividade antioxidante. Por outro lado, o tirosol e outros fenóis monoméricos, como os ácidos p-hidroxibenzóico, p-cumárico e o-cumárico, não se revelaram bons antioxidantes (De Leonardis *et al.*, 2007). Pelo seu efeito anti-oxidante, a possível aplicação de extractos fenólicos de águas ruças, não só como aditivos alimentares, como de componentes de pesticidas, cosméticos e compostos de interesse farmacológico tem sido referida na bibliografia (Visiulli *et al.*, 1999; Zafra *et al.*, 2006).

Apesar de estarem presentes em menores proporções, os fenóis monoméricos, naturalmente sintetizados e extraídos do fruto, bem como os resultantes dos processos de degradação microbiana dos compostos fenólicos poliméricos, revelaram-se os mais tóxicos (DellaGreca *et al.*, 2001; Fiorentino *et al.*, 2003). Em vários ensaios de descoloração e/ou destoxificação de águas ruças, usando principalmente fungos da podridão branca, pertencentes a vários géneros, verificou-se não existir uma relação causal entre a diminuição da toxicidade e remoção de compostos fenólicos de baixo peso molecular (Martirani *et al.*, 1996; Aggelis *et al.*, 2003).

Do exposto, conclui-se que os compostos fenólicos apresentam carácter antagónico. Favorável, se se considerar que as águas ruças podem ser uma forma relativamente económica de obter compostos com elevado poder antioxidante, e desfavorável quando se pretenda tratar as águas ruças com recurso aos tratamentos biológicos convencionais (digestão anaeróbia, particularmente), ou utilizá-la para regar culturas (de acordo com os normativos legislados e em uso em Portugal).



Os fungos filamentosos podem ser uma fonte importante de espécies com capacidade de degradar fenóis, uma vez que se podem encontrar frequentemente associados a lenhosas de grande porte, que são normalmente ricas em compostos fenólicos. Apesar de fungos filamentosos dos géneros *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Pycnoporus*, *Coriolopsis* e *Lentinula* (Robles *et al.*, 2000; Fontoulakis *et al.*, 2002; Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Jaouani *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2004; Dhouib *et al.*, 2006a, b) se terem revelado eficientes na eliminação de alguma matéria orgânica e de compostos fenólicos em águas ruças, apresentam dificuldades de crescimento em meios líquidos, e taxas de crescimento baixas, quando comparadas com outros microrganismos (Mendonça *et al.*, 2004). Para além destes factos, quando usados em ETAR podem, pela produção de hifas, levantar problemas de formação de espumas (Assas *et al.*, 2000; López *et al.*, 2002). As leveduras, sendo maioritariamente indivíduos de carácter unicelular, não apresentam o problema anterior e alguns géneros foram já testados com sucesso no tratamento de águas ruças (Scioli e Vollaro, 1997; Ettayebi *et al.*, 2003; Fadil *et al.*, 2003; Giannoutsou *et al.*, 2004; Lanciotti *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 2006; Martinez-Garcia *et al.*, 2007; Papanikolaou *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2008).

Com base no que foi referido, neste capítulo são apresentados os resultados do trabalho que teve como objectivos principais:

- 1 – Estudar a capacidade de crescimento de isolados selvagens de *Candida oleophila* e de *Candida pomicola* obtidos de amostras de águas ruças, em meios ricos em compostos fenólicos, frequentemente encontrados em águas ruças;
- 2 – Seleccionar o isolado que mostra capacidade em utilizar o maior número de compostos fenólicos testados;
- 3 – Avaliar a capacidade do mesmo isolado seleccionado em utilizar compostos fenólicos em elevadas concentrações, como única fonte de carbono e energia;
- 4 – Reduzir a toxicidade de águas ruças não diluídas e não suplementadas recorrendo à digestão com o isolado de *Candida oleophila* seleccionado;
- 5 – Avaliar a capacidade destoxicante do isolado de *Candida oleophila* nas águas ruças, nomeadamente na remoção do efeito tóxico dos compostos fenólicos recorrendo a testes tradicionais (germinação, microtox), e recorrendo à avaliação dos efeitos na bioenergética mitocondrial.

2. Material e metodologia

2.1. Microrganismos

Os isolados de *Candida oleophila*, e de *Candida pomicola* foram obtidos a partir de amostras de águas ruças do lagar de azeite em estudo. Após isolamento e purificação das leveduras, através de repicagens sucessivas em YMagar (Difco ®) as estirpes foram identificadas por sequenciação da região D1/D2 do DNA ribossomal 26S. Prepararam-se culturas puras dos isolados de *C.oleophila* e *C.pomicola* em meio de YM agarizado. A caracterização morfológica da estirpe seleccionada foi efectuada de acordo com Barnett *et al.* (2000). As placas de Petri foram incubadas a 28 °C durante 48 h. Este foi sempre o procedimento preparatório para todos os ensaios que se descrevem de seguida. O inóculo utilizado posteriormente foi realizado a partir destas placas, após repicagem em caldo de YM, à concentração de 1 % (v/v), quando a absorvância medida a 640 nm era aproximadamente 1,0.

2.2. Águas ruças utilizadas

As águas ruças utilizadas para os ensaios de biodegradabilidade e toxicidade foram recolhidas no lagar contínuo de três fases da CAOM, na campanha oleícola de 2005/2006. A água recolhida foi preparada de forma a ser representativa de todo o período de extracção. Após a colheita foi medido o pH que foi 5,0. As amostras foram acidificadas a pH 2 com HCl e congeladas até serem usadas. Para os ensaios de biodegradabilidade, as águas foram descongeladas, repôs-se o pH a 4,5 com NaOH e esterilizadas em autoclave. A esterilização foi efectuada para garantir que o microrganismo responsável pelas alterações provocadas na água ruça seria apenas o isolado de *Candida oleophila*. As águas ruças foram caracterizadas antes e depois do tratamento com o isolado de *Candida oleophila* quanto à CQO, condutividade, coloração e teor em fenóis totais. A CQO e o teor em fenóis foram medidos usando a mesma metodologia indicada no capítulo dois. A coloração foi estimada pela absorvância da amostra ao comprimento de onda de 390 nm, por ser a este comprimento de onda que absorvem maioritariamente os compostos fenólicos de elevado peso molecular, principais responsáveis pela coloração castanha escura apresentada por estas águas residuais, normalmente recalcitrante à descoloração biológica.

2.3. Crescimento em meio com compostos fenólicos

Prepararam-se Erlenmeyers com 100 mL de meio líquido de YNB (Difco ®), ao qual se adicionaram diversos compostos fenólicos de forma a ficarem com



concentrações finais de 1000, 100 e 10 mg/L. Os compostos usados foram os de grau de pureza mais elevada comercializados pela Sigma-Aldrich. Incluem-se os ácidos 4-hidroxibenzóico, 3,4-di-hidroxibenzóico (protocatéuico), 2,5-di-hidroxibenzóico, 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (vanílico), 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (siringico), estes pertencentes ao grupo dos ácidos fenolcarboxílicos, 4-hidroxicinâmico (p-cumárico), 3,4-di-hidroxicinâmico (cafeico), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ferúlico), pertencentes ao grupo dos ácidos fenilpropenóides, e ainda os fenóis simples hidroquinona (1,4-di-hidroxifenol), e catecol (1,2-di-hidroxifenol). Para cada composto foram efectuadas duas réplicas, e prepararam-se Erlenmeyers sem inóculo, que serviram como controlo. Para os primeiros testes de rastreio e identificação do isolado mais resistente, inocularam-se apenas balões com compostos fenólicos à concentração de 1000 mg/L. Depois de seleccionado um isolado de *Candida oleophila*, que apresentou os melhores resultados, serviu para inocular os restantes balões, com as restantes concentrações de compostos fenólicos a testar. Os balões foram inoculados com isolado de *C.oleophila*, preparado como indicado em 2.1. O crescimento dos isolados foi monitorizado por medição da absorvância do meio a 640 nm num espectrofotómetro Jasco V-530 UV/VIS. Considerou-se que ocorreu crescimento quando a variação da absorvância entre o início e final do tempo de incubação foi superior a 0,5.

2.4. Crescimento em águas ruças não diluídas e não suplementadas

Prepararam-se Erlenmeyers com 500 mL de água ruça previamente filtrada em papel Whatman nº 1 e esterilizada, com pH a 4,5. A partir de culturas preparadas como indicado em 2.1, inocularam-se os balões à concentração de 1 % (v/v) de inóculo. Incubaram-se os Erlenmeyers a 28 °C durante 30 dias numa incubadora com agitação a 120 rpm, de forma a garantir que condições de aerobiose eram mantidas durante todo o tempo de incubação. A sobrevivência e pureza dos inóculos foi verificada a cada cinco dias de incubação, por crescimento de amostras retiradas dos Erlenmeyers e repicadas em placas de Petri com YMagar. Não foram efectuadas contagens de Unidades Formadoras de Colónias (UFC). O objectivo das repicagens era garantir a existência de inóculo e não, verificar a abundância dos microrganismos.

2.5. Medição dos compostos fenólicos

A medição dos compostos fenólicos foi efectuada recorrendo a dois métodos. Para a avaliação dos fenóis totais, extraíram-se das águas ruças com acetato de etilo e foram quantificados de acordo com o método modificado de Folin-Ciocalteu (Peres, 2001), sendo os resultados expressos em $\text{mg}_{\text{ác-cafeico}}/\text{L}$. A assimilação, pelas leveduras,

dos compostos fenólicos como fontes de carbono e energia, foi efectuada com recurso à técnica de Cromatografia Líquida de Fase Reversa (RP-HPLC). A análise em HPLC foi realizada usando uma coluna C18 (150x4,6 mm) Hipersyl, com eluição em gradiente. O gradiente utilizado foi o seguinte: 0-3 minutos 100 % A (água, metanol, ácido acético, 88:10:2), 3-6 minutos 80 % A e 20 % B (água, metanol, 70:30), 6-9 minutos 60 % A e 40 % de B, 9-12 minutos 100 % B, 12 – 30 minutos 100 % A. A detecção dos compostos efectuou-se a 265 nm num detector Merck-Hitachi L-4000 UV. A identificação dos fenóis foi feita considerando os seus tempos de retenção, de acordo com o método do padrão externo. Para a determinação dos fenóis presentes nas amostras de água ruça não diluída usou-se uma coluna C18 5µm Kromasil 100 (250 mm x 4 mm) num aparelho de HPLC em fase reversa da marca Dionex (Dionex Corp., Sunnyvale, USA), modelo Ultimate 3000, acoplado a um detector de diode array também Dionex, modelo PDA-100. O processo cromatográfico foi efectuado a 30°C tendo-se usado 20 µL de volume de injeção. A detecção foi efectuada a 280 e a 325 nm, em gradiente, com os eluentes A (5 % ácido fórmico em água) e B (100% metanol) no seguinte programa de eluição: 0 a 2 minutos, 5% de eluente B e 95% de eluente A; 2 minutos até aos 70 minutos, gradiente automático começando com 5% de eluente B e aumento até 80% do eluente B; 70 minutos até 75 minutos, gradiente automático iniciando com 80% do eluente B decrescendo até 5% do mesmo eluente; 75 minutos aos 80 minutos, final da corrida com 5% de eluente B e 95% de eluente A. Para identificação dos compostos fenólicos compararam-se os seus tempos de retenção e espectros de UV com padrões externos injectados nas mesmas condições.

2.6. Avaliação da toxicidade das águas ruças

2.6.1. Testes de germinação

A avaliação da fitotoxicidade foi efectuada usando o Índice de Germinação (IG) definido por Zucconi *et al* (1981), com as alterações introduzidas por Komilis *et al* (2005). Vinte sementes de *Lepidium sativum* (agrião de jardim) foram colocadas sobre papel de filtro em placas de Petri de vidro. As sementes foram regadas com 1 mL de água ruça não tratada, e com água ruça após incubação com o isolado seleccionado de *Candida oleophila*. Testou-se o efeito da diluição na germinação, regando as sementes com águas ruças não diluídas, e águas ruças diluídas 1/2, 1/12, 1/24 (v/v) com água destilada. As placas foram mantidas fechadas, à temperatura ambiente (21 °C) e regadas diariamente durante 5 dias. Do mesmo modo, foram preparadas, placas de Petri, que foram regadas com água destilada, que serviu de controlo. Os controlos e amostras foram realizados em triplicado. O IG foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:



$$IG = \frac{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas na amostra}}{\text{n}^\circ \text{ sementes germinadas no controlo}} \times \frac{\text{média dos comprimentos das raízes da amostra}}{\text{média dos comprimentos das raízes no controlo}} \times 100 \quad (1)$$

As sementes foram consideradas germinadas quando o comprimento da raiz foi igual ou superior a 5 mm. Para as sementes que apresentaram raízes inferiores a 5 mm, considerou-se o comprimento igual a zero e como semente não germinada. Como é frequentemente sugerido na bibliografia, que a toxicidade na germinação é consequência dos compostos fenólicos, utilizou-se outro índice, proposto por Tsioulpas *et al* (2002), que permite verificar se a toxicidade fenólica aumenta ou diminui após tratamento. A fórmula do índice (Índice de Toxicidade Fenólica (ITF)) é a que seguidamente se apresenta:

$$ITF = \frac{100 - IG}{[\text{fenóis totais}]} \quad (2)$$

2.6.2. Testes de toxicidade microbiana

Para a avaliação da actividade antimicrobiana de águas ruças utilizou-se o método da inibição da luminescência em *Vibrio fischerii*, vulgarmente referido como Microtox. Neste caso, usou-se um kit da Aboatox – BioTox™Kit, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, acertou-se o pH das amostras de água ruça a $7,0 \pm 0,2$ com NaOH. Reconstituiu-se o reagente que contém o liofilizado bacteriano de *Vibrio fischerii*, e após o tempo de estabilização referido pelo fabricante (30 min a 4 °C) pipetaram-se 0,5 mL de suspensão de bactéria para as respectivas cuvettes. Preparou-se o reagente de diluição à concentração de 1/10 (v/v) com água destilada. Este reagente serviu para preparar diluições das amostras de água ruça não tratada (ARnt) e água ruça tratada (ARt), isto é, após incubação com o isolado de *Candida oleophila*, conforme indicado em 2.4. As diluições preparadas foram 1/2, 1/3, 1/4, 1/6, 1/8, 1/12, 1/16, 1/24, 1/32, 1/48, 1/64 e 1/96 (v/v). As amostras diluídas e a suspensão bacteriana foram estabilizadas e mantidas num bloco refrigerado a 15 °C durante todo o tempo do ensaio e medições. Foram preparadas duas *cuvettes* com água destilada que serviram de controlo e todas as amostras foram feitas em duplicado. Mediu-se a intensidade de luminescência (I_0) da primeira *cuvette* com suspensão de bactéria (correspondente ao controlo), adicionando-se imediatamente 0,5 mL de H₂O destilada ou amostra diluída, conforme se tratasse, respectivamente, do controlo, ou da amostra a medir. Repetiu-se a operação para todas as amostras, tentando manter tempos entre adições e medições. As amostras foram incubadas em bloco refrigerado (15 °C)

durante o tempo de contacto definido (15 minutos), e determinou-se a intensidade de luminescência após contacto ($I_t=15$), pela ordem e tempos com que se prepararam as amostras nas medições de I_0 . A percentagem de inibição (INH) causada pelas águas foi calculada usando a fórmula:

$$\text{INH (\%)} = 100 - \left[\frac{I_{t=15}}{\text{KF} \times I_0} \right] \quad (3)$$

onde

KF – factor de correcção calculado por IC_t/IC_0

IC_t – intensidade de luminescência do controlo (C) após o tempo de contacto (neste caso 15 minutos)

IC_0 – intensidade de luminescência inicial do controlo (C)

$I_t=15$ – intensidade de luminescência da amostra após o tempo de contacto (neste caso 15 minutos)

I_0 – intensidade de luminescência inicial da amostra

Finalmente, calculou-se o IC_{50} , isto é, a diluição em que metade da população de bactérias fica inibida, usando uma regressão padrão.

2.6.3. Testes de toxicidade na bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias a partir das quais se produziram as partículas submitocondriais (PSM) usadas no ensaio foram extraídas de fígado de rato seguindo protocolos convencionais (Gazzotti *et al.*, 1997) com algumas modificações referidas em Martins *et al* (2008). A actividade respiratória foi avaliada pelo consumo de oxigénio das PSM isoladas, por método polarográfico, usando um eléctrodo de oxigénio tipo Clark em câmara fechada a 25°C. A actividade da ATPase foi medida por potenciomtria. A água ruça a testar foi adicionada ao meio de respiração em alíquotas de 1 mL, e só após 5 minutos de incubação inicial procedeu-se à adição de substratos respiratórios. Testou-se o efeito das águas ruças na actividade de complexos respiratórios seleccionados, nomeadamente succinato desidrogenase, citocromo c oxidase e ATP sintetase (Martins *et al*, 2008; Peixoto *et al.*, 2008). O isolamento das PSM foi realizado de acordo com Boveris (1984), tendo-se introduzido algumas alterações. Mitocôndrias previamente congeladas em azoto líquido, foram descongeladas e ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) com manitol 230 mM e sacarose a 70 mM. A concentração final em proteína foi de 10 mg/mL, tendo-se mantido a solução em gelo granulado e submetido a agitação constante durante 15 min. A solução foi transferida para um tubo de vidro e submetida a ultra-sons, a 4 °C com 20 pulsos de 5 s; entre



cada pulso o tubo foi colocado em gelo por um período de 60 s. Transferiu-se novamente para um copo de vidro, colocou-se em gelo granulado e agitou-se durante 15 min. Centrifugou-se a 12000 x g durante 15 min a 4 °C, removendo-se as vesículas grandes. O sobrenadante foi, posteriormente, centrifugado a 114000 x g durante 30 min a 4 °C (ultracentrífuga). As PSM foram então lavadas com a solução de tampão tris-HCl, novamente centrifugadas nas mesmas condições, ressuspensas em sacarose 0,25 M (preparada de fresco), transferidas para micro-tubos de centrifuga, congeladas em azoto líquido e armazenadas a – 80 °C até à sua utilização.

2.7. Análise Numérica

A análise gráfica dos cromatogramas de HPLC foi efectuada recorrendo ao software compatível para Windows dos aparelhos utilizados no processo experimental. A análise gráfica e estatística dos testes de toxicidade foi efectuada recorrendo ao software Kaleida Graph para Windows.

3. Resultados e Discussão

3.1. Selecção de isolados de leveduras de águas residuais de lagares de azeite por crescimento em meios ricos em compostos fenólicos

Onze isolados de leveduras da espécie *Candida oleophila* e seis isolados de leveduras da espécie *Candida pomicola* foram seleccionados, a partir de amostras de águas residuais geradas no lagar de azeite da CAOM, com o objectivo de se rastrear a sua capacidade de crescer em meios de cultura, com concentrações elevadas de compostos fenólicos como fonte de carbono e energia. A selecção destes isolados foi efectuada como indicado no Capítulo 4, dado que estas leveduras foram encontradas nas águas de lavagem e nas águas ruças, e porque se identificaram em maior número de isolados.

Os compostos fenólicos escolhidos para os testes de crescimento são comuns nas águas ruças. Os resultados dos testes de crescimento foram avaliados por medição da variação da absorvância do meio de cultura a 640 nm, e o consumo dos fenóis foi avaliado por análise dos cromatogramas, considerando a diminuição do pico de absorção UV característico de cada composto fenólico testado. A Tabela 5.1 resume o resultado dos ensaios preliminares de crescimento dos isolados seleccionados de *Candida oleophila* e *Candida pomicola*.

Todos os isolados conseguiram utilizar, como fonte única de carbono e energia, os ácidos p-cumárico e protocatéquico a elevadas concentrações (1000 mg/L), pois a

variação da absorvância a 640 nm entre o início e o fim da experiência foi superior a 1,0 e também porque houve remoção do composto do meio de cultura, confirmada pela diminuição do pico de UV característico destes ácidos fenólicos. Apenas o isolado de *Candida oleophila* nº 7 (C.ol 7) é capaz de metabolizar a hidroquinona às concentrações testadas. Quanto ao catecol, dois isolados, um de *Candida oleophila* e um de *Candida pomicola*, são capazes de utilizá-lo como fonte de energia. O ácido cafeico não permitiu o crescimento à maior parte dos isolados testados, tendo o ácido p-hidroxibenzóico sido metabolizado apenas por um isolado de *Candida oleophila*.

Tabela 5.1. Resultados dos crescimentos dos isolados de *Candida oleophila* e *Candida pomicola* seleccionados para crescer em meios de cultura com elevada concentração de compostos fenólicos (1000 mg/L) como fonte de carbono e energia.

Isolados Seleccionados	Ác. Cafeico	Ác. p-Cumárico	Ác. p-Hidroxibenzóico	Ac. Protocatéquico	Catecol	Hidroquinona
C.ol 1	-	+	-	+	-	-
C.ol 2	+	+	-	+	-	-
C.ol 3	-	+	-	++	-	-
C.ol 4	+	+	-	++	-	-
C.ol 5	+	+	-	++	-	-
C.ol 6	-	+	-	++	-	-
C.ol 7	-	+	-	++	-	+
C.ol 8	-	+	-	++	-	-
C.ol 9	-	+	-	++	-	-
C.ol 10	-	+	-	++	-	-
C.ol 11	+	+	+	++	+	-
C.po 1	-	+	-	++	-	-
C.po 2	-	+	-	++	-	-
C.po 3	-	+	-	++	-	-
C.po 4	-	+	-	++	+	-
C.po 5	-	+	-	++	-	-
C.po 6	+	+	-	++	-	-

C.ol 1 a C.ol 11- isolados diferentes de *Candida oleophila*; C.po 1 a 6 – isolados diferentes de *Candida pomicola*. (-) ausência de crescimento; (+) crescimento com remoção dos compostos fenólicos do meio inferior a 25% da concentração inicial; (++) crescimento com remoção dos compostos fenólicos do meio superior a 75% da concentração inicial.

Analisando a tabela, tendo em consideração o maior número de compostos que o isolado é capaz de metabolizar (cinco de seis compostos testados), tendo removido, no caso do ácido protocatéquico, mais de 75% da sua concentração no meio de cultura, seleccionou-se o isolado **C.ol 11** como o melhor adaptado ao crescimento em meios com elevadas concentrações de fenóis.



3.2. Caracterização do isolado de *Candida oleophila*

A caracterização do isolado de *Candida oleophila* seleccionado utilizado para os ensaios de toxicidade e biodegradabilidade foi feita recorrendo a diversos testes fisiológicos e bioquímicos normalmente utilizados em taxionomia microbiana. Os resultados obtidos para os testes de fermentação, assimilação (de compostos de carbono e azoto), crescimento a diferentes temperaturas, osmotolerância e necessidades vitamínicas, entre outros, estão sumariados na Tabela 5.2. As características morfológicas das colónias encontram-se documentadas na Figura 5.1.

As colónias do isolado caracterizado apresentam coloração branca a bege com reverso rosáceo. São circulares, mamilonadas, com bordos inteiros, de superfície lisa, opacas e brilhantes e de consistência butirosa. Quando em meio líquido (caldo de YM), apresentam turvação homogénea e persistente, com ligeira pigmentação amarelada, e forma um anel de cor esbranquiçada quando não agitada. Ao microscópio, apresentam células redondas a ovóides, normalmente isoladas ou em pequenos agrupamentos. Reproduzem-se por gemulação unilateral. Não se observaram hifas ou pseudo-hifas na cultura utilizando a técnica de Dalmau.



Figura 5.1. Aspecto apresentado pelas colónias após três dias de incubação a 28°C e cultivadas em meio de YMagar (Difco).

Na Tabela 5.2 apresentam-se os resultados obtidos para os testes fisiológicos e bioquímicos efectuados com o isolado seleccionado de *Candida oleophila* usado nos ensaios de biotoxicidade e biodegradabilidade. Na mesma tabela estão indicados os resultados publicados para a espécie tipo de *C.oleophila* (Barnett *et al.*, 2000).

Apesar de por análise da região D1/D2 do DNA ribossomal 26S se ter obtido uma homologia de 100% com a estirpe tipo de *Candida oleophila*, pela análise da Tabela 5.2 verifica-se que alguns testes apresentam resultados que não são concordantes com os obtidos para a estirpe tipo. São particularmente evidentes, as diferenças respeitantes à capacidade de utilização de compostos de azoto, bem como a incapacidade de formar hifas nas condições testadas.

Tabela 5.2. Resultados dos testes bioquímicos e fisiológicos realizados ao isolado de *Candida oleophila*, de acordo com Barnett *et al* (2000).

Testes	Isolado <i>Candida oleophila</i> (C.ol 11)	<i>Candida oleophila</i> Montrocher (1967)
Fermentação		
d-Glicose	+	+
d-Galactose	+	+
Maltose	?	+/-
Me α -D-glucósido	-	D/-
Sacarose	W	D/-
α,α-Trealose	-	+/D
Melibiose	-	?
Lactose	-	-
Celobiose	-	+/D
Melezitose	-	?
Inulina	-	?
Amido	-	?
d-Xilose	W	?
Assimilação (C)		
d-Glicose	+	+
d-Galactose	+	+
l-Sorbose	+	+
d-Glucosamina	+	+/D
d-Ribose	-	+/-
d-Xilose	+	+
l-Arabinose	-	-
d-Arabinose	+	-/D
l-Ramnose	+	-
Sacarose	+	+
Maltose	-	+
α,α-Trealose	-	+
Me α -D-glucósido	-	+/-
Celobiose	+	+/D
Salicina	+	+/D
Arbutina	+	+
Melibiose	-	-
Lactose	-	-
Rafinose	-	-
Melezitose	+	+
Inulina	-	-/D
Amido	-	-/+
Glicerol	+	+
Ertritol	-	-
Ribitol	+	+/D
Xilitol	-	+/D
l-Arabinitol	-	-
d-Glucitol	+	+
d-Manitol	+	+
Galactitol	-	-
myo-Inositol	-	-
d-Glucono-1,5 lactona	+	+/D
2-Keto-d-gluconato		+
5-Keto-d-gluconato		+/D
d-Lactato	+	+/-
Succinato	W	+
Citrato	-	+
Metanol	+	-
Etanol	+	+
Assimilação (N)		
Nitrato	+	-
Nitrito	+	-
Etilamina	+	+
l-Lisina	+	+
Cadaverina	+	+
Creatina	+	-
Creatinina	+	-
d-Glucosamina	+	-
Outros Testes		
Sem Biotina	W	-
Sem piridoxina	W	+
T 25°C	+	+
T 30°C	+	+
T 40°C	-	-
50% glicose	+	+/-
60% glicose	+	+/-
10% NaCl	+	+
16% NaCl	-	-
Hidrólise Ureia	-	-
Filamentos	-	Pseudohifas

(+) cresceu; (-) não cresceu; (w) crescimento pouco expressivo; (D) crescimento retardado (siglas de acordo com Barnett *et al* (2000)).



De um modo geral, o isolado de *C.oleophila* é capaz de utilizar uma vasta gama de compostos como fonte de carbono e energia, e resistir a meios com elevada pressão osmótica, o que poderá ter sido uma característica vantajosa para a sua sobrevivência nas águas residuais dos lagares de azeite. Estas, para além de elevada carga orgânica, presença de ácidos gordos voláteis e compostos fenólicos em elevadas quantidades, apresentam também uma elevada condutividade, resultado dos sais nelas dissolvidos.

O isolado caracterizado foi utilizado como espécie a testar para reduzir a toxicidade de amostras de águas ruças não diluídas e não suplementadas. Não se procedeu a qualquer tipo de aclimação prévia do isolado.

3.3. Crescimento do isolado de *Candida oleophila* em meios com compostos fenólicos como única fonte de carbono e energia

Como se discutiu no ponto anterior, o isolado de *Candida oleophila* em estudo é capaz de usar uma elevada variedade de compostos, como fontes de carbono e energia. A capacidade de usar compostos químicos como única fonte de carbono e energia, permite ao microrganismo sobreviver em meios onde esse composto exista isoladamente, ou não, mesmo quando a substância em estudo apresente algumas características de toxicidade. Para aferir desta capacidade, inocularam-se balões de Erlenmeyer com diferentes concentrações de compostos fenólicos, e avaliou-se a capacidade da *C. oleophila* em utilizá-los como única fonte de carbono e energia.

Foram utilizados compostos fenólicos pertencentes aos fenóis monoméricos, por serem referenciados como mais tóxicos (Capasso *et al.*, 1995; Isidori *et al.*, 2005). Dentro destes escolheu-se entre os sub-grupos (simples, ácidos fenolcarboxílicos, fenilpropanóides) compostos com substituintes distintos (grupos hidroxilo e metoxilo) em posições diferentes do anel benzénico (carbono 2-orto, carbono 3-meta e carbono 4-para) que tivessem os seus equivalentes nos respectivos sub-grupos. Importa, ainda, referir que as substâncias químicas usadas como exemplos bem como as concentrações escolhidas (1000 mg/L, 100 mg/L, 10 mg/L), são comuns nas águas residuais dos lagares de azeite (Lesage-Meesen *et al.*, 2001; Casa *et al.*, 2003; Allouche *et al.*, 2004; Chtourou *et al.*, 2004; Isidori *et al.*, 2005; Dimitrios, 2006; De Marco *et al.*, 2007; Asses *et al.*, 2009a,b).

Testaram-se três concentrações diferentes de três grupos de compostos fenólicos de baixo peso molecular. Os resultados das experiências de crescimento do isolado encontram-se na Tabela 5.3.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que a concentração de 10 mg/L se revelou menos vantajosa para a levedura sendo insuficiente para permitir o crescimento do isolado.

À concentração de 1000 mg/L para os ácidos fenilpropenóides, a estirpe em estudo apresentou crescimento com os ácidos 4-hidroxicinâmico e 3,4-dihidroxicinâmico. Quanto aos ensaios com os ácidos fenolcarboxílicos, à mesma concentração de 1000 mg/L, verificou-se crescimento apenas para os ácidos não metoxilados, ácidos 4-hidroxibenzóico e 3,4-dihidroxibenzóico. Nos dois casos, a fase de latência observada, foi longa. Para o ácido 4-hidroxibenzóico foram necessários cerca de dois dias para iniciar o crescimento, enquanto para o ácido 3,4-dihidroxibenzóico esta fase de adaptação se prolongou até aos seis dias de incubação. De todo o modo, após esta fase inicial, o crescimento ocorreu muito rapidamente.

Quando as fontes de carbono e energia foram os ácidos fenilpropanóides, também os compostos usados pelo isolado são apenas hidroxilados, não possuindo substituintes metoxilo nos seus anéis. Também se verificaram fases de adaptação iniciais longas, que foram de quatro dias para o ácido 4-hidroxicinâmico e de três dias para o ácido 3,4-dihidroxicinâmico. Não existe paralelismo, quanto às fases de latência, relativamente aos compostos fenolcarboxílicos (Tabela 5.3.). No entanto, no caso do ácido 3,4-dihidroxicinâmico, o crescimento ocorreu até atingir uma absorvância a 640 nm mais baixa do que os casos anteriores. Esta toxicidade pode ser causada pelo composto em si, considerando que a levedura não terá esgotado as concentrações deste no meio, ou ainda pelos produtos resultantes do seu metabolismo que podem ser tóxicos.

Os compostos fenólicos que permitiram o crescimento do isolado de *Candida oleophila* com concentrações de 1000 mg/L têm os substituintes nas posições meta (carbono 3) e para (carbono 4) do anel benzénico. Os compostos cinâmicos permitiram crescimentos mais rápidos, e os ácidos benzóicos com dois grupos hidroxilo, pareceram ser mais favoráveis ao metabolismo do microrganismo.

A levedura revelou capacidade para assimilar compostos fenólicos à concentração de 100 mg/L, compostos estes diferentes daqueles que permitiram o crescimento a concentrações mais elevadas, com excepção do ácido 3,4-dihidroxicinâmico. Neste caso, o crescimento foi verificado para o catecol (do primeiro grupo), ácidos 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (do segundo grupo), e ácido 3,4-dihidroxicinâmico (do terceiro grupo).

Comparando o crescimento verificado usando fenóis à concentração de 1000 mg/L, com os resultados obtidos para o crescimento com fenóis à concentração de 100 mg/L, sobressai o facto de que as fases de latência para a concentração mais



baixa foram claramente inferiores, não ultrapassando em nenhum caso as 24 horas de incubação.

Dos compostos fenólicos simples testados (catecol e hidroquinona) apenas o catecol permitiu o crescimento da estirpe. À concentração de 100 mg/L o isolado cresceu rapidamente, tendo atingido absorvâncias elevadas num curto período de incubação.

O único composto do grupo dos fenilpropanóides a permitir o crescimento do isolado de *Candida oleophila* a duas concentrações distintas foi o ácido 3,4-dihydroxicinâmico (Tabela 5.3.).

Tabela 5.3. Crescimento e fases de latência do isolado de *Candida oleophila* quando usa como única fonte de carbono e energia, compostos fenólicos, às concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L.

Composto fenólico Concentrações em mg/L	Crescimento	Fase de Latência (dias)
Catecol (1,2-di-hidroxifenol)		
10	-	
100	+	1
1000	-	
Hidroquinona (1,4-di-hidroxifenol)		
10	-	
100	-	
1000	-	
Ác. 4-hidroxibenzóico		
10	-	
100	-	
1000	+	2
Ác. Protocatéquico (Ác.3,4-di-hidroxibenzóico)		
10	-	
100	-	
1000	+	6
Ác. 2,5-dihidroxibenzóico		
10	-	
100	-	
Ác. Vanílico (Ác. 4-hidroxi-3-metoxibenzóico)		
10	-	
100	+	1
Ác. Siríngico (Ác. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico)		
10	-	
100	+	1
Ác. P-cumárico (Ác. 4-hidroxicinâmico)		
10	-	
100	-	
1000	+	4
Ác. Cafeico (Ác. 3,4-di-hidroxicinâmico)		
10	-	
100	+	1
1000	+	3
Ác. Ferúlico (Ác. 4-hidroxi-3-metoxicinâmico)		
10	-	
100	-	

(-) não cresceu (variação absorvância menor que 0,5); (+) cresceu (variação da absorvância maior que 0,5).

Em todas as experiências em que se registou crescimento, ocorreram fases de latência alargadas, que se terão revelado fundamentais para a síntese de novas enzimas que permitiram o metabolismo dos compostos presentes no meio.

Dos compostos fenólicos testados, o catecol, os ácidos 4-hidroxi-3-metoxibenzóico, 3,4-di-hidroxicinâmico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (por esta ordem) e à concentração de 100 mg/L são os que mais rapidamente são metabolizados. Com excepção do catecol, e dos substituintes do carbono 1 do anel benzénico, que caracterizam cada grupo em estudo, estas substâncias, apresentam grupos substituintes hidroxilo e metoxilo nos carbonos 3 e 4 dos anéis fenólicos, que parece ser uma característica que favorece a utilização do composto. As fases de latência na presença destes compostos são mais longas, variando de dois dias (para o ácido 3,4-di-hidroxicinâmico), até seis dias (para o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico). O ácido 4-hidroxibenzóico também permite o crescimento do isolado de *Candida oleophila*, à concentração de 1000 mg/L. Foi ainda possível verificar que nos casos em que o composto fenólico foi metabolizado ocorreu uma descida do pH do meio. O pH inicial que se aproximava de cinco em todas as amostras (variando de 5,76 para o catecol até 4,83 para o ácido 4-hidroxibenzóico) desceu para valores próximos de três (de 2,34 para o catecol até 2,46 para o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico).

Dos resultados que se obtiveram com estes ensaios, não parece ter influência para o crescimento da estirpe, o facto dos compostos serem fenóis simples, pertencerem ao grupo dos ácidos fenolcarboxílicos ou dos ácidos fenilpropanóides. O que parece ser mais importante para o metabolismo microbiano é o tipo de substituinte, o número de substituintes e a posição do anel benzénico em que o substituinte está localizado.

As posições 3 e 4, respectivamente *meta* e *para*, ou associações de ambas parecem favorecer a degradação do núcleo benzénico pelo microrganismo. O substituinte mais favorável parece ser o grupo hidroxilo, apesar de substituições pelo grupo metoxilo manterem a *performance* do isolado quanto à utilização do composto fenólico como fonte única de carbono e energia.

3.4. Metabolismo celular dos compostos fenólicos no isolado selvagem de *Candida oleophila*

3.4.1. Metabolismo celular dos orto-difenóis no isolado de *C.oleophila*

O catecol foi usado como fonte única de carbono e energia pela *Candida oleophila* apenas à concentração de 100 mg/L. Durante o período de incubação, foram retiradas amostras do meio de cultura, que foram analisadas por HPLC em fase



reversa, e identificaram-se os compostos resultantes da degradação, sempre que possível. O catecol foi imediatamente metabolizado, sendo convertido noutro composto. No caso do crescimento da levedura, neste estudo, o composto metabolizado surge com um novo pico, com tempo de retenção inferior, revelando então ser mais hidrofílico do que o catecol. Este produto é depois metabolizado pelo isolado, formando-se um ainda mais hidrofílico e que não é eluído até ao final do ensaio.

Resultados semelhantes foram publicados em ensaios com *Candida tropicalis* usando clorofenol (Ahuatzi-Chacón *et al.*, 2004). A degradação do catecol por isolados de fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Graphium* e *Fusarium*) revelou a formação de ácido cis,cis-mucónico, como produto intermediário da conversão do catecol a piruvato e acetil CoA pela via da orto-clivagem (Santos e Linardi, 2004). Já uma estirpe de *Yarrowia lipolytica* (Lee *et al.*, 2001) degradou o catecol com formação de semialdeído 2-hidroximucónico, indicando a via da meta-clivagem do anel benzénico. Aparentemente, a via usada para a degradação do catecol está muito dependente da estirpe em estudo. A via degradativa do catecol por orto-clivagem foi também identificada em *Trichosporon cutaneum* (Chtourou *et al.*, 2004), *Candida tropicalis* (Ahuatzi-Chacón *et al.*, 2004) e *Aspergillus awamori* (Stoilova *et al.*, 2007; Stanchev *et al.*, 2008). No caso de *A. awamori*, a estirpe é capaz de metabolizar o catecol a concentrações mais elevadas (1g/L, 2g/L e 3g/L). No entanto, para concentrações superiores a 1g/L, ocorre inibição de crescimento pelo substrato (Stanchev *et al.*, 2008). *T.cutaneum* e *C.tropicalis*, apesar de revelarem fases de latência mais longas, também metabolizam o catecol à concentração de 1g/L. Chtourou e colaboradores (2004) reportaram alguma inibição de crescimento nos ensaios com *T.cutaneum* que atribuíram à formação de compostos tóxicos resultantes da auto-oxidação do catecol, quando em meios de cultura.

Esta última razão apontada poderá justificar a incapacidade que o isolado de *Candida oleophila* teve em crescer com concentrações de catecol superiores a 100 mg/L.

Devido ao facto de não ter sido possível identificar o composto formado pelo isolado de *Candida oleophila* após consumo do catecol do meio, conclui-se que qualquer uma das vias referidas para a conversão do catecol pode estar a ocorrer.

3.4.2. Metabolismo celular dos ácidos fenolcarboxílicos no isolado de *C.oleophila*

O ácido 4-hidroxibenzóico permitiu o crescimento do isolado de *C.oleophila* à concentração de 1000 mg/L. O intervalo de tempo da fase de latência foi longo e,

apenas após dois dias de incubação, foi possível verificar o aumento da absorvância, revelando assim crescimento. Um comportamento muito idêntico foi apresentado pelo isolado a crescer em ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, mas com uma fase de latência inicial bastante mais longa, prolongando-se até aos seis dias. Os cromatogramas obtidos por HPLC (Figura 5.2.) revelaram que o catabolismo do ácido 4-hidroxibenzóico se faz com formação intermédia de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, sendo este composto metabolizado completamente, sem formação de novos compostos intermédios.

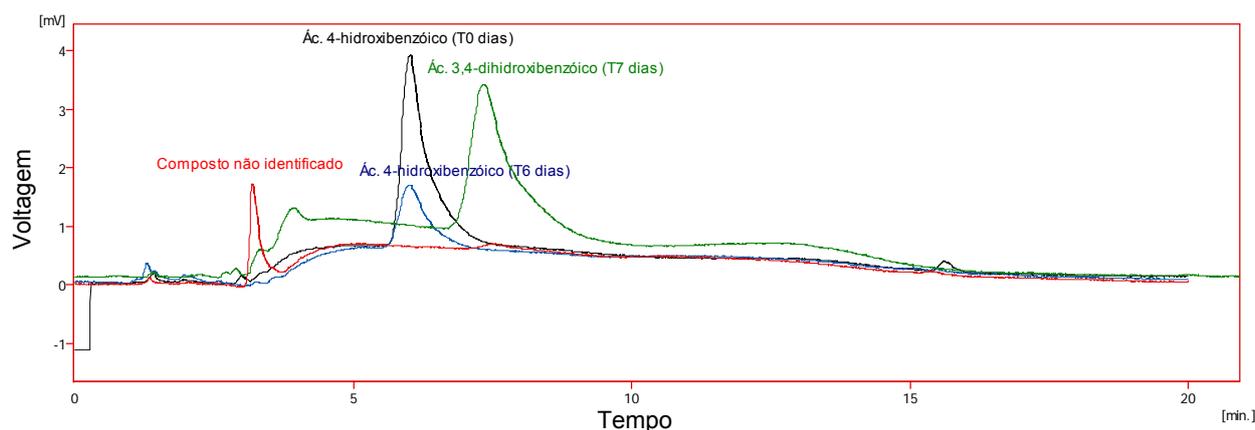


Figura 5.2. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 4-hidroxibenzóico a 1000 mg/L como única fonte de carbono e energia.

Quanto aos cromatogramas obtidos para o crescimento em ácido 3,4-dihidroxibenzóico, verifica-se que este é metabolizado sem formação intermédia de qualquer outro produto (Figura 5.3.).

Como já referido anteriormente, as vias catabólicas de degradação de compostos aromáticos em microrganismos, levam à formação de um número reduzido de compostos intermediários. Quando não é o catecol (simples ou substituído), forma-se, normalmente, o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (Reineke e Knackmuss, 1988; Priefert *et al*, 1997; Santos e Linardi, 2004). A enzima p-hidroxibenzoato hidroxilase (EC 1.14.13.2) é a responsável por canalizar o ácido 4-hidroxibenzóico para a via do β -cetoacilato da degradação de compostos aromáticos, com formação intermédia de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico. Esta enzima foi isolada e identificada em inúmeros microrganismos, sendo produzida na degradação de lenhina e outros compostos das plantas, o que pode explicar a sua presença em microrganismos que habitam em locais com compostos lenhinocelulósicos, como é o caso das águas ruças (Entsch e Van Berkel, 1995). Esta via de formação de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico foi descrita



como forma de metabolismo do ácido 4-hidroxibenzóico em *T. cutaneum* (Chtourou *et al.*, 2004) e em bactérias dos géneros *Comamonas*, *Sphingomonas*, *Ralstonia* e *Pseudomonas* (Di Gioia *et al.*, 2002). Uma estirpe de *Yarrowia lipolytica*, apesar de ter demonstrado capacidade para degradar ácido benzóico, não foi capaz de utilizar nenhum hidroxibenzoato (Lee *et al.*, 2001). Nas espécies de bactérias indicadas detectou-se forte actividade da enzima protocatecuato 4,5-dioxigenase, responsável por metabolizar o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico a um composto que possa entrar noutras rotas metabólicas celulares. Em *Pseudomonas* foi ainda possível verificar actividade de uma dioxigenase intradiol (protocatecuato 3,4-dioxigenase) e em *Sphingomonas*, coexistem, simultaneamente, as enzimas protocatecuato 4,5-dioxigenase e catecol 1,2-dioxigenase (Di Gioia *et al.*, 2002). Este facto dá indicação que ambos os compostos intermediários (catecol e ácido 3,4-di-hidroxibenzóico) podem estar presentes, apesar de não ser uma característica comum na maior parte das espécies estudadas.

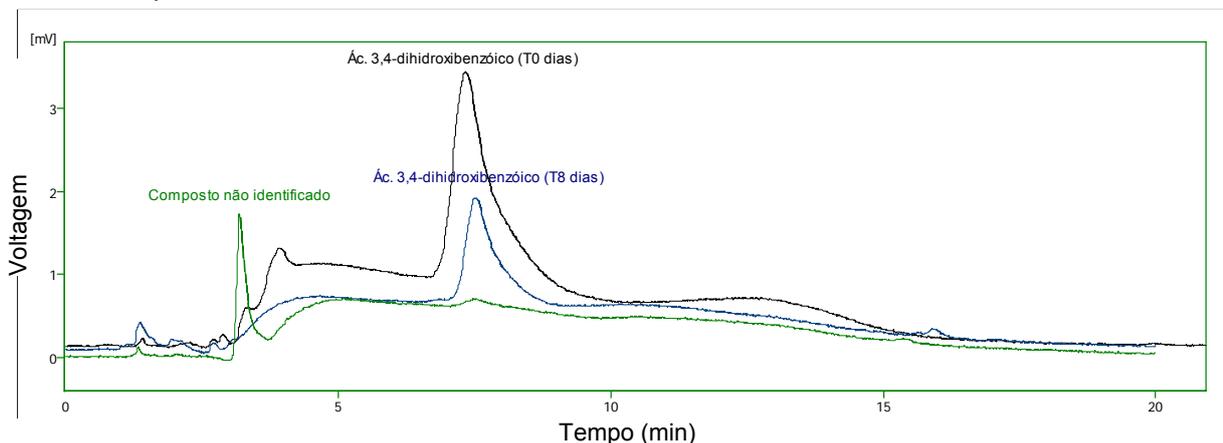


Figura 5.3. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 3,4-di-hidroxibenzóico a 1000 mg/L como fonte única de carbono e energia.

Uma enzima idêntica às protocatecuato dioxigenases (intradiol ou extradiol) terá efectuado o mesmo tipo de reacção no isolado de *C.oleophila* em análise, uma vez que, quer como substrato inicial, quer como produto intermédio do metabolismo do ácido 4-hidroxibenzóico, o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico desapareceu completamente do meio de cultura sem levar à formação de novos compostos aromáticos identificáveis por HPLC.

O isolado de *Candida oleophila* em análise, quando colocado a crescer em meio com 100 mg/L de ácido 4-hidroxibenzóico, 3,4-di-hidroxibenzóico e 2,5-dihidroxibenzóico revelou que mantém células viáveis durante o período de incubação. A densidade óptica do meio de cultura aumenta, até aproximadamente $A_{640} = 0,2$ mas

não ultrapassa este valor. Estes resultados revelam que estas concentrações não são suficientes para manter o crescimento da estirpe. No entanto, pode especular-se que estes ácidos fenólicos não são tóxicos para este isolado.

3.4.3. Metabolismo celular dos ácidos fenilpropanóides no isolado de *C. oleophila*

O isolado de *C.oleophila* é ainda capaz de metabolizar compostos fenilpropanóides substituídos como fonte única de carbono e energia, nomeadamente o ácido 4-hidroxicinâmico e o ácido 3,4-di-hidroxicinâmico.

Em ácido 4-hidroxicinâmico, à concentração de 1000 mg/L, o crescimento teve início após uma fase de latência longa (quatro dias). Esta molécula foi metabolizada pelo isolado com produção intermédia de ácido 4-hidroxi benzóico (portanto via ácido benzóico correspondente), como se pode verificar pelos cromatogramas obtidos por HPLC durante os ensaios de crescimento (Figura 5.4.)

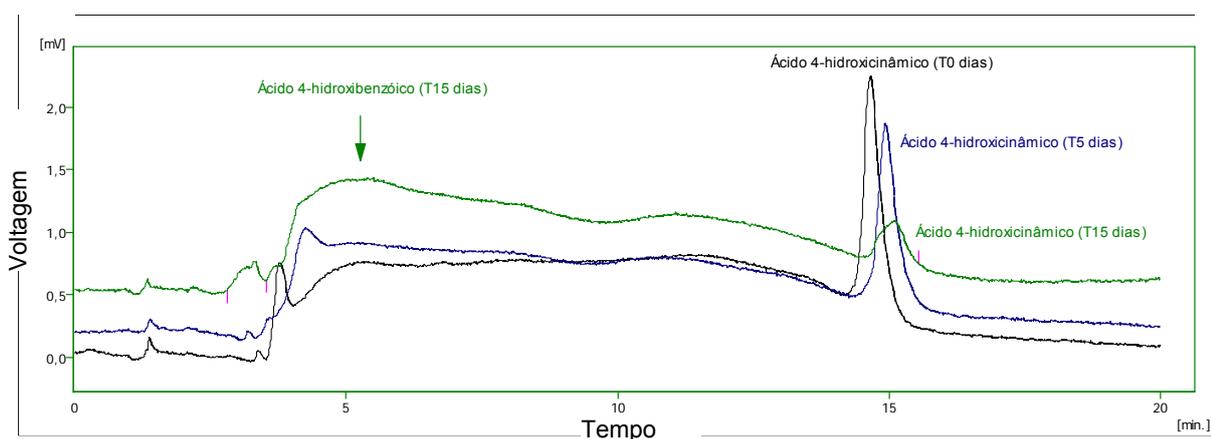


Figura 5.4. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 4-hidroxicinâmico a 1000 mg/L como fonte única de carbono e energia.

A degradação de compostos cinâmicos é normalmente efectuada pela conversão destes nos seus equivalentes ácidos fenilpropenóides/fenolcarboxílicos (Chamka *et al.*, 2001; Di Gioia *et al.*, 2002) ou, ainda, pela sua conversão em ácidos benzóicos ou aldeídos aromáticos de valor comercial (como a vanilina ou benzaldeídos) (Delneri *et al.*, 1995; Brunati *et al.*, 2004). A primeira via degradativa referida encontra-se bem descrita em bactérias aeróbias e anaeróbias. Em isolados de fungos e leveduras, o crescimento, usando como fonte única de carbono e energia este ácido, não foi muito explorado. Chtourou e colaboradores (2004) obtiveram bons resultados de biodegradação de ácido 4-hidroxicinâmico, utilizando culturas de *Trichosporum cutaneum*, que metabolizou este composto à concentração de 1000



mg/L. Este isolado apresentou a menor fase de latência, de entre os compostos que testaram, tendo sido metabolizado por hidroxilação do núcleo benzénico, seguida de clivagem oxidativa e finalmente assimilação dos compostos por β -oxidação. Brunati e colaboradores (2004), num estudo alargado com mais de 500 isolados de actinomicetas, revelaram que os mesmos podem apresentar diferentes formas de utilizar os cinamatos como substratos, dependendo do isolado. A via de degradação usada pelo isolado de *Candida oleophila* em estudo, terá sido a conversão do ácido 4-hidroxicinâmico em ácido 4-hidroxibenzóico. Este composto, à semelhança do que ocorreu no crescimento em que era fonte única de carbono e energia, terá sido convertido em ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, sendo finalmente clivado para entrar na rota do β -cetoadipato. Esta via metabólica foi proposta também para isolados de *Acinetobacter* (Delneri *et al.*, 1995).

O ácido 3,4-di-hidroxicinâmico é um ácido cinâmico dihidroxilado que foi metabolizado pelo isolado de *C.oleophila* às concentrações de 1000 mg/L e 100 mg/L, sendo dos compostos testados o único que permitiu o crescimento às duas concentrações. Na Figura 5.5. mostram-se os resultados de crescimento obtidos, para este composto fenólico, à concentração de 100 mg/L.

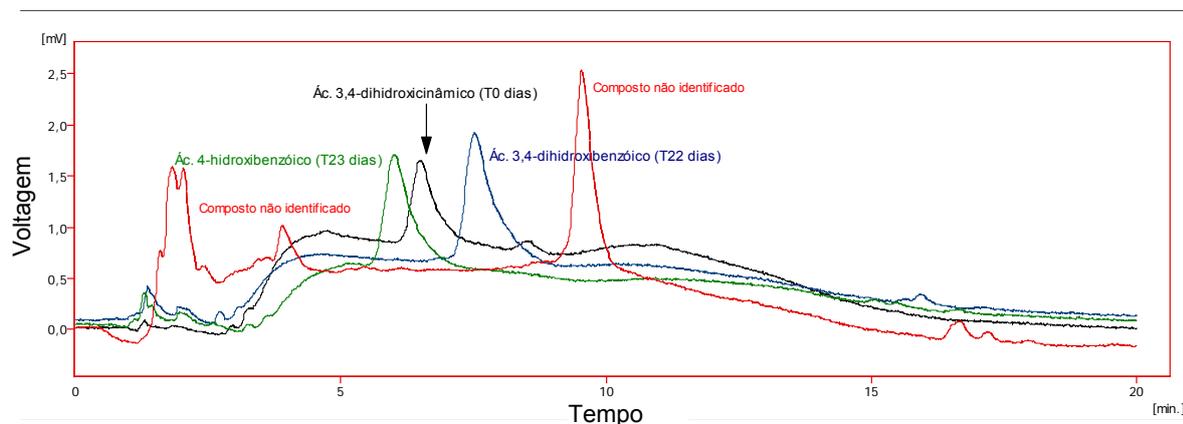


Figura 5.5. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 3,4-di-hidroxicinâmico a 100 mg/L como fonte única de carbono e energia.

A análise da Figura 5.5. revela que a biodegradação do ácido ocorreu com a formação transitória de dois compostos. Em primeiro lugar forma-se o ácido 3,4-dihidroxibenzóico, e posteriormente o ácido 4-hidroxibenzóico. Após o consumo destes dois metabolitos, o crescimento terminou com a formação de um composto mais hidrofílico e um outro mais hidrofóbico, não identificados.

A degradação de ácidos cinâmicos não substituídos não é comum entre os microrganismos (Delneri *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1993; Casa *et al.*, 2003), uma vez

que a presença de pelo menos um grupo hidroxilo é essencial para o seu metabolismo (Andreoni *et al.*, 1995). Tendo-se demonstrado, entre bactérias e fungos, que o metabolismo de ácidos fenilpropenóicos substituídos (particularmente na posição para do anel benzóico) como os ácidos cafeico e ferúlico, como fonte única de carbono e energia, permite o crescimento de isolados, especulou-se que a existência de grupos hidroxilo é determinante para a indução de enzimas capazes de converter estes compostos em intermediários do Ciclo de Krebs (Delneri *et al.*, 1995; Di Gioia *et al.*, 2001a; Chtourou *et al.*, 2004).

Nos ensaios efectuados com o isolado de *Candida oleophila*, e que se apresentam nesta tese, a degradação do ácido 4-hidroxicinâmico ocorreu com formação de ácido 4-hidroxibenzóico, e no caso do ácido 3,4-di-hidroxicinâmico, para além deste mesmo ácido benzóico, ainda com formação intermédia de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico. Esta via de degradação de ácidos cinâmicos foi reconhecida em estirpes de *Ralstonia*, *Comamonas*, *Sphingomonas* e *Pseudomonas*, tendo os autores identificado actividade elevada de duas enzimas, a protocatequato 4,5-di-hidroxigenase (que executa clivagem extradiol) e a protocatequato 3,4-dioxigenase (que faz a clivagem intradiol) (Di Gioia *et al.*, 2002). Outros isolados bacterianos utilizaram a mesma rota (*Clostridium* – Chamka *et al.*, 2001). No entanto, o produto final da degradação dos ácidos cinâmicos foi o respectivo ácido benzóico, que se manteve inalterado. Em espécies de Actinomycetes (cerca de 500 testadas), Brunati e colaboradores (2004) verificaram que o metabolismo do ácido cinâmico pode ocorrer com a sua degradação total, com a formação dos compostos benzóicos correspondentes, ou ainda com a conversão do ácido cinâmico nas suas amidas correspondentes.

3.4.4. Metabolismo celular de compostos fenólicos com substituintes metoxilo no isolado de *C.oleophila*

Avaliaram-se, ainda, como fonte única de carbono e energia, três compostos com substituintes metoxilo. Dois ácidos monometoxilados, ambos na posição 3 do anel, os ácidos 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, e ainda um ácido fenólico dimetoxilado, nas posições 3 e 5 do núcleo benzénico, o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico.

O ácido cinâmico metoxilado não permitiu o crescimento do isolado de *C.oleophila*.

Quanto aos ácidos benzóicos metoxilados, a concentração testada foi de 100 mg/L. Não se apresentam resultados obtidos com concentrações superiores, pois em ensaios preliminares, o isolado de *C.oleophila* não cresceu na presença destes ácidos



com uma concentração de 500 mg/L (dados não apresentados). Para ambos os compostos fenólicos, o isolado de *Candida oleophila* apresenta fases de latência idênticas. A análise dos cromatogramas obtidos permitiu inferir que o crescimento se faz com o consumo quase imediato dos compostos em análise e formação intermédia de ácido 4-hidroxibenzóico (para o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico) (Figura 5.6.) e ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (para além de 4-hidroxibenzóico) no caso do crescimento com ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (Figura 5.7.). Estes metabolitos intermédios foram, entretanto, consumidos e convertidos em catecol no período final de incubação.

Landete e colaboradores (2008) estudaram o efeito dos ácidos 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico em espécies de *Lactobacillus* (i.e. *L.plantarum*) tendo verificado que o isolado apenas metaboliza o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, sendo incapaz de metabolizar os outros compostos. Chtourou *et al.* (2004) analisaram alguns isolados de *Trichosporon cutaneum* e confirmaram que também não metabolizam o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico. Em análises efectuadas com isolados de *Pseudomonas*, Di Gioia e colaboradores (2001a) demonstraram a utilização pela estirpe, quer de ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico, quer de ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico. Nesse estudo identificaram, ainda, a actividade da enzima 4-metoxibenzoato monoxigenase, que terá convertido o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico em ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e, posteriormente, em ácido 3,4-di-hidroxibenzóico que depois foi metabolizado.

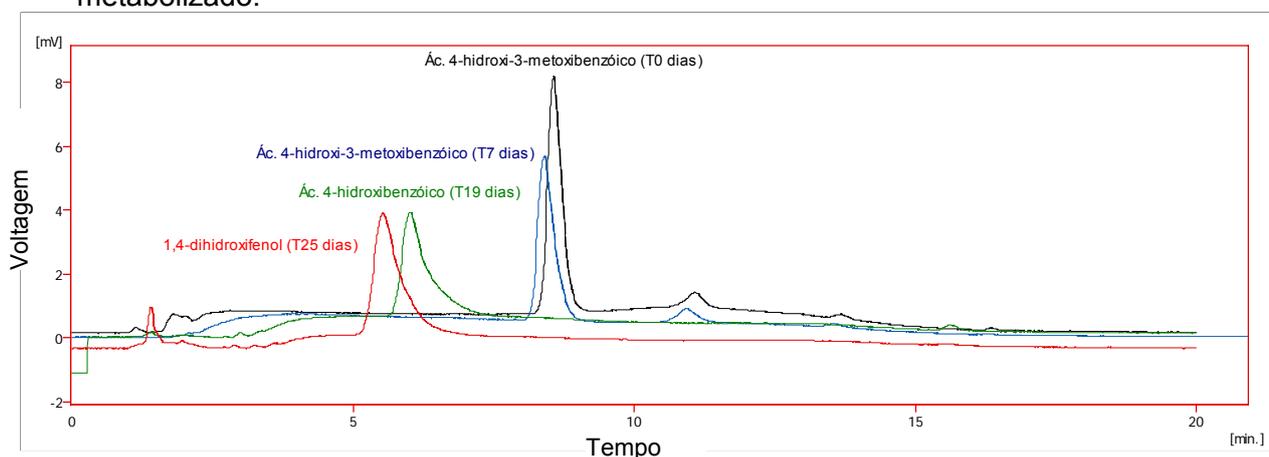


Figura 5.6. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico a 100 mg/L como única fonte de carbono e energia.

No caso do isolado de *C.oleophila* apresentado nesta tese, e com base nos resultados dos cromatogramas, a via de biodegradação destes dois compostos metoxilados decorrerá, também, pela sua conversão em ácidos benzóicos

desmetoxilados. No caso dos ácidos 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico ter-se-ão convertido em ácido 4-hidroxibenzóico, que foi sendo metabolizado com a formação de catecol.

Os resultados obtidos com o isolado de *Candida oleophila* apresentam semelhanças com outros previamente publicados, permitindo, conjuntamente com estes, concluir que a actividade metabólica de compostos aromáticos entre os microrganismos é muito variável e dependente da estirpe/espécie. Esta variabilidade resulta de vários factores que incluem o isolado em análise, os compostos aromáticos utilizados, o objectivo do estudo e as condições experimentais.

O fenol é a unidade estrutural básica de uma variedade de compostos fenólicos cujos efeitos nefastos estão bem documentados, sendo um dos mais comuns poluentes de meios hídricos e gasosos (Agarry *et al.*, 2008). A degradação deste composto é conseguida por numerosos microrganismos, desde bactérias aeróbias e anaeróbias, passando por fungos uni ou pluricelulares. As vias metabólicas de degradação do fenol foram alvo de revisão recente por Agarry e colaboradores (2008).

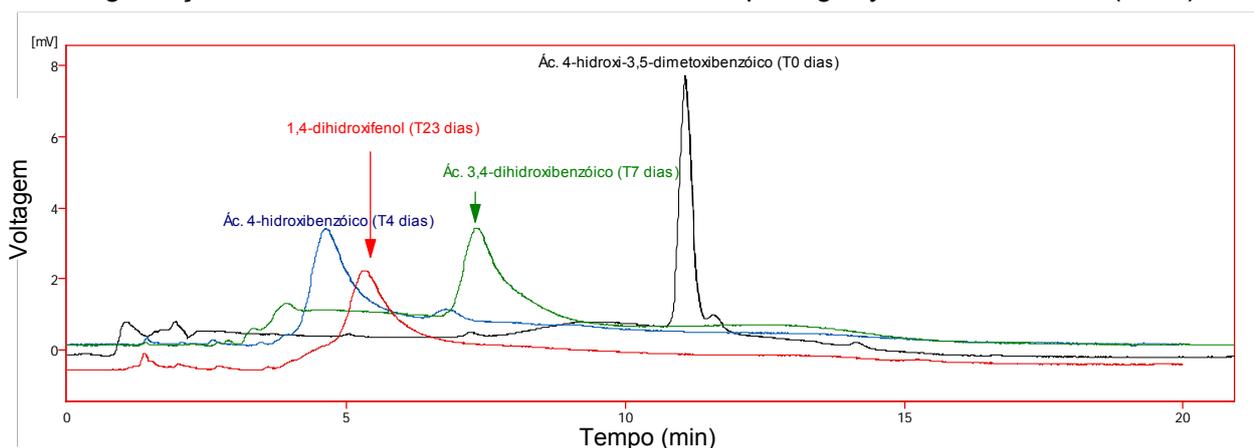


Figura 5.7. Cromatogramas obtidos por análise de amostras do meio recolhidas durante o crescimento de *Candida oleophila* em meio com ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico a 100 mg/L como fonte única de carbono e energia.

O metabolismo microbiano catabólico de compostos aromáticos (fenol e seus derivados) está bem documentado no grupo dos seres vivos procariontes, particularmente no género *Pseudomonas* (Santos e Linardi, 2004; Stoilova *et al.*, 2007, Stanchev *et al.*, 2008). Outros géneros que revelaram capacidade de usar estes compostos como fonte única de carbono e energia, ou degradá-los em misturas complexas, incluem bactérias dos géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Lactobacillus*, *Ralstonia*, *Rhodococcus* e *Sphingomonas* (Delneri *et al.*, 1995; Chamkha *et al.*, 2001; Di Gioia *et al.*, 2001a,b); Di Gioia *et al.*, 2001b; Di Gioia *et*

al., 2002; Ahuatzí-Chacón *et al.*, 2004; Landete *et al.*, 2008). Algumas investigações foram também efectuadas usando microalgas (Lovell *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2002).

A utilização de fungos filamentosos ou leveduras em tecnologias de biorremediação não está ainda considerada em detalhe, mas estes seres vivos apresentam distribuição ubíqua na natureza e capacidade de degradação de substâncias naturais complexas como a lenhina, a celulose ou a quitina. Possuem, ainda, a capacidade de se adaptar facilmente a condições extremas de crescimento, como sejam o baixo pH, o conteúdo limitado de água e nutrientes. Pelo facto de secretarem enzimas extracelulares possuem a capacidade de tolerar e degradar diversos compostos tóxicos (Stanchev *et al.*, 2008). Várias investigações demonstraram a capacidade que fungos dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Graphium*, *Phanerochaete* têm de degradar compostos fenólicos (García-García *et al.*, 2000; Sampedro *et al.*, 2004; Santos e Linardi, 2004; Stoilova *et al.*, 2007; Stanchev *et al.*, 2008). A utilização de leveduras em ensaios semelhantes está menos disseminada mas pode ser encontrada alguma bibliografia sobre a capacidade que leveduras exibem em utilizar compostos fenólicos, quer como fonte única de carbono e energia, quer em misturas variadas dos mesmos compostos. As espécies utilizadas incluem estirpes de *Candida tropicalis*, *C. cylindracea*, *C. rugosa*, *Trichosporon cutaneum* e *Yarrowia lipolytica* (Lee *et al.*, 2001; Ettayebi *et al.*, 2003; Ahuatzí-Chacón *et al.*, 2004; Chtourou *et al.*, 2004; Páca *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009).

Na bibliografia consultada, quer para procariontes, quer para eucariontes, o fenol e a sua degradação está amplamente documentada. Na presença de oxigénio, a degradação inicia-se geralmente pela hidroxilação, por uma monoxigenase fenol-hidroxilase, na posição orto do anel benzénico, levando à formação de catecol. O segundo passo consiste na clivagem do catecol por catecol-dioxigenases. Esta clivagem pode ocorrer na posição orto, sendo a reacção mediada pela catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1). Neste caso, o catecol é convertido posteriormente em ácido cis,cis-mucónico, que leva à formação de succinato e acetil-CoA, podendo depois ser utilizados no Ciclo de Krebs. Esta via degradativa é também designada de via do β -cetoacido. A clivagem do catecol pode ainda ocorrer na posição meta, com formação intermédia de semialdeído 2-hidroximucónico, seguida da formação de formato, piruvato e acetaldeído (Lee *et al.*, 2001; Ahuatzí-Chacón *et al.*, 2004; Páca *et al.*, 2007; Agarry *et al.*, 2008). Apesar de pouco descrita na literatura, Lee e colaboradores (2001) confirmaram esta via catabólica do catecol em leveduras da espécie *Yarrowia lipolytica*. Existem, no entanto, publicações que indicam que a via da

meta-clivagem não está descrita em leveduras e fungos (Santos e Linardi, 2004; Agarry *et al.*, 2008).

A degradação de outros compostos fenólicos, distintos do fenol, é menos conhecida, pois cada grupo de investigação tem testado moléculas distintas consoante os objectivos do estudo. No entanto, em todos é consensual que ocorre a transformação dos compostos iniciais num número limitado de compostos intermédios, normalmente o catecol (simples ou substituído) e o ácido 3,4-di-hidroxibenzóico (Reineke e Knackmuss, 1988; Priefert *et al.*, 1997; Santos e Linardi, 2004). Na maior parte dos casos descritos, estes intermediários dihidroxilados são canalizados para a orto-clivagem, via rota do β -cetoacido, que leva à formação de compostos de rotas metabólicas cruciais como o Ciclo de Krebs.

Este esquema geral de rotas catabólicas para compostos aromáticos sugere que os microrganismos estenderam o seu intervalo de utilização de substratos, desenvolvendo enzimas periféricas capazes de converter substratos iniciais em um dos intermediários centrais. Este mecanismo pode contribuir para a adaptação metabólica de fungos ubíquos na natureza, expostos a xenobióticos e a vários compostos aromáticos, como alguns dos que se podem identificar em águas residuais de lagares de azeite (Santos e Linardi, 2004).

Os resultados acima apresentados e discutidos, revelaram pela primeira vez a utilização de compostos aromáticos derivados do fenol por uma levedura da espécie *Candida oleophila*. Permitiram, ainda, verificar que compostos intermediários são formados durante o seu metabolismo, e concluir que este isolado apresenta uma boa capacidade de crescer e de utilizar como fontes únicas de carbono e energia vários compostos fenólicos. De entre estes, o isolado de *C.oleophila* utiliza compostos substituídos hidroxilados e metoxilados. É ainda possível inferir que o metabolismo dos compostos fenólicos avaliados integra a formação de catecol, e/ou de ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, o que pressupõe a existência de uma via metabólica de clivagem do núcleo benzénico por catecol dioxigenases, e por protocatequato dioxigenases, ambas levando à formação de compostos da via do β -cetoacido. Esta rota pressupõe a formação de piruvato e acetil CoA, que entrarão noutras rotas metabólicas celulares principais, como o Ciclo de Krebs. A pesquisa da actividade destas enzimas é um assunto que se encontra já em fase preparatória de investigação.

Em resumo, pode afirmar-se que a capacidade que um microrganismo tem de usar um determinado composto, estará relacionada com o número, tipo e posição dos substituintes que entram na constituição da molécula em questão. Normalmente, quanto maior o número de substituintes, mais tóxica e menos degradável se torna a substância. Acrescenta-se, ainda, que as substituições na posição *orto* e na posição



para do anel benzénico são frequentemente mais degradáveis do que as substituições na posição meta, como se verificou nos resultados obtidos com este isolado de *Candida oleophila* e também já documentado por outras investigações (Agarry *et al.*, 2008).

3.5. Avaliação da Toxicidade de águas ruças tratadas após incubação com o isolado de *Candida oleophila*

3.5.1. Caracterização físico-química da água ruça antes e após o tratamento com *Candida oleophila*

Como se referiu ao indicar os objectivos do trabalho apresentado neste capítulo, após avaliação da capacidade de *Candida oleophila* para usar compostos fenólicos normalmente presentes em águas ruças, como única fonte de carbono e energia, testou-se a sua capacidade de crescer e metabolizar estes compostos em águas residuais colhidas na CAOM, sem diluição e sem adição de suplementos.

A toxicidade foi avaliada recorrendo a testes de germinação, considerada uma escala macro, testes de inibição de luminescência de bactérias, considerada uma escala micro, e na actividade bioenergética de mitocôndrias, considerando uma escala sub-celular e molecular.

As águas ruças utilizadas neste ensaio experimental foram recolhidas na CAOM durante a campanha oleícola correspondente ao ano 2005/2006. A amostra foi retirada das águas depositadas conjuntamente com a pasta de azeitona, desde o início da laboração contínua, numa bacia de evaporação, localizada no exterior das instalações da Cooperativa Agrícola.

Pelo facto de terem estado algum tempo sujeitas a processos de oxidação naturais, estimaram-se alguns parâmetros físico-químicos, para caracterizar sumariamente a água ruça utilizada nos ensaios de toxicidade.

A água ruça após filtração e esterilização apresentou valores de CQO de 3740 mg/L, condutividade de 37,7 mS, Abs₃₉₀ de 2,62 e teor em polifenóis totais de 618 mg_{ác.cafeico}/L. Os mesmos parâmetros foram avaliados 30 dias depois da inoculação com *Candida oleophila*. Assim, a água ruça após 30 dias de incubação apresentava valores de CQO de 1685 mg/L, condutividade de 12,5 mS, Abs₃₉₀ de 3,20 e teor em polifenóis totais de 103 mg_{ác.cafeico}/L (Tabela 5.4).

A diminuição do teor em matéria orgânica, revelada pelo abaixamento em 55% do valor da CQO, conjuntamente com uma diminuição em 83% do teor em polifenóis totais, demonstra a capacidade que o isolado possui de metabolizar algumas substâncias presentes na amostra, utilizando-as para o seu crescimento.

Tabela 5.4. Parâmetros físico-químicos avaliados nas amostras de água ruça antes da incubação (ARnt) e após a incubação de um mês (ARt) com o isolado seleccionado de *Candida oleophila*.

Parâmetros Físico-Químicos Analisados	Água Ruça Não Tratada (ARnt)	Água Ruça Tratada com isolado de <i>Candida</i> <i>oleophila</i> (ARt)	% Remoção
CQO (mgO ₂ /L)	3740	1685	55
Condutividade (mS)	37,7	12,5	77
Absorvância _{390nm}	2,62	3,20	122
Polifenóis Totais (mg _{ác.cafeico} /L)	619	103	83

Outras equipas de investigação testaram a eficiência de fungos na remoção de matéria orgânica, a partir de amostras de águas ruças (Sayadi and Ellouz, 1995; Vinciguerra *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1998, 2004; Hamman *et al.*, 1999; Assas *et al.*, 2000; García *et al.*, 2000; Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Kachouri *et al.*, 2005; Aissam *et al.*, 2007; Martinez-Garcia *et al.*, 2007, 2009; Sassi *et al.*, 2008; Asses *et al.*, 2009a; Gonçalves *et al.*, 2009). As maiores eficiências registaram-se para fungos filamentosos das espécies *Phanerochaete chrysosporium* (78% remoção da COD) (Garcia Garcia *et al.*, 2000; Sayadi e Ellouz, 1995) e *Panus tigrinus* (79,4% remoção da CQO) (D'Annibale *et al.*, 1998). Estas espécies cresceram em amostras de água ruça com carga orgânica inicial de 80 gO₂/L, e 43 gO₂/L, respectivamente, mas com meio suplementado, com compostos de azoto, para apresentar razões de C/N elevadas. De um modo geral, as leveduras apresentam uma eficiência de remoção mais baixa, provavelmente, porque as suas células são mais pequenas, e crescem menos do que os longos micélios dos fungos filamentosos. Sassi *et al.* (2008) e Gonçalves *et al.* (2009) ao testarem leveduras de colecções (*Candida rugosa* PYCC 3238, 62,2% de remoção de CQO) ou isoladas de ambientes naturais (*Candida diddensiae* ymc78 isolado de água ruça, 64,8% remoção da CQO) apresentaram resultados semelhantes aos que se registaram para o isolado de *Candida oleophila*. É importante registar que as maiores eficiências de remoção da carga orgânica, obtidas para culturas com fungos filamentosos, ocorreram em meios suplementados para aumentar a disponibilidade de azoto, ao contrário dos ensaios efectuados com o isolado em estudo nesta tese. No entanto, num ensaio comparativo entre isolados de *Geotrichum* sp., *Aspergillus* sp, e *Candida tropicalis*, a equipa de Fadil (2003) demonstrou que a levedura apresentou maiores eficiências de remoção da CQO, se a cultura fosse agitada. Comparando as eficiências entre os microrganismos, pode-se



especular, que as leveduras apresentam uma capacidade notável para crescer neste tipo de água residual, e que possuem um elevado potencial para remover a carga orgânica.

A diminuição do teor em compostos fenólicos foi acompanhada de um aumento da coloração da amostra, medida pela absorvância a 390 nm. Este processo de escurecimento e aumento da cor foi também registado por outras equipas de investigação (Asses *et al.*, 2009b). Resulta dos processos de oxidação e polimerização de compostos fenólicos monoméricos, originando polímeros complexos de coloração recalcitrante (Asses *et al.*, 2009b). Esta oxidação é favorecida pela agitação (Asses *et al.*, 2009a) e pela esterilização prévia da água ruça (Fontoulakis *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003).

A remoção de compostos fenólicos pode ser efectuada por bactérias, leveduras e fungos (Martinez-García *et al.*, 2009). Recentemente, investigou-se a capacidade que alguns isolados de leveduras expressam para o tratamento de águas ruças, conjugando este processo com a produção de compostos de valor acrescentado, como sejam, a produção de biomassa e de enzimas (Lanciotti *et al.*, 2005). Algumas das espécies estudadas incluem isolados de *Candida tropicalis*, *C. cylindracea*, *C. rugosa*, *Trichosporon cutaneum* e *Yarrowia lipolytica* (Lee *et al.*, 2001; Ettayebi *et al.*, 2003; Ahuatzi-Chacón *et al.*, 2004; Chtourou *et al.*, 2004; Páca *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2009).

Conforme a análise efectuada nos capítulos 3 e 4 deste trabalho, e de acordo com as publicações de Sassi *et al.* (2006) e Amaral *et al.* (2008), as leveduras revelaram ser organismos predominantes nas águas ruças, comparativamente com bactérias e fungos.

Sassi e colaboradores (2008) isolaram cerca de 100 leveduras a partir de amostras de água ruça, de lagares marroquinos, e testaram a sua capacidade para crescer e remover fenóis de amostras de água ruça esterilizada e não diluída, de forma semelhante ao procedimento que foi efectuada neste trabalho. Os valores mais elevados, registados por estes autores, foram obtidos com isolados de *Candida diddensis*, *C. holstii* e *Pichia* sp, que removeram cerca de 40% do teor em fenóis totais.

Algumas leveduras foram também testadas, com o objectivo de remover alguma matéria fenólica, como pré-tratamento para digestão anaeróbia. O tratamento aeróbio com isolados de *Candida tropicalis* foi feito em água ruça não diluída, em mistura com soro de queijo (Martínéz-García *et al.*, 2007) ou efluentes suinícolas (Martínéz-García *et al.*, 2009). Ambos obtiveram resultados semelhantes, tendo-se registado uma maior eficiência do processo anaeróbio, pois no pré-tratamento,

removeu-se alguma carga orgânica, e o teor em compostos fenólicos, que provocam alguma inibição metanogénica, foi baixado em 51%.

Noutras publicações, usando água ruça com suplementos inorgânicos de azoto e fósforo, foi possível registar valores elevados de remoção de matéria fenólica usando fungos como *Panus tigrinus*, que removeu mais de 75% do teor em polifenóis totais (D'Annibale *et al.*, 2004) ou *Lentinus edodes*, que baixou em 88% o teor em compostos fenólicos (D'Annibale *et al.*, 1998). Mais recentemente Gonçalves *et al.*, (2009) testaram algumas leveduras das espécies *Candida rugosa*, *C.cylindracea* ou *Yarrowia lipolytica*, e estas não revelaram as capacidades mais adequadas para a remoção de fenóis, pois os valores mais elevados registados no estudo foram 31% de remoção. Importa, no entanto, salientar, que a carga orgânica inicial, elevada, pode ter contribuído para as baixas eficiências obtidas.

O isolado de *Candida oleophila*, usado nesta tese, revelou, comparativamente com os registos apontados nos parágrafos anteriores, eficiência de remoção de compostos fenólicos de água ruça não diluída, não suplementada e esterilizada, semelhantes aos referidos para espécies de fungos da podridão branca. Recorda-se que estes possuem um sistema enzimático, de secreção extracelular, altamente eficiente para a degradação de compostos fenólicos, sistema não identificado, tanto quanto se sabe até ao momento, em leveduras. Uma das razões que poderá estar a contribuir para esta elevada eficiência, será a proveniência do isolado, que se obteve directamente a partir de amostras de água ruça.

3.5.2. Caracterização dos compostos fenólicos presentes nas amostras de águas ruças antes e após tratamento com o isolado de *Candida oleophila*

Simultaneamente com esta caracterização físico-química, efectuou-se também a caracterização por HPLC dos compostos fenólicos presentes nestas amostras. O cromatograma tipo obtido está apresentado na Figura 5.8.

A observação do cromatograma permite verificar que estas águas residuais são muito ricas em compostos aromáticos, nos quais se incluem os compostos fenólicos. Para a identificação das substâncias fenólicas, dando particular importância às moléculas de baixo peso molecular, recorreu-se à injeção de padrões externos puros, e compararam-se os seus tempos de retenção bem como os espectros de Ultra-Violeta (UV), com os compostos que se pretendia identificar. Foi possível identificar oito substâncias (indicadas de acordo com tempos de retenção crescentes): ácido gálico (GAL), hidroquinona (HiQ), ácido 4-hidroxibenzóico (pHB), catecol (CAT), hidroxitiroso (HYT), ácido 4-hidroxiacetico (pHFac), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (VAN), ácido 4-hidroxicinâmico (CUM) (Tabela 5.5). Quanto à



abundância dos compostos identificados, verificou-se que o ácido gálico, a hidroquinona e o catecol foram os que surgiram em maiores concentrações, seguidos pelos ácidos 4-hidroxifenilacético, e 4-hidroxibenzóico.

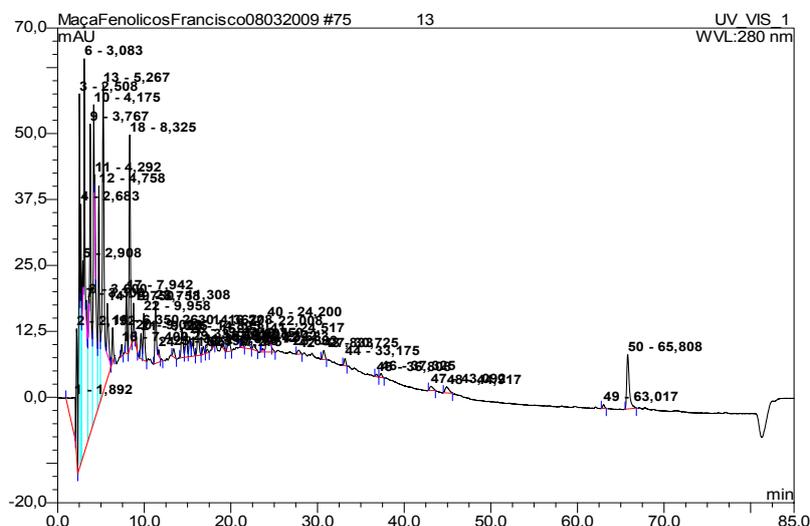


Figura 5.8. Cromatograma tipo de amostra de água ruça obtida na CAOM, antes do tratamento com o isolado selvagem de *Candida oleophila*.

Procedeu-se ainda ao mesmo tipo de análise um mês depois da água ter sido inoculada com o isolado selvagem de *Candida oleophila*. O cromatograma obtido depois deste tratamento encontra-se na Figura 5.9, e um resumo dos compostos fenólicos bem como as suas abundâncias relativas são apresentados na Tabela 5.5.

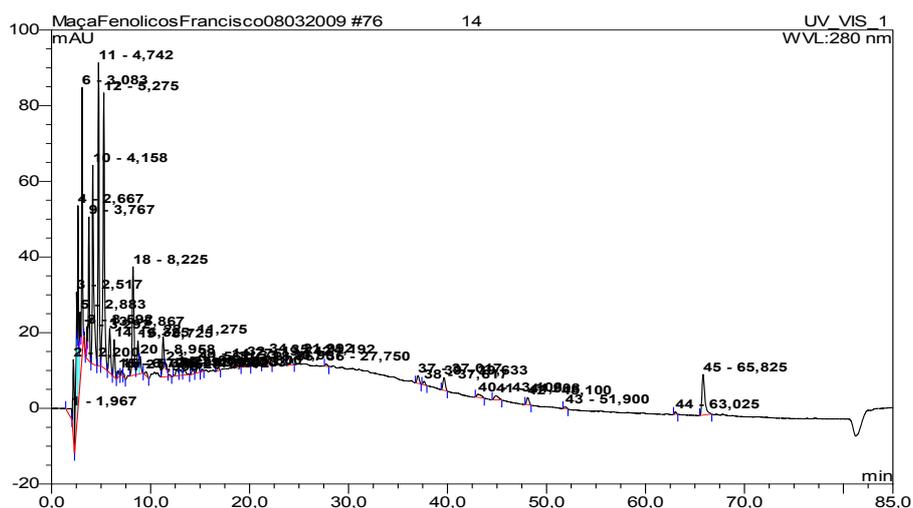


Figura 5.9. Cromatograma da água ruça tratada com *Candida oleophila* após 1 mês de incubação.

De uma forma geral, o tratamento com o isolado de *Candida oleophila* resultou numa diminuição de muitos dos compostos fenólicos originalmente presentes na amostra. A levedura foi capaz de metabolizar a hidroquinona, o catecol, os ácidos 4-hidroxifenilacético, 4-hidroxi-3-metoxibenzóico, 4-hidroxicinâmico e tânico, assim como o tirosol, diminuindo as suas concentrações nas amostras (Tabela 5.5). Destes, consumiu completamente os ácidos 4-hidroxi-3-metoxibenzóico e 4-hidroxicinâmico. Quanto aos restantes, a levedura foi capaz de metabolizar os compostos com maior ou menor extensão, variando a acção sobre cada um deles. A hidroquinona e o catecol, ambos di-hidroxifenóis, que diferem apenas pela posição dos grupos hidroxilo no anel benzénico, são, dos compostos identificados, os que existem em maiores proporções, e também os que são metabolizados em grande extensão. A hidroquinona é metabolizada em cerca de dois terços da sua concentração inicial, enquanto o catecol é removido em 33%. Como prováveis metabolitos secundários da acção da levedura sobre os compostos fenólicos da água ruça, verificou-se um aumento de ácido 4-hidroxibenzóico e hidroxitirosol.

Tabela 5.5. Identificação e abundância relativa dos compostos fenólicos das amostras de água ruça antes e após tratamento com *Candida oleophila*.

TR (min)	Composto	Água Ruça Não Tratada (mAU*min)	Abundância Relativa (%)	Água Ruça Tratada (1mês) (mAU*min)	Abundância Relativa
2.51	ni	9.411	7.46	4.910	6.39
2.68	ni	6.649	5.27	6.337	8.25
2.88	ni				
3.08	GAL	23.225	18.43	9.427	12.27
3.77	HIQ	15.484	12.28	5.102	6.64
4.18	ni	17.770	14.09	9.007	11.72
4.76	pHB	7.404	5.87	10.450	13.60
5.27	CAT	17.427	13.83	13.450	17.51
5.50	ni				
5.75	HYT	2.060	1.63	2.308	3.00
6.35	ni.	1.048	0.83	1.582	2.06
7.94	ni	1.846	1.46		
8.33	pHFac	7.017	5.56	5.978	7.78
8.76	ni	1.093	0.86	1.722	2.24
8.98	ni				
9.96	VAN	1.896	1.50		
11.31	ni.	2.819	2.24	2.904	3.78
14.37	CUM	1.374	1.09		
14.83	ni	1.079	0.86		
16.21	ni	1.288	1.02		
22.01	ni	1.136	0.90		
24.20	TAN	2.479	1.97		
37.02	ni				
48.11	ni				
65.82	ni	3.528	2.79	3.645	4.74
Total		126.033	100	78.622	100



Quando se promoveu o crescimento do isolado selvagem de *Candida oleophila* em soluções modelo, onde a fonte de carbono e energia era unicamente um composto fenólico, retiraram-se várias conclusões (que foram já discutidas), nas quais se incluiu o facto de o isolado não se desenvolver em todos os compostos fenólicos testados. No entanto, todos os compostos que se usaram no crescimento do isolado estão presentes nestas amostras de água ruça, e não se revelaram tóxicos para a levedura. Esta dualidade de resultados é interessante e importante, porque corrobora a ideia apresentada na secção anterior, de que, os compostos fenólicos monoméricos não são tóxicos para esta levedura, mas a sua utilização metabólica está condicionada pela presença no meio de outra fonte de carbono mais facilmente metabolizável. Por outro lado, pode-se especular que algumas enzimas que a levedura consegue segregar, para promover a utilização de um determinado composto, não têm actividade sobre outros, mesmo que de composição molecular semelhante.

A bibliografia, versando o assunto em análise, é conclusiva, ao afirmar que o metabolismo geral de compostos aromáticos, efectuado por leveduras e fungos, tem como produtos intermediários um grupo restrito de compostos, que são depois convertidos noutros que, facilmente, podem ser integrados em vias metabólicas celulares principais. Um dos compostos intermédios é o catecol (Reineke e Knackmuss, 1988; Priefert *et al.*, 1997; Santos e Linardi, 2004). A clivagem do anel (em posição *orto* ou *meta*) leva à produção de compostos que podem entrar nas vias metabólicas celulares principais. Ambas as vias de clivagem foram identificadas em fungos filamentosos e unicelulares (Lee *et al.*, 2001; Ahuatz-Chacón *et al.*, 2004; Santos e Linardi, 2004; Páca *et al.*, 2007; Stoilova *et al.*, 2007; Agarry *et al.*, 2008; Stanchev *et al.*, 2008). O isolado de *Candida oleophila* tinha já revelado capacidade de utilizar o catecol como fonte de carbono e energia, o que se confirmou com a diminuição dos valores iniciais deste composto quando em mistura complexa com outros (na amostra de água ruça), revelando a sua utilização pela levedura.

O segundo composto mais abundante na amostra de água ruça, e cuja concentração diminuiu significativamente com a incubação com o isolado de *Candida oleophila*, foi a hidroquinona. Este composto não permitiu o crescimento da levedura estudada, quando considerado como fonte única de carbono e energia. Os resultados registados no tratamento da água ruça mostram que este difenol é, largamente, metabolizado. Landete e colaboradores (2008), ao determinarem concentrações mínimas inibitórias de compostos fenólicos em isolados de *Lactobacillus plantarum*, verificaram que, apesar de inibirem o crescimento quando testadas de forma isolada, não se revelaram inibitórias quando usaram o meio industrial de onde tinham sido extraídos os fenóis. Na bibliografia consultada, a comparação do comportamento

microbiano em culturas com uma fonte única de carbono, com a cultura em misturas complexas, é reduzida (Stoilova *et al.*, 2007). Está, no entanto, reconhecido, que o metabolismo de um composto numa mistura pode ser fortemente influenciado por outros compostos presentes na mesma (Egli, 1995). Para além disso, demonstrou-se que as rotas biodegradativas de uma substância numa mistura são diferentes da sua degradação quando esta esteja presente como fonte única de carbono (Readon *et al.*, 2000; Stoilova *et al.*, 2007). O metabolismo de moléculas ortodifenólicas, em misturas complexas, é referido como preferencial em diversos microrganismos (Vinciguerra *et al.*, 1995; D'Annibale *et al.*, 1998; Casa *et al.*, 2003), sendo removidos preferencialmente dos meios de crescimento.

É também referido, nas publicações consultadas, que a biodegradação de ácidos cinâmicos e ácidos benzóicos não hidroxilados passa pela sua conversão em ácidos benzóicos correspondentes, que podem depois ser metabolizados para as vias celulares principais (Delneri *et al.*, 1995; Chamka *et al.*, 2001; Di Gioia *et al.*, 2002; Brunati *et al.*, 2004). Este facto é corroborado no presente trabalho pelos valores crescentes de ácido 4-hidroxibenzóico, cujas concentrações aumentam durante o período de incubação. O desaparecimento dos ácidos 4-hidroxifenilacético, 4-hidroxicinâmico e 4-hidroxil-3-metoxibenzóico do meio de cultura pode ter resultado no aumento do ácido 4-hidroxibenzóico.

Como já foi analisado na secção 3.4.3., o ácido cinâmico com substituinte hidroxilo na posição 4 do anel benzénico, foi convertido em ácido benzóico correspondente pelo isolado em estudo. O ácido fenilpropenóide com um substituinte metoxilo, o ácido 4-hidroxil-3-metoxibenzóico, quando usado como fonte de carbono e energia, também foi metabolizado em ácido 4-hidroxibenzóico pelo isolado de *Candida oleophila*. O desaparecimento do ácido 4-hidroxicinâmico e do ácido 4-hidroxil-3-metoxibenzóico da água ruça ao longo do período de incubação, conjugados com o aumento da concentração de ácido 4-hidroxibenzóico, são concordantes com as observações anteriormente referidas. Os resultados obtidos com este isolado assemelham-se a outros registados para isolados de *Trichosporum cutaneum* (Chtourou *et al.*, 2004) e numerosos isolados de actinomicetas (Brunati *et al.*, 2004).

A caracterização química de compostos fenólicos presentes em extractos de águas ruças revela, muitas vezes, a presença de quantidades elevadas de hidroxitirosol, sendo frequentemente referido, conjuntamente com o tirosol, como as moléculas mais abundantes neste tipo de extracto (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Casa *et al.*, 2003; Allouche *et al.*, 2004; De Marco *et al.*, 2007; Asses *et al.*, 2009b). As suas elevadas concentrações podem ser consequência da conversão da oleuropeína neste



composto, resultante do processo natural de maturação da azeitona, bem como de processos de degradação microbiana (Visioli *et al.*, 2002).

No que diz respeito aos compostos que não foi possível identificar pelo método utilizado (método do padrão externo), a acção da levedura foi variável. Durante o período de incubação, ocorreu uma remoção dos compostos do meio, que terá acompanhado o crescimento e adaptação inicial da levedura. O metabolismo da levedura e os processos de oxidação química dos compostos, terão provocado o aparecimento de metabolitos secundários, que se caracterizam por possuírem, de um modo geral, tempos de retenção mais longos, tendo portanto propriedades moleculares mais hidrofóbicas.

3.5.3. Efeito do tratamento de águas ruças com *Candida oleophila* na germinação de sementes de *Lepidum sativum*

Testou-se o efeito do tratamento das águas ruças pelo isolado de *Candida oleophila* na diminuição da toxicidade destas águas no processo de germinação de sementes de agrião de jardim (*Lepidum sativum*). As sementes de *L. sativum* são frequentemente usadas como modelo biológico de plantas dicotiledóneas em testes de fitotoxicidade (Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Isidori *et al.*, 2005), pois revelaram ser das mais sensíveis, entre numerosas espécies vegetais testadas (Barbero *et al.*, 2001).

Os efeitos foram registados relativamente ao número de sementes germinadas e ainda se verificou o alongamento da raiz jovem, para calcular o Índice de Germinação (IG). Este índice foi desenvolvido por Zucconi *et al.* (1981) e adaptado por Komilis e colaboradores (2005), tendo sido usado neste trabalho, o procedimento descrito por Komilis *et al.* (2005).

Na Figura 5.10. encontram-se os registos obtidos nos ensaios efectuados.

A magnitude da fitotoxicidade pode ser indirectamente determinada, considerando o Índice de Germinação, uma vez que este aumenta de forma inversamente proporcional com a toxicidade (Komilis *et al.*, 2005). No caso em análise, verificou-se um efeito relativo à diluição e ao tratamento com a levedura.

A rega das sementes de agrião, com água ruça não tratada, só permitiu a germinação, quando a diluição usada foi de 1 parte de AR em 23 partes de água. O índice obtido revelou valores muito baixos, tendo-se verificado que metade das sementes germinaram, mas o comprimento médio das suas raízes atingiu apenas cerca de 10% do tamanho médio das raízes nos controlos. Não se registou germinação para as outras diluições testadas na AR não tratada, e ainda quando se usou a água ruça tratada sem qualquer diluição.

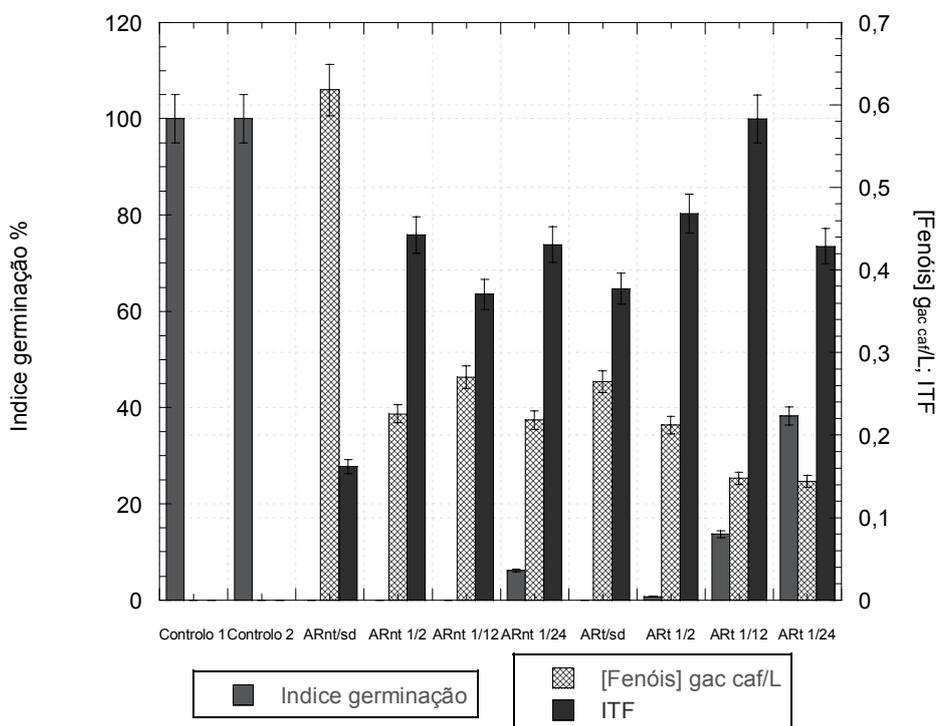


Figura 5.10. Efeito da incubação com *Candida oleophila* e diluição da água ruça no Índice de Germinação e Índice de Toxicidade Fenólica (ITF) em sementes de *Lepidum sativum*. (ARnt/sd – água ruça não tratada sem diluição; ARnt ½ – água ruça não tratada diluída a 50% (v/v) com água; ARnt 1/12 – água ruça não tratada diluída a 8,5% (v/v) com água; ARnt 1/24 – água ruça não tratada diluída a 4,2% (v/v) com água; ARt/sd – água ruça tratada sem diluição; ARt ½ – água ruça tratada diluída a 50% (v/v) com água; ARt 1/12 – água ruça tratada diluída a 8,5% (v/v) com água; ARt 1/24 – água ruça diluída a 4,2% (v/v) com água).

Após o tratamento, a água ruça revelou menor toxicidade, uma vez que logo com a menor diluição (1 AR/1 H₂O) se registou um aumento do IG. Este aumento atingiu valores semelhantes aos registados para a maior diluição, quando se usou água não tratada, no caso da água ruça tratada com a diluição de 1/12. Para a água ruça sujeita a tratamento com *Candida oleophila*, e com diluição de 1/24, o índice de Germinação foi maior do que os outros testados. O maior valor deste índice revelou que o aumento se deveu mais ao comprimento das raízes do que à variação da germinação. Isto é, no caso da AR tratada, registou-se um número maior de sementes a germinar com a diluição intermédia (1/12) do que com a diluição maior (1/24). No entanto, o tamanho das raízes jovens, na diluição maior, foi superior, fazendo aumentar o IG neste último caso.



A fitotoxicidade de águas ruças é uma propriedade muito complexa, pois diferentes compostos podem ser responsabilizados por ela. Apesar dos polifenóis serem frequentemente apontados como os principais responsáveis, facto mais ou menos aceite, mas não claramente comprovado, outras substâncias presentes nas águas ruças podem ter, também, algum papel nas características tóxicas deste efluente (Aliotta *et al.*, 2002). Para além dos compostos fenólicos, outras moléculas pequenas como ácidos orgânicos voláteis, álcoois, aldeídos, ou características como baixo pH e alto teor em sais, podem contribuir para a toxicidade da AR (Tomati *et al.*, 1996; Paredes *et al.*, 1999).

Os testes de fitotoxicidade recorrendo a ensaios de germinação têm sido usados como formas de aferir o efeito de tratamentos, fundamentalmente biológicos, na diminuição da toxicidade destes efluentes (Tsioulpas *et al.*, 2002; Aggelis *et al.*, 2003; Casa *et al.*, 2003; Komilis *et al.*, 2005; Sassi *et al.*, 2006, 2008; Sampedro *et al.*, 2007).

Num ensaio elaborado para aferir sobre a possibilidade de utilizar água ruça não tratada como fonte de água de irrigação para culturas em Marrocos, os autores testaram várias diluições na água ruça proveniente de três tipos distintos de lagares de azeite (Sassi *et al.*, 2006). Concluíram que a germinação de sementes de cevada (*Ordeum vulgare* Var. Tissa) apenas foi possível quando a água ruça foi diluída em 16 partes de água limpa. Concluíram, ainda, que as águas dos lagares tradicionais de prensas, mesmo com a elevada diluição referida, inibiram ainda em parte (20%) a germinação de algumas sementes. Num trabalho posterior, a mesma equipa (Sassi *et al.*, 2008) testou o efeito do tratamento com leveduras das águas ruças, que usou para irrigar novamente sementes de cevada. Verificaram, novamente, que a diluição da água ruça em 50%, favorece o processo de germinação, mas se este efeito for combinado com o tratamento com isolados de leveduras, o IG apresentado melhora claramente.

No presente trabalho, a incubação com o isolado seleccionado de *Candida oleophila* não se revelou tão eficiente, pois à diluição de 50%, o aumento do IG foi de 1%, comparado com os quase 90% de germinação, obtidos pela equipa de Sassi e colaboradores (2008), quando para a mesma diluição, trataram a água ruça com um isolado de *Candida holstii* que obtiveram a partir de amostras de AR.

Tsioulpas *et al* (2002) e Aggelis *et al* (2003) testaram o efeito do tratamento de águas ruças com estirpes de *Pleurotus ostreatus*, tendo registado uma diminuição da toxicidade para sementes de agrião. No trabalho de Aggelis *et al* (2003), testaram também o efeito da diluição (50%, 37,5% e 25% de AR em água), e obtiveram aumento dos índices de germinação que variaram entre 16% e 62%, para o melhor

isolado testado. Nos trabalhos de Tsioulpas *et al* (2002), a estirpe ATCC 34675 foi a que apresentou o maior aumento do IG relativamente ao controlo, tendo aumentado em cerca de 14% mas, mais uma vez, usando AR com alguma diluição (75% em água).

Casa e colaboradores (2003) usaram lacase pura extraída de fungos *Lentinus edodes*, para retirar fenóis de AR, e testar o efeito desta “desfenolização” na diminuição da fitotoxicidade destas águas em amostras de trigo (*Triticum durum* Desf.). Tendo também testado o efeito da diluição, verificaram uma inibição da germinação dependente da concentração. De forma semelhante aos resultados apresentados na Figura 5.10, a AR não diluída bloqueou completamente a germinação das sementes de trigo, e só obtiveram alguma germinação a partir de diluições da água ruça de 1/8. Os índices de germinação melhoraram, de forma significativa, após o tratamento com a lacase (Casa *et al.*, 2003).

A diluição, arejamento, pH e sedimentação das AR foram formas simples e económicas de tratamento propostas por Komilis *et al.* (2005), cujos efeitos foram testados também em ensaios de germinabilidade com sementes de tomate (*Lycopersicum esculentum*) e chicória (*Cichorium intybus*). Verificaram que a diluição é a forma de tratamento que mais afectou a germinabilidade das sementes testadas. Quanto maior for a diluição utilizada, menor a fitotoxicidade, uma vez que a diluição, *per si*, diminui a concentração de todos os compostos presentes. A diluição foi um factor, que nos testes de germinação apresentados nesta tese, também contribuiu, conjuntamente com o tratamento com *Candida oleophila* para a diminuição da toxicidade do efluente.

Por considerarem que a toxicidade das AR se deve especialmente à sua composição fenólica, Tsioulpas e colaboradores (2002) propuseram um parâmetro que correlaciona o Índice de Germinação com a toxicidade dos compostos fenólicos, o Índice de Toxicidade Fenólica (ITF). Neste trabalho, efectuou-se o cálculo deste índice (Figura 5.10), no sentido de verificar se a actividade do isolado de *Candida oleophila* diminuiu a concentração fenólica, e se esta diminuição se correlaciona com a diminuição de toxicidade, e aumento do IG.

No sentido de obter as possíveis correlações entre estes factores, trataram-se estatisticamente os resultados obtidos, usando o software KaleidaGraph versão 4.0 (Synergy Software) para Windows. Calculou-se para os factores em análise o teste de t-Student e uma análise de variância (ANOVA). Os resultados estão sumariados na Tabela 5.6.

O teste estatístico t-Student analisa as diferenças entre as médias de dois grupos, sendo estes dependentes ou independentes. O valor de t indica a relação



entre os grupos, associado a uma probabilidade (p) que mostra se as médias são estatisticamente diferentes. Associa-se ainda uma análise de correlação entre os grupos, cuja probabilidade (p) indica a significância da correlação. Assim, após a realização deste teste, verificou-se que a média obtida para a concentração fenólica nas águas ruças [Fenóis] apresenta diferenças altamente significativas ($p < 0,001$), relativamente às obtidas com os Índices de Germinação (IG) e de Toxicidade Fenólica (ITF). Estas diferenças são muito significativas ($p < 0,01$) entre os dois índices calculados. Quanto às correlações entre os índices e a concentração fenólica, verifica-se que o IG apresenta uma probabilidade altamente significativa de estar correlacionado com a concentração fenólica, variando de forma inversa. Isto significa que o IG tenderá a aumentar com a diminuição do conteúdo fenólico da água com que se irrigam as sementes. Obteve-se uma relação semelhante entre o IG e o ITF, indicando que o IG tende a ser maior quanto menor for o ITF. Já a correlação entre o ITF e a concentração fenólica não apresenta significância estatística.

Tabela 5.6. Análise estatística geral e testes de t-Student e ANOVA dos factores analisados nos ensaios de germinação.

Variáveis Estatísticas	Nº Médio Sementes Germinadas	Tamanho Médio das Sementes Germinadas (mm)	Índice de Germinação (IG)	[fenóis] g/L	Índice Toxicidade Fenólica (ITF)
Média	9,1	24,908	25,862	210,1	0,3264
Mediana	7,0	7,465	2,6745	215	0,3875
Desvio-Padrão	9,0186	35,056	39,395	167,07	0,1947
Variância	81,334	1229,8	1552	27912	0,03791
Erro-Padrão	1,6466	6,4003	7,1926	30,502	0,0355
Teste t-Student					
	Grupo 1: Índice Germinação	Grupo 1: Índice Germinação	Grupo 1: ITF		
	Grupo 2: [Fenóis]	Grupo 2: ITF	Grupo 2: [Fenóis]		
	Valor t: -5,1201	Valor t: 3,5368	Valor t: -6,8787		
	Probabilidade t (p): < 0,0001	Probabilidade t (p): < 0,001	Probabilidade t (p): < 0,0001		
	Correlação: -0,71261	Correlação: -0,77116	Correlação: 0,17682		
	Probabilidade Correlação (p): < 0,0001	Probabilidade Correlação (p): < 0,0001	Probabilidade Correlação (p): 0,3499		
One-Way ANOVA					
	F: 37,656 p < 0,0001				
	Comparação Teste Tukey	Diferença Média	q	P	
	Nº Sem.Ger. vs [Fenóis]	201	14,033	<0,0001	
	Tam.Med. Sem.Ger. vs [Fenóis]	185,192	12,929	<0,0001	
	IG vs [Fenóis]	184,238	12,863	<0,0001	
	ITF vs [Fenóis]	209,774	14,646	<0,0001	
	ITF vs IG	25,536	1,783	0,716	
	ITF vs Tam. Med. Sem. Ger.	24,582	1,716	0,744	
	ITF vs Nº Sem.Ger.	8,774	0,613	0,993	
	IG vs Nº Sem. Ger.	16,763	1,170	0,922	
	IG vs Tam. Med. Sem. Ger.	0,954	0,067	1,000	
	Nº Sem. Ger. Vs Nº Sem. Ger.	15,808	1,104	0,936	

A análise da variância das amostras (ANOVA) verifica se existem diferenças significativas entre médias, mas comparando as variâncias. Comparativamente com o teste t-Student, esta análise de variância permite ver se as médias de três ou mais

grupos de valores são afectadas por um factor. A análise fornece um valor de **F** (com uma probabilidade associada). Este valor de **F**, quando é próximo de 1, indica que não há diferenças entre grupos. Quando apresenta valores elevados, dá indicação que uma ou mais amostras são de populações diferentes, sendo necessário realizar um teste post-Hoc, que determine quais os grupos e o tamanho da diferença. O teste post-Hoc efectuado foi o Teste de Tukey. A análise de variância foi feita considerando todas as medições intervenientes no cálculo dos IG e ITF. Dado ter-se obtido uma probabilidade que indica uma alta significância estatística entre os grupos, realizou-se o teste de Tukey, para comparar todos os pares (Tabela 5.6.). Obtiveram-se efeitos altamente significativos entre a concentração fenólica e os outros factores, nomeadamente nº médio de sementes germinadas, tamanho médio da raiz das sementes germinadas, índice de germinação e índice de toxicidade fenólica. Os resultados da análise de variância estão em concordância com os efectuados com o teste t-Student.

Em resumo, pode referir-se que o Índice de Germinação é afectado inversamente pela concentração em fenóis que existe na água com que se faz a rega das sementes e, conseqüentemente, o Índice de Toxicidade Fenólica também é afectado da mesma forma pelo mesmo factor. No entanto, só o IG está correlacionado com a concentração em fenóis. O ITF não apresenta correlação com a variação da concentração em fenóis. Isto significa que a variação em concentração fenólica apenas afectará de forma significativa a variação do IG, mas não a variação do ITF.

Estes resultados revelam que a toxicidade fenólica não está directamente correlacionada com a diminuição da concentração em fenóis. Na AR tratada pelo isolado de *Candida oleophila*, registou-se uma diminuição de 50% do teor fenólico (nas amostras sem diluição), e não houve um declínio idêntico da toxicidade. Pelo contrário, registou-se um aumento deste índice, uma vez que mesmo com quantidade inferior de fenóis não ocorreu germinação em nenhuma das sementes. Comparando o efeito da diluição registaram-se resultados semelhantes. Para diluições iguais, entre águas ruças tratadas e não tratadas, obtiveram-se ITF semelhantes, com concentrações de fenóis diferentes. Aparentemente, os fenóis remanescentes, ou os que resultam do metabolismo microbiano, apresentam maior toxicidade para a germinação, mesmo que a sua concentração final na amostra seja inferior à inicial. Resultados semelhantes foram apresentados por Martirani *et al.* (1996), Tsioulpas *et al.* (2002) e Aggelis *et al.* (2003), em cujos trabalhos ficou provada a diminuição da toxicidade na germinação, mas também em alguns animais aquáticos. No entanto, é consensual entre as referências, que a diminuição da toxicidade não esteve em correlação com a diminuição do conteúdo fenólico.



Em publicações mais antigas, já se tinha feito referência ao facto de que a oxidação de compostos fenólicos podia aumentar a sua toxicidade (Field e Letinga, 1989), observações confirmadas mais tarde por Martirani *et al.* (1996) e Tsioulpas *et al.* (2002). D'Annibale e colaboradores (2004) atribuíram este efeito à incapacidade que alguns microrganismos usados em tratamentos têm em despolimerizar os fenóis de elevado peso molecular. Por outro lado, apesar de estarem publicados trabalhos que comprovam a capacidade que fungos filamentosos ou leveduras têm de remover compostos fenólicos, o que acontece com cada composto durante a incubação depende da espécie microbiana utilizada.

Este facto, ficou demonstrado, numa publicação recente, mostrando a actividade de um isolado de *Candida holstii* ao diminuir a toxicidade de águas ruças sujeitas a digestão aeróbia. Mas neste caso, e contrariamente aos referidos no parágrafo anterior, estabeleceu-se correlação entre a diminuição da toxicidade com a remoção de compostos fenólicos e carga orgânica (Sassi *et al.*, 2008). Este isolado, à semelhança do trabalho que se apresenta neste capítulo, foi obtido a partir de amostras de águas ruças marroquinas.

3.5.4. Efeito do tratamento das águas ruças com *Candida oleophila* no metabolismo de *Vibrio fischerii*

Nos últimos anos, a realização de testes de toxicidade usando bactérias bioluminescentes tornou-se particularmente popular devido à sua rapidez, reprodutibilidade e facilidade de execução. Este tipo de testes normalmente fornecem resultados sem ambiguidade, e não põem aos investigadores problemas bioéticos (Mekki *et al.*, 2008). A sua aplicação é vasta, sendo usados para avaliar a toxicidade de águas residuais, lamas e resíduos sólidos (Paixão *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Farré e Barceló, 2003; Isidori *et al.*, 2005; Hernando *et al.*, 2006; Mekki *et al.*, 2008).

Neste trabalho, analisou-se a inibição da bioluminescência em *Vibrio fischerii*, testando várias diluições, das amostras de água ruça não tratada e água ruça tratada com o isolado de *Candida oleophila*. Os testes foram efectuados em duplicado, e comparados com um branco, constituído por água à qual se adicionou NaCl à concentração de 2%, de forma a simular as condições de pressão osmótica fundamentais à sobrevivência da bactéria. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.7.

A água ruça sem tratamento revelou ser muito tóxica para este microrganismo, apresentando valores de inibição superiores a 80% da população da bactéria, para diluições até uma parte de AR em 16 partes de água. Mesmo para diluições

superiores, que vão até 1 parte de AR em 96 partes de água (v/v), existe ainda uma certa inibição que ronda os 10%. Mekki e colaboradores (2008) testaram o efeito do tratamento de águas ruças com electro-coagulação seguida de digestão anaeróbica, na inibição da bioluminescência na mesma bactéria. Apresentaram resultados semelhantes, tendo obtido inibição de 96% para amostras não tratadas, com diluição tão elevada como uma parte de AR em 24 partes de água. Após o tratamento efectuado pela equipa de Mekki *et al* (2008), registaram ainda alguma inibição residual (com a diluição de 1/24, a maior testada por este grupo), que os autores atribuíram à presença de compostos fenólicos monoméricos como o hidroxitirosol e o tirosol.

Tabela 5.7. Inibição da bioluminescência (%I_B) em *Vibrio fischerii* após 15 minutos de contacto, nas amostras de água ruça não tratada (ARnt) e água ruça tratada (ARt) com *Candida oleophila*.

Diluições das AR	Água Ruça não tratada		Média %I _B	Água Ruça tratada		Média %I _B
	%I _B (1)	%I _B (2)		%I _B (1)	%I _B (2)	
1/2	99.98	99.96	99.97	98.73	97.86	98.30
1/3	99.91	99.74	99.82	93.54	94.32	93.93
1/4	99.76	99.17	99.47	89.39	88.02	88.71
1/6	98.25	94.65	96.45	77.58	78.54	78.06
1/8	96.36	93.28	94.83	72.71	67.07	69.89
1/12	85.06	80.47	82.73	52.20	56.94	54.57
1/16	75.75	73.44	74.59	44.72	45.59	45.15
1/24	55.84	46.90	51.37	29.95	33.21	31.58
1/32	51.38	45.09	48.24	21.48	33.21	27.35
1/48	25.64	18.269	21.95	14.91	19.96	17.43
1/64	23.61	24.91	24.26	11.91	16.72	14.31
1/96	13.32	8.28	10.80	3.66	8.45	6.06

Após o tratamento com o isolado de *Candida oleophila* deste trabalho, também se verificou (Tabela 5.5.) a presença de hidroxitirosol, em conjunto com ácido 4-hidroxibenzóico, e a forma dialdeídica da aglicona dicarboximetilada de ligstrosido, que poderão ter sido os causadores da toxicidade remanescente.

O tirosol, hidroxitirosol, catecol, oleuropeína, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, normalmente constituintes da fracção fenólica de baixo peso molecular das águas ruças (Fiorentino *et al.*, 2003) são compostos com actividade antibacteriana (Allouche *et al.*, 2004; Obied *et al.*, 2005). A sua actividade tóxica alarga-se a algas, rotíferos e crustáceos (Fiorentino *et al.*, 2003) bem como a plantas (Dhouib *et al.*, 2006a), conforme se comprovou e discutiu na secção anterior.

Para o cálculo do IC₅₀ referente à inibição de bioluminescência causado pelas águas ruças não tratadas e tratadas com *Candida oleophila*, a regressão linear, usada como método de cálculo deste parâmetro, não forneceu valores com significância



estatística ($r < 0,95$), e como tal efectuou-se uma regressão exponencial, apresentando-se os resultados obtidos na Figura 5.11.

Após os cálculos adequados, obtiveram-se os IC_{50} para as amostras de água ruça não tratada e água ruça tratada. Conforme o esperado, a inibição de 50% da população de *Vibrio fischerii* obtido foi diferente entre as duas amostras. Para a **água ruça não tratada**, o IC_{50} corresponde a uma diluição de uma parte de água ruça em 30 partes de água limpa (**3,3% ARnt v/v**). Para a **água ruça tratada**, o IC_{50} baixa para uma parte de água ruça, diluída em 18 partes de água limpa (**5,5% ART v/v**).

A utilização de testes de inibição de bioluminescência, para avaliação da toxicidade de águas ruças, não é referenciada vulgarmente. A comparação de resultados já publicados (Paixão *et al.*, 1999; Isidori *et al.*, 2005; Mekki *et al.*, 2008) com os que se registaram relativamente às amostras de águas ruças não tratadas e tratadas pela levedura seleccionada, na tese que se apresenta, mostra o papel que o isolado de *Candida oleophila* teve na diminuição da toxicidade deste efluente. Esta diminuiu em aproximadamente 50%.

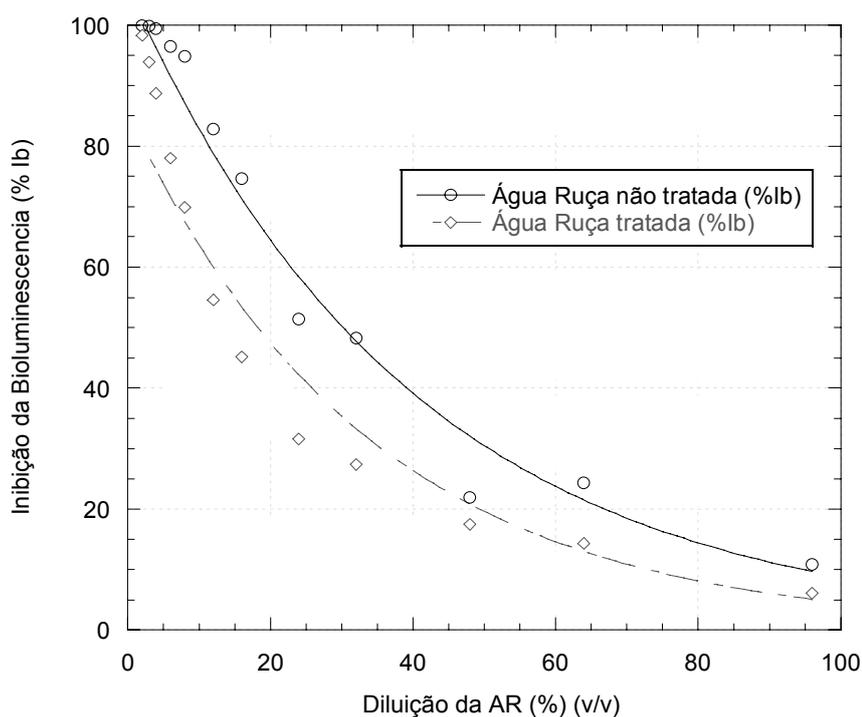


Figura 5.11. Projecção da inibição da bioluminescência em *Vibrio fischerii* causada por águas ruças não tratadas e tratadas, e respectivas regressões exponenciais.

Uma diminuição idêntica foi reportada por Mekki *et al.* (2008) após tratamento/incubação num solo. Este tratamento, quando em conjunto com electrocoagulação e digestão anaeróbia, permitiu a diminuição da toxicidade da água

ruça em 70%. Paixão e colaboradores (1999) não testaram o efeito de tratamentos, antes usaram este teste de biotoxicidade para confirmar a elevada actividade antimicrobiana que estas águas residuais podem ter.

Isidori *et al.* (2005) testaram o efeito isolado de compostos fenólicos encontrados em águas ruças no processo de germinação de sementes e na bioluminescência de *Vibrio fischerii*. Os resultados deste estudo comprovaram o efeito altamente inibidor efectuado pelos compostos fenil-etanóis usados (tirosol, hidroxitirosol e 3,4-di-hidroxifeniletilenoglicol), que apresentaram toxicidade elevada para as concentrações mais baixas. Neste grupo de compostos, as concentrações calculadas para o IC₅₀ em *Vibrio fischerii* variaram entre 0,005 mmol/L e 0,060 mmol/L. Também os ácidos fenil-acéticos e cinâmicos apresentaram resultados altamente inibidores, variando de 0,071 mmol/L para os ácidos cinâmicos até 0,144 mmol/L para os ácidos fenil-acéticos. Dos compostos testados neste estudo, apenas os ácidos benzóicos apresentaram valores de IC₅₀ semelhantes à inibição causada na germinação de sementes de dicotiledóneas (Isidori *et al.*, 2005). Concluíram então que a bactéria bioluminescente se revelou mais sensível relativamente à toxicidade dos compostos fenólicos testados, quando comparada com testes de inibição de germinação de várias sementes. A mesma conclusão foi obtida por Paixão *et al.* (1999) e Mekki *et al.* (2008), que obtiveram os resultados mais sensíveis com esta bactéria comparativamente com outras bactérias como *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens* e *Escherichia coli* (Mekki *et al.*, 2008), e também relativamente a outros grupos de seres vivos como *Thamnocephalus platyurus* e *Daphnia magna* (Paixão *et al.*, 1999).

Os ensaios de toxicidade em amostras de águas ruças não tratadas e tratadas com o isolado seleccionado de *Candida oleophila*, sobre a bioluminescência de *Vibrio fischerii*, mostraram apresentar sensibilidade e fiabilidade para analisar os potenciais efeitos que estas águas residuais poderiam causar se vertidas em meios aquáticos sem qualquer tipo de tratamento. Revelaram, ainda, que o isolado de *Candida oleophila* utilizado para remover alguns dos compostos tóxicos presentes nestas águas, foi capaz de diminuir alguma da toxicidade, que para *Vibrio fischerii* atingiu os 50%.

3.5.5. Efeito do tratamento com *Candida oleophila* na bioenergética mitocondrial

Testou-se ainda o efeito do tratamento das águas ruças pelo isolado de *Candida oleophila*, na diminuição da toxicidade destas águas na bioenergética mitocondrial, utilizando como modelos três complexos respiratórios, o Complexo II (succinato desidrogenase), o Complexo IV (citocromo c oxidase) e o Complexo V (ATP



sintase). As concentrações de AR testadas, foram as mesmas que se utilizaram para testar o efeito do tratamento na germinação de sementes de agrião de jardim e na inibição da luminescência em *Vibrio fischerii* (50% de AR em água, 8,3% de AR em água e 4,2% de AR em água).

A Figura 5.12 mostra o efeito causado na actividade da succinato desidrogenase (SDH), relativamente ao consumo de oxigénio, quando exposta a concentrações distintas de água ruça não tratada (ARnt) e água ruça após incubação com o isolado de *Candida oleophila* (ARt).

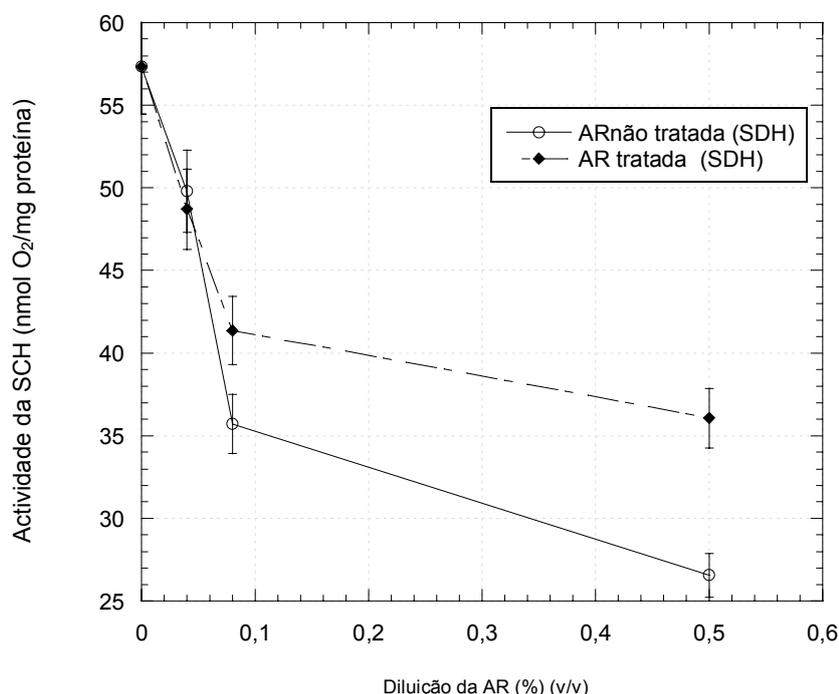


Figura 5.12. Efeito da água ruça não tratada e da água ruça tratada, após incubação com *Candida oleophila*, na actividade da Succinato Desidrogenase.

A incubação das partículas mitocondriais com as águas ruças não tratadas e após incubação com o isolado de *Candida oleophila* provocou um efeito inibidor da actividade do complexo, que se reflectiu na diminuição do consumo de oxigénio. O efeito foi mais notório quando se utilizaram águas ruças não tratadas, levando a concluir que a incubação com a levedura promoveu uma destoxificação na AR.

De forma a estabelecer comparações válidas com os testes de toxicidade efectuados na germinação de sementes e na inibição microbiana, procedeu-se ao cálculo da concentração de AR em que a actividade do complexo enzimático fica inibida a metade (IC_{50}), considerando que 100% da actividade corresponde à actividade máxima do complexo enzimático, registada nos controlos (ausência de AR). O cálculo do IC_{50} foi efectuado utilizando uma equação de regressão não linear (one

phase decay, recorrendo-se ao software GraphPad Prism), tendo-se calculado os valores da inibição dos complexos a 50%, por interpolação (95% confiança).

Para o caso da **SDH**, o **IC₅₀** calculado quando as partículas são incubadas em **AR não tratada**, foi de **22%**. Relativamente ao efeito da **AR tratada** com o isolado de *Candida oleophila*, sobre este complexo enzimático, os resultados mostraram que a toxicidade desta água, comparativamente com a não tratada, diminuiu. De facto, colocando as PSM em meio com ARt, à concentração máxima de AR testada, isto é 50% de diluição em tampão de ensaio, a inibição de actividade do complexo não atinge metade do seu valor inicial registado nos controlos, pelo que não foi possível obter o IC₅₀.

Analisando estes resultados, conclui-se que a incubação com *Candida oleophila* diminuiu a toxicidade do efluente em mais de 50%.

O efeito da incubação com água ruça não tratada e tratada na actividade do complexo IV encontra-se documentado na Figura 5.13.

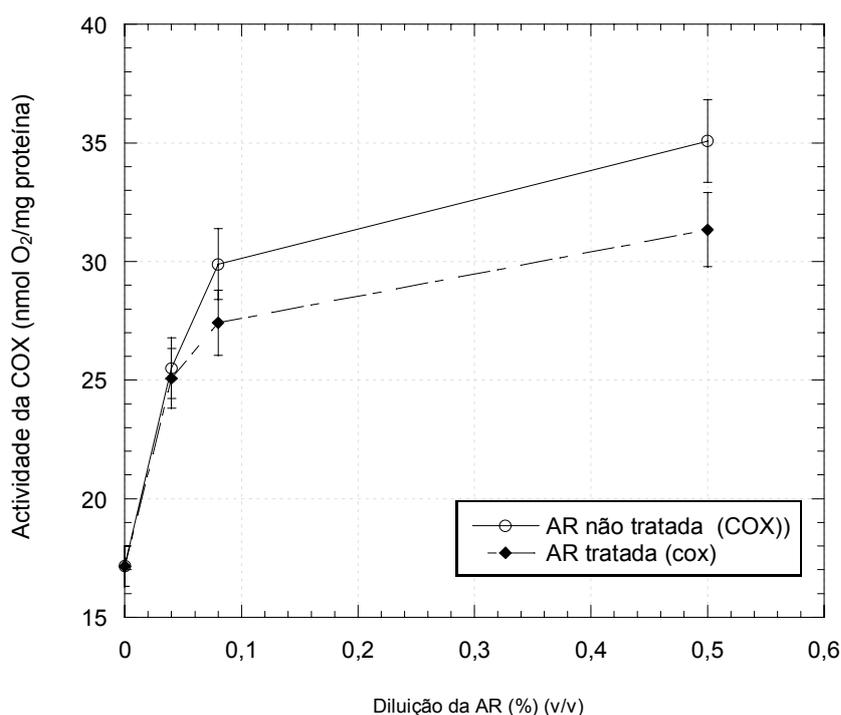


Figura 5.13. Efeito da água ruça não tratada e da água ruça tratada, após incubação com *Candida oleophila*, na actividade da Citocromo c oxidase.

Contrariamente aos resultados registados para a SDH verificou-se que, em meio com AR não tratada e em meio com AR tratada, a actividade do Complexo IV (COX) sofreu um estímulo. Este estímulo, reflectido pelo aumento do consumo de oxigénio pelo complexo enzimático, foi superior quando no meio existia água ruça não tratada.



O efeito das AR neste complexo enzimático, revelou um resultado inesperado. De forma a manter o procedimento que foi adoptado para os restantes marcadores de toxicidade, calculou-se, neste caso, não a concentração de AR que causa 50% de inibição da actividade, mas sim, que concentração de AR, causará um estímulo de 50% na actividade deste complexo, comparativamente com os controlos. O cálculo deste valor foi efectuado recorrendo também a equações de regressão não linear (one phase decay), por interpolação dos valores de estímulo na regressão. As PSM incubadas em ARnt sofreram um estímulo de 50% da actividade do complexo da COX quando esta está diluída 4,4%. Para o caso de incubações das PSM em ARt, o estímulo é menos eficaz, ocorrendo quando a AR está à concentração de 5,3%.

O efeito da AR sobre o complexo da ATPase está representado graficamente na figura 5.14.

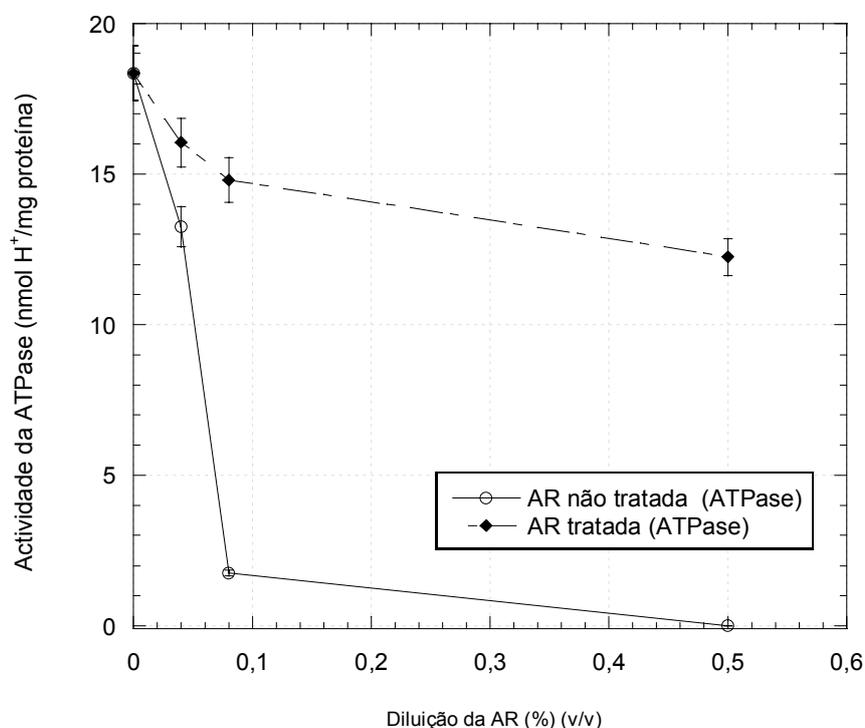


Figura 5.14. Efeito da água ruça não tratada e da água ruça tratada, após incubação com *Candida oleophila*, na actividade da ATPase.

A análise desta figura permite concluir que as AR têm um efeito inibidor deste complexo V, sendo particularmente evidentes os efeitos da água ruça não tratada com o isolado de *Candida oleophila*.

Para o cálculo do IC_{50} , relativo à **ARnt**, obtiveram-se valores de diluição da AR de **4,6%**, causadores de inibição da actividade do complexo, para metade, relativamente aos controlos. Quando as PSM são incubadas em meio com ARt, o efeito inibidor sobre o complexo V é bastante menor, facto que se reflecte no cálculo do IC_{50} . Neste caso, e à semelhança do complexo de SDH, a concentração máxima de **ARt** testada, não diminuiu a actividade da ATPase a valores inferiores a 50% de inibição, e pelas regressões que foram utilizadas, não foi possível calcular o IC_{50} . Concluiu-se, no entanto, que a incubação da AR com o isolado de *Candida oleophila* diminuiu a toxicidade da mesma e conseqüentemente, o seu efeito inibidor sobre a ATPase.

Considerando os efeitos causados pelas AR não tratadas ou tratadas com o isolado seleccionado de *Candida oleophila* sobre os complexos respiratórios seleccionados, e que serviram como modelos, concluiu-se que a toxicidade do efluente diminuiu na ARt. Esta diminuição de toxicidade foi muito significativa no complexo II e V, e apresentou efeito inverso sobre a actividade do complexo IV.

A utilização de mitocôndrias ou partículas submitocondriais, como processo alternativo para ensaios de avaliação de toxicidade, tem tido uma importância crescente, por obviar algumas dificuldades relacionadas com outros métodos de avaliação que utilizam outros modelos biológicos. As dificuldades, que ultrapassam as que resultam do aspecto científico, per si, incluem o facto de serem dispendiosos, morosos, implicando muitas vezes o sacrifício animal. Alguns trabalhos demonstraram que, alterações em sistemas bioquímicos podem ser indicadores mais sensíveis do que em níveis de organização biológica superior. Tendo por base este pressuposto, a mitocôndria tem sido utilizada para pesquisar alterações bioquímicas e fisiológicas causadas pela exposição a poluentes (Argese *et al.*, 1995; Bragadin e Dell'Antone, 1996; Da Silva *et al.*, 1998; Iero *et al.*, 2003; Peixoto *et al.*, 2003, 2004; Peixoto, 2005).

A mitocôndria está envolvida na regulação de numerosos processos celulares, dependentes energeticamente, e como tal, alterações da actividade dos complexos respiratórios, ou da eficiência fosforilativa, podem comprometer seriamente a actividade celular. Este organelo poderá então ser um bom indicador da toxicidade celular (Peixoto *et al.*, 2008).

Apesar da referência a ensaios de toxicidade, utilizando como modelo os efeitos na bioenergética mitocondrial, ser comum para avaliação de numerosos compostos químicos (Knobeloch *et al.*, 1990; Moreno e Madeira, 1990, 1991; Bramble *et al.*, 1994; Bragadin *et al.*, 2002; Peixoto, 2002), a utilização das mitocôndrias na avaliação da toxicidade de águas ruças, foi feita pela segunda vez neste trabalho,



tendo os primeiros resultados sido publicados recentemente em co-autoria (Peixoto *et al.*, 2008).

Comparando os resultados obtidos com as PSM apresentados neste trabalho, com outros usando mitocôndrias intactas (Peixoto *et al.*, 2008), não se verificaram diferenças. A opção de utilização de PSM em detrimento de mitocôndrias congeladas, teve como objectivo obter material cuja exposição dos complexos enzimáticos fosse mais eficiente e uniforme, entre as diferentes amostras, pois quando se utilizam mitocôndrias congeladas, a ruptura membranar por processos de congelamento e descongelamento, não produzem um material tão uniforme (Peixoto, 2002). Para além deste facto, é reconhecida a correlação entre resultados de ensaios de toxicidade usando PSM, e estudos citotóxicos de mamíferos, e de toxicidade aquática em peixes (Moreno e Madeira, 1990; 1991).

Usando as PSM verificou-se uma inibição da actividade dos complexos II e V. Peixoto e colaboradores (2008), utilizando mitocôndrias intactas, obtiveram resultados semelhantes, tendo atribuído este efeito, quer a uma possível inibição das enzimas dos complexos respiratórios, quer à alteração do potencial eléctrico de membrana. Com as PSM podem ter ocorrido fenómenos semelhantes nos dois complexos, que sofreram inibições superiores com a água ruça não tratada. Provavelmente, o isolado de *Candida oleophila*, durante o processo de incubação, terá diminuído a concentração de alguns compostos tóxicos, diminuindo conseqüentemente, o seu efeito sobre a actividade da SDH e da ATPase.

Relativamente à actividade da COX, os resultados apresentados nesta tese diferem dos já publicados. A actividade deste complexo sofreu um estímulo, que se julga estar relacionada com uma actividade não específica ao nível das membranas das PSM, e não, especificamente, sobre a actividade enzimática do complexo. Este efeito ao nível membranar poderá ter aumentado a exposição dos centros activos das enzimas dos complexos, aumentando assim as suas actividades. Estes resultados podem também sugerir um eventual efeito ao nível da plasticidade da membrana, o que poderia, de alguma forma alterar a mobilidade dos complexos enzimáticos, e assim, ter-se observado um aumento da actividade. No entanto, os estudos efectuados neste trabalho, não permitiram obter uma resposta clara e que justifique esta estimulação. Peixoto e colaboradores (2008) não registaram actividade inibitória sobre o complexo da COX, tendo mesmo referido que obtiveram um ligeiro estímulo, com as concentrações mais baixas que testaram. No entanto, como o complexo IV só foi estimulado pelas concentrações mais baixas, não foi considerada a sua discussão.

Comparando os IC₅₀ obtidos nos testes de inibição microbiana, com os obtidos utilizando os complexos respiratórios como modelos, verifica-se que os testes efectuados sobre a *Vibrio fischerii* revelaram ser mais sensíveis. Apesar de se terem verificado efeitos deletérios em dois dos complexos testados, provavelmente, estes não serão os mais afectados, daí terem revelado inibições menos marcadas do que as que se fizeram sentir sobre a actividade da *Vibrio fischerii*.

4. Conclusões

Quando se delineou a estrutura deste capítulo, pretendeu-se confirmar a potencialidade que um microrganismo, isolado de um ambiente tóxico, tem de se adaptar e resistir às condições menos favoráveis desse habitat. Pretendeu-se também medir a sua eficiência depurativa, de forma a considerar o seu potencial uso como tratamento de águas residuais de lagares de azeite.

Assim, concluiu-se que este isolado, da espécie *Candida oleophila*, utiliza compostos fenólicos substituídos hidroxilados e metoxilados do grupo dos ácidos fenilpropenóides e fenolcarboxílicos como fonte de carbono e energia. Os grupos substituintes mais favoráveis à utilização do composto são um ou mais grupos hidroxilo, preferencialmente localizados nas posições 3 (meta) e 4 (para) do anel benzénico. Os substituintes metoxilo, apesar de metabolizáveis, diminuem a concentração a que o composto pode ser utilizado pelo isolado. O metabolismo dos compostos fenólicos avaliados integra a formação de catecol, e/ou de ácido 3,4-dihidroxibenzóico, o que pressupõe a existência de uma via metabólica de clivagem do núcleo benzénico por via do β -cetoacil-CoA. Esta via pressupõe a formação de piruvato e acetil CoA, que entrarão noutras reacções metabólicas celulares principais, como o Ciclo de Krebs.

Concluiu-se ainda que o isolado de *Candida oleophila* é capaz de crescer em AR não diluída nem suplementada, usando a matéria orgânica presente na água como fonte de carbono e energia. O crescimento da levedura contribuiu para a diminuição em 50% da CQO e 83% do teor em polifenóis totais, revelando uma elevada eficiência depurativa.

A incubação de AR com *Candida oleophila* diminuiu a sua toxicidade na germinação de sementes de *Lepidum sativum*. O Índice de Germinação aumentou 1%, 14% e 32%, para as diluições de AR em água de 1/2, 1/12 e 1/24, respectivamente. A análise dos IG e ITF revelou que a toxicidade fenólica não está relacionada com a diminuição da concentração em fenóis, indicando que os compostos fenólicos



resultantes do metabolismo da levedura apresentam maior toxicidade, mesmo com concentrações mais baixas.

O tratamento da AR com a levedura aumentou o IC_{50} em *Vibrio fischerii* de 3,3% ARnt (v/v) para 5,5% ARt (v/v), revelando uma diminuição da toxicidade de aproximadamente 50%.

A água ruça tratada e a água ruça não tratada revelaram um efeito inibitório na actividade da succinato desidrogenase e da ATPase. Este efeito foi mais marcado na ARnt, que se reflectiu nos IC_{50} calculados. Em ambos os casos, verificou-se que a incubação com a *Candida oleophila* diminuiu em mais de 50% a toxicidade das AR. Na SDH para a ARnt obteve-se um IC_{50} de 22% (v/v), que aumentou para valores de diluição da ARt superiores a 50% (v/v). No complexo da ATPase, o valor de IC_{50} calculado para a ARnt corresponde a 4,6% (v/v) que aumenta, mais uma vez, para valores superiores a 50% (v/v) quando se usa a ARt.

A avaliação da toxicidade destas águas residuais, com a bactéria luminescente, revelou então ser mais sensível do que os testes de germinação de sementes de agrião, e do que os testes de avaliação da actividade respiratória em partículas sub-mitochondriais, ficando mais uma vez demonstrado o efeito antimicrobiano das águas ruças.



Capítulo 6

Considerações Finais

Portugal é um dos dez maiores produtores mundiais de azeite, gordura de eleição nos povos da bacia do Mediterrâneo e Península Ibérica. O consumo crescente desta gordura vegetal tem promovido um desenvolvimento acentuado das agro-indústrias oleícolas. Uma das consequências desse aumento de actividade extractora de azeite foi uma produção crescente de sub-produtos. As águas ruças, um dos sub-produtos da agro-indústria oleícola, são produzidas, em grandes quantidades, durante um período relativamente curto do ano (Dezembro a Fevereiro), correspondente ao da safra da azeitona e produção do azeite respectivo. Estas águas residuais têm elevado poder poluente, pois apresentam cargas orgânicas acentuadas, concentração elevada de sais, baixo pH, e concentrações elevadas de compostos fenólicos e ácidos gordos, aos quais têm sido atribuídas diversas características nefastas, nomeadamente propriedades fitotóxicas e antimicrobianas. A aplicação de tratamentos convencionais a estes efluentes tem-se revestido de algumas dificuldades. Dada a elevada carga orgânica destas águas, o tratamento aplicável com maiores probabilidades de sucesso seria a digestão anaeróbia. No entanto, as documentadas propriedades antimicrobianas dos compostos fenólicos, em relação às bactérias metanogénicas, têm obviado a sua aplicação como tratamento de “rotina”. Este facto tem direccionado a investigação internacional no sentido de procurar formas alternativas de tratamento ou pré-tratamento, igualmente eficientes, mas também viáveis do ponto de vista económico, que possam ser aplicadas a estes efluentes.

Tendo como objectivo principal a pesquisa de forma(s) de tratamento para as águas residuais de um lagar de azeite cooperativo em regime contínuo de três fases, localizado na Região de Trás-os-Montes e Alto Douro, este trabalho de tese desenvolveu-se em duas vertentes. Por um lado, fez-se uma primeira caracterização do ambiente físico-químico dos efluentes gerados na unidade extractora onde se recolheram as amostras para este estudo. Em quase todas as unidades industrializadas, antes da extracção do azeite, existe um passo preliminar que consiste na lavagem do fruto. Esta lavagem gera águas residuais, que não apresentando as cargas orgânicas, ou teores de compostos inibidores tão elevadas como as águas da extracção final, vão contribuir para o consumo de água limpa, gerando um fluxo residual que, na maior parte dos casos, juntar-se-á às águas residuais finais da cadeia de extracção. No capítulo dois desta tese, procedeu-se à caracterização físico-química de três fluxos de águas residuais geradas na unidade extractora, cujo objectivo foi identificar os parâmetros físico-químicos, que em menor número, mas com maior correlação estatística, pudessem fielmente descrever as propriedades de um fluxo de água residual de uma unidade agro-industrial do tipo produtor de azeite. Concluiu-se

com este trabalho, que as águas de lavagem geradas no início do processo, apresentam um teor de poluição significativamente inferior ao das águas ruças e, por essa razão, poderiam ser reutilizadas, após um breve tratamento de decantação e sedimentação, seguido de digestão aeróbia. Concluiu-se ainda que os parâmetros físico-químicos que medem directamente a carga orgânica dos efluentes – Carbono Orgânico Dissolvido (COD), e Carência Química de Oxigénio (CQO) - são os que apresentam maiores correlações com os demais. Nas águas ruças, a determinação de seis parâmetros (CQO, COD, teor em potássio (K), teor em fósforo (P) e compostos de azoto (Azoto Kjeldhal (N_{KJ}), Azoto orgânico (N_{org})) permitem estimar com elevada significância estatística quinze parâmetros físico-químicos que normalmente são usados na caracterização rotineira de águas residuais.

A caracterização físico-química de águas ruças é frequente na bibliografia consultada. A caracterização microbiológica destes ambientes é, porém, muito escassa. Com a convicção que estes ambientes poderiam albergar comunidades microbianas mais ou menos abundantes, e ainda, que dadas as condições ambientais, essas comunidades que daí fossem isoladas, apresentariam características adaptativas notórias, efectuou-se uma caracterização microbiológica dos mesmos fluxos de sub-produtos que foram analisados para os parâmetros físico-químicos. Os resultados dessa pesquisa são apresentados no capítulo três. Uma vez que as amostras de onde se obtiveram os isolados microbianos, foram as mesmas, procurou-se identificar qual ou quais os parâmetros físico-químicos que mais influenciaram a abundância de grupos microbianos em cada ponto de amostragem. Apesar de não ter sido possível estabelecer correlações com significância estatística, foi possível concluir que a carga orgânica, diminuição do pH e diminuição da concentração em oxigénio dissolvido, foram os parâmetros que mais contribuíram para a diminuição do número global de indivíduos isolados nos três pontos de amostragem. Concluiu-se ainda que dos três grupos microbianos estudados, Heterotróficos Totais, Leveduras e Fungos Filamentosos, os dois últimos se mostraram mais adaptados a desenvolver-se e crescer nas águas ruças. De uma forma geral, das águas de lavagem até às águas ruças, as condições ambientais são muito diferentes, facto que se reflectiu na abundância dos grupos. No entanto, nas amostras para Heterotróficos Totais, houve dominância das leveduras e dos fungos filamentosos.

Pelo desconhecimento generalizado sobre as espécies que estão associadas a estes ambientes, fez-se uma caracterização microbiológica do grupo das leveduras, usando métodos moleculares, tais como tipagem e sequenciação, cujos resultados são apresentados no capítulo quatro. Esta caracterização e identificação de isolados obtidos a partir de amostras de águas ruças foi, pela primeira vez, efectuada de forma



conjugada com a caracterização físico-química. Permitiu concluir que a maior diversidade de leveduras, bem como o maior número de isolados é obtido a partir das águas de lavagem. Concluiu-se que a diminuição da abundância acompanhou a diminuição da diversidade dentro do grupo das leveduras, e ainda que as espécies mais representativas das águas ruças do lagar de azeite da CAOM são a *Candida oleophila* e a *Candida pomicola*. A *Candida oleophila* foi encontrada em todos os fluxos de sub-produtos avaliados. Encontraram-se, ainda, espécies diversas também do género *Candida*, mas também pertencentes a outros géneros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Metschnikowia*, entre outros.

Devido ao facto de terem sido as espécies identificadas em maior número de isolados, mas principalmente por terem sido isoladas das águas ruças, os isolados das espécies *C.oleophila* e *C.pomicola* foram testados quanto às suas potencialidades em crescer em meios de cultura, com concentrações elevadas de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos que foram testados são frequentemente encontrados nas águas ruças. Após este rastreio inicial, seleccionou-se um isolado de *Candida oleophila*, por ter apresentado capacidade de metabolizar cinco de seis compostos fenólicos analisados.

O isolado seleccionado foi posteriormente caracterizado recorrendo a testes bioquímicos e fisiológicos, e avaliou-se ainda a sua capacidade em utilizar compostos fenólicos hidroxilados e metoxilados como única fonte de carbono e energia. Verificou-se que o isolado de *C.oleophila* é capaz de utilizar como única fonte de carbono e energia, compostos com substituintes hidroxilados e metoxilados. Os grupos ligados aos carbonos das posições 3 (*meta*) e 4 (*para*) do anel benzénico, favorecem a acção da levedura sobre o composto. Foi ainda possível inferir que o metabolismo dos compostos fenólicos avaliados integra a formação de catecol, e/ou de ácido 3,4-dihidroxibenzóico, o que pressupõe a existência de uma via metabólica de clivagem do núcleo benzénico por catecol dioxigenases, e por protocatequato dioxigenases, ambas levando à formação de compostos da via do β -cetoadipato. Esta via pressupõe a formação de piruvato e acetil CoA, que entrarão noutras vias metabólicas celulares principais, como o Ciclo de Krebs. Durante a elaboração desta tese, não foi possível fazer a avaliação da actividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos compostos fenólicos, quando são usados como fonte única de carbono e energia. As enzimas com actividade dioxigenásica estão já referenciadas para outras espécies microbianas, quer de bactérias, de fungos ou de leveduras. No entanto, como não estava ainda descrito o metabolismo de fenóis em *Candida oleophila*, importa saber se de facto as enzimas usadas por esta espécie são semelhantes às descritas para

outras espécies. Este trabalho de pesquisa encontra-se já em fase preliminar de preparação.

O mesmo isolado de *C.oleophila* foi ainda utilizado em ensaios experimentais para promover o tratamento de amostras de águas ruças esterilizadas e não suplementadas, com o objectivo de diminuir a carga orgânica, e alguma concentração em fenóis, para reduzir a toxicidade deste efluente. Este isolado diminuiu a carga orgânica das águas ruças em 55% e o teor em polifenóis em 83%. Para além deste efeito despoluidor, testou-se a toxicidade deste efluente, sem tratamento e após tratamento com o isolado seleccionado de *C.oleophila*. Concluiu-se que a toxicidade na germinação de sementes de *Lepidum sativum* diminuiu na água ruça tratada. Obteve-se um aumento do Índice de Germinação (IG) muito significativo nas sementes regadas com água ruça tratada. Um efeito semelhante obteve-se ao analisar o papel despoluidor na bioluminescência de *Vibrio fischerii*, tendo-se registado resultados concordantes com os da germinação. Para a mesma diluição, o IC₅₀ para esta bactéria aumenta em 50% com a água ruça tratada com o isolado de *C.oleophila*. Os resultados da avaliação da toxicidade da AR, e da diminuição da mesma após tratamento com o isolado seleccionado de *C.oleophila*, foram ainda analisados relativamente à acção na bioenergética mitocondrial. Concluiu-se, como já se tinha concluído anteriormente, usando o mesmo isolado, mas com mitocôndrias intactas, que a água ruça afecta alguns dos complexos respiratórios da mitocôndria. A succinato desidrogenase, a citocromo c oxidase, e ainda a ATPase, mostram sofrer um efeito deletério na sua actividade causado pelas AR, efeito este que é reduzido quando as PSM foram incubadas com as AR tratadas com o isolado de *C.oleophila*.

Os resultados globais que se obtiveram com a pesquisa apresentada nesta tese revelaram-se muito promissores quanto à utilização de microrganismos isolados de ambientes naturais, ainda que com elevados níveis de poluição orgânica. Dadas as imposições temporais, apenas foi possível estudar um pequeno grupo de isolados obtidos a partir de amostras de águas residuais de lagares de azeite. Dentro desse grupo restrito de isolados de leveduras, ficou a conhecer-se um pouco melhor, as características de um isolado identificado como *C.oleophila*. No entanto, o número de isolados que se obtiveram a partir de amostras de AR foi superior. Como se explicou no trabalho, a identificação dos isolados foi efectuada agrupando-os por proximidade de perfis electroforéticos, tendo-se identificado apenas alguns. Pretende-se continuar o processo de identificação, utilizando a sequenciação da região D1/D2 do DNA ribossomal 26S, e efectuar a caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de todos os isolados obtidos no ponto de amostragem AR.



Dadas as características promissoras apresentadas pelo isolado, e referidas no capítulo 5, importa numa fase seguinte, encontrar as melhores condições para promover o seu crescimento e produção. Por outro lado, e agora dadas as limitações espaciais, apenas se efectuaram ensaios experimentais considerando uma escala de aplicação laboratorial. Se um dos objectivos iniciais foi contribuir para o desenvolvimento de um tratamento ou pré-tratamento biológico de águas ruças, é fundamental que este possa ter aplicação industrial. Assim, e como consequência destas implicações, a aplicação deste isolado de *C.oleophila* ao tratamento de efluentes com elevados teores de compostos aromáticos, foi alvo de um processo de patente. A patente, cujos inventores são Marco Lucas, José Alcides Peres, **Carla Amaral**, Ana Sampaio e Albino Alves Dias denominada "Processo Biológico Aeróbio De Tratamento De Efluentes Agro-Industriais Com Elevado Teor Em Compostos Aromáticos Baseado Na Aplicação De Microrganismos Da Espécie *Candida Oleophila*". **P. PAT Nacional 103 738** ficou definitivamente registada a 13 de Agosto de 2009. Nesta patente, já se faz um pouco da transferência de conhecimentos adquiridos com os ensaios à escala laboratorial, resultantes deste trabalho de tese, e ainda da aplicação do mesmo isolado ao tratamento de outros tipos de efluentes agro-industriais, não águas ruças.

A aplicação de fungos filamentosos ao tratamento ou pré-tratamento de águas ruças está bem reportado na literatura, e tem sido uma prática mais ou menos comum. O seu eficiente sistema de secreção extra celular de enzimas lenhicolíticas, confere-lhes propriedades particularmente favoráveis para o tratamento de efluentes como as águas ruças. A aplicação destes fungos a tratamentos à escala industrial tem-se revelado difícil, pois a formação de hifas levanta outros problemas tecnológicos, como seja a formação de espumas. O caminho seguido pela investigação tem sido a extracção e purificação das enzimas extra celulares. Apesar de se obterem bons rendimentos, o processo de extracção e purificação é ainda dispendioso, onerando fortemente o tratamento. A utilização de leveduras tem revelado características promissoras, pois ultrapassa-se a formação de micélios, uma vez que muitas apresentam crescimento em formas unicelulares. Comparativamente, entre fungos filamentosos e leveduras, as eficiências de tratamento são semelhantes. Normalmente, a remoção de compostos fenólicos monoméricos (portanto de baixo peso molecular) é idêntica em ambas, mas os fungos apresentam maior capacidade para remoção da cor escura destas águas residuais, causada pela presença de compostos fenólicos de elevado peso molecular, mais facilmente utilizados pelos fungos filamentosos.

Na literatura consultada, encontraram-se referências a espécies de leveduras aplicadas ao tratamento ou pré-tratamento de águas ruças, mas não se encontrou nenhuma referência à aplicação de isolados desta espécie. Por outro lado, consultaram-se diversos relatórios de trabalhos de investigação, que tendo obtido resultados de destoxificação de águas ruças semelhantes aos que foram apresentados nesta tese, apresentaram procedimentos um pouco distintos. A maior vantagem apresentada pela levedura *Candida oleophila* testada neste trabalho, é que, ao contrário de outros, destoxifica águas ruças não diluídas, nem suplementadas com compostos de azoto e fósforo, como descrito para outros trabalhos. Como passos seguintes, importa otimizar as condições de crescimento e produção do isolado, bem como as condições finais de aplicação do mesmo em estações de tratamento, quer à escala piloto, quer à escala industrial.





Capítulo 7

Referências Bibliográficas

Agarry SE, Durojaiye AO, Solomon BO (2008). "Microbial degradation of phenols: a review". *International Journal of Environment and Pollution*, **32**(1), 12-28.

Aggelis G, Iconomou D, Christou M, Bokas D, Kotzailias S, Christou G (2003). "Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process". *Water Research*, **37**, 3897-3904.

Aguilera JF, Molina E, Boza J (1986). "Nutritional properties of olive residue". *Proceedings of International Symposium on Olive By-products Valorization (FAO)*. 447-471.

Ahuatzi-Chacón D, Ordorica-Morales G, Ruiz-Ordaz G, Cristiani-Urbina E, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer J (2004). "Kinetic study of phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase biosynthesis by *Candida tropicalis* cells grown on different phenolic substrates". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**, 695-702.

Aissam H, Penninckx MJ, Benlemlih M (2007). "Reduction of phenolics content and COD in olive oil mill wastewaters by indigenous yeasts and fungi". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 1203-1208.

Aktas E, Imre S, Ersoy L. (2001). "Characterization and lime treatment of olive mill wastewater". *Water Research*, **35** (9), 2336-2340.

Albuquerque JA, González J, García D, Cegarra J (2004). "Agrochemical characterization of "alpeorajo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction". *Bioresource Technology*, **91**, 195-200.

Aleksieva Z, Ivanova D, Godjevargova T, Atasanov B (2002). "Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporum cutaneum* R57". *Process Biochemistry*, **3**, 1215-1219.

Aliotta G, Fiorentino A, Oliva A, Temussi F (2002). "Olive oil mill wastewater: isolation of polyphenols and their phytotoxicity in vitro". *Allelopathy Journal*, **9**(1), 9-17.

Allouche N, Fki I, Sayadi S (2004). "Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wasteaters". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 267-273.

Amaral C, Lucas MS, Coutinho J, Crespí AL, Anjos MR, Pais C (2008). "Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal". *Bioresource Technology*, **99**, 7215-7223.

Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix J (1986). "Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 823-830.

Andreoni V, Bernasconi S, Bestetti G (1995). "Biotransformation of ferulic acid and related compounds by mutant strain of *Pseudomonas fluorescens*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, 830-835.

Angelakis AN, Marecos do Monte MHF, Bontoux L, Asano T (1999). "The status of wastewater reuse practice in the Mediterranean basin: need for guidelines". *Water Research*, **33** (10), 2201-2217.

Anjos MRAF (2003). "Caracterização de populações de castanheiro (*Castanea* spp.) resistentes e susceptíveis à doença da tinta: uma abordagem polifásica". Tese de Doutoramento. UTAD. Vila Real.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters. 18th Edition. American Public Health Association, 1992, Washington DC.

Aranda E, Sampedro I, Ocampo JA, Garcia-Romera I (2006). "Phenolic removal of olive-mill dry residues by laccase activity of white-rot fungi and its impact on tomato plant growth". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **58**, 176-179.

Argese E, Bettiol C, Gheilli A, Todeschini R, Miana P (1995). "Submitochondrial particles as toxicity biosensors of chlorophenols". *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 363-368.

Arjona R, García A, Ollero P (1999). "The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry". *Journal of Food Engineering*, **41**, 229-234.

Arvanitoyannis I, Kassaveti A, Stefanatos S (2007). "Olive oil waste treatment: a comparative and critical presentation of methods, advantages and disadvantages." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47**, 187-229.

Assas N, Marouani L, Hamdi M (2000). "Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*". *Bioprocess Engineering*, **22**, 503-507.

Asses N, Ayed L, Bouallagui H, Ben Rejeb I, Gargouri M, Hamdi M (2009a). "Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static cultures". *Bioresource Technology*, **100**, 2182-2188.



Asses N, Ayed L, Bouallagui H, Sayadi S, Hamdi M (2009b). "Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*". *International Biodeterioration and Biodegradation*, doi:10.1016/j.ibiod.2008.11.005

Asses N, Ayed L, Marouani L, Hamdi M (2002). "Decolorization of fresh and stored-black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*". *Process Biochemistry*, **38**, 361-365.

Ayed L, Asses N, Sayadi S, Hamdi M (2005). "Involvement of lignin peroxidase in the decolourisation of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*". *Letters in Applied Microbiology*, **40**, 7-11.

Ayed L, Hamdi M (2003). "Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*". *Process Biochemistry*, **39**, 59-65.

Azbar N, Bayram A, Filibeli A, Meuzzinoglu A, Sengul F, Ozer A (2004). "A review of waste management options in olive oil production". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **34**, 209-247.

Bacelar, EA (2006). "Ecophysiological responses of olive (*Olea europaea* L.) to restricted water availability – limitations, damages and drought resistance mechanisms". Tese de Doutoramento. UTAD – Vila Real. Portugal

Baddi GA, Albuquerque JA, Gonzalez J, Cegarra J, Hamdi M (2003). "Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformation during composting of olive mill wastes". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **54**, 39-44.

Balis C, Chatzipavlidis J, Flouri F (1996). "Olive mill waste as a substrate for nitrogen fixation". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38** (3-4), 169-178.

Barbero P, Beltrami M, Baudo R, Rossi D (2001). "Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment". *Journal of Limnology*, **60**(2), 269-276.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000). "Yeasts: Characteristics and Identification – Third Edition". Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Baruzzi F, Matarante A, Caputo L, Morea M (2006). "Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage". *Meat Science*, **72**, 261-269.

Ben Othman N, Ayed L, Assas N, Kachouri F, Hammami M, Hamdi M (2008). "Ecological removal of recalcitrant phenolic compounds of treated olive mill wastewater by *Pediococcus pentosaceus*". *Bioresource Technology*, **99(8)**, 2996-3001.

Benitez FJ, Beltran-Heredia J, Torregosa J, Acero JL (1999). "Treatment of olive mill wastewaters by ozonation, aerobic degradation and the combination of both treatments." *Journal Chemical Technology and Biotechnology*, **74**, 639-646.

Bernhardt FH, Bill E, Trautwein AX, Twiffer H (1988). "4-methoxybenzoate monooxygenase from *Pseudomonas putida*: isolation, biochemical properties, substrate specificity and reaction mechanism of the enzyme components". *Methods of Enzymology*, **161**, 281-294.

Bitton G, Koopman B, Agami O (1992). "MetPADTM: a bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater". *Water Environmental Research*, **64**, 834-836.

Borja R, Alba J, Banks CJ (1996). "Anaerobic digestion of wash waters derived from the purification of virgin olive oil using a hybrid reactor combining a filter and a sludge blanket". *Process Biochemistry*, **31** (3), 219-224.

Borja R, Rincón B, Raposo F, Alba J, Martín A (2002). "A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature". *Process Biochemistry*, **38**, 733-742.

Borja R, Sánchez E, Raposo F, Rincón B, Jiménez AM, Martín A (2006). "A study of the natural biodegradation of two-phase olive mill solid waste during its storage in an evaporation pond". *Waste Management*, **26**, 477-486.

Boudet AM (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds (review)". *Phytochemistry*, **68**, 2722-2735.

Boveris, A (1984). "Determination of the production of superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria". *Methods in Enzymology*, **105**, 429-437.

Bragadin M, Dell'Antone P (1996). "Mitochondrial bioenergetics as affected by cationic detergents". *Archives Environmental and Contamination Toxicology*, **30**, 280-284.

Brunati M, Marinelli F, Bertolini C, Gandolfi R, Daffonchio D, Molinari F (2004). "Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes". *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 3-9.



Brusa T, Borin S, Ferrari F, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D (2001). "Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the eastern Mediterranean sea". *Microbiological Research*, **156**, 49-57.

Cabrera Capitán F (1995). "El alpechin: un problema mediterráneo". In *La Calidad de las Aguas Continentales Españolas. Estado actual e investigación*. Pag. 141-154. Geofoma Ediciones. Logroño. España.

Capasso R, Cristinzio G, Evidente A, Scognamiglio F (1992). "Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters". *Phytochemistry*, **31** (12), 4125-4128.

Capasso R, Evidente A, Schivo L, Orru G, Marcialis MA, Cristinzio G (1995). "Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters". *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 393-398.

Casa R, D'Annibale A, Pieruceti F, Stazi SR, Giovannozzi Sermanni G, Cascio BL (2003). "Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability". *Chemosphere*, **50**, 959-966.

Castro LF, Fernandes AAF (1995). "Substâncias Fenólicas: breves notas sobre a sua estrutura e biosíntese". *Série Didáctica, Ciências Puras*, 9, UTAD. Vila Real.

Caturla N, Pérez-Fons L, Estepa A, Micol V (2005). "Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes". *Chemical Physiology of Lipids*, **137**, 2-17.

CEDGA (2002). "O sector do Azeite na União Europeia". Factsheet da Comissão Europeia Direção-Geral da Agricultura. Junho de 2002. <http://europa.eu.int/comm/agriculture/publi/>

Cermola F, DellaGreca M, Iesce MR, Montella S, Pollio A, Temussi F (2004). "A mild photochemical approach to the degradation of phenols from olive oil mill wastewaters". *Chemosphere*, **55**, 1035-1041.

Cerniglia C, Crow S (1981). "Metabolism of aromatic hydrocarbons by yeasts". *Archives of Microbiology*, **129**, 9-13.

Chamka M, Labat M, Patel BKC, Garcia JL (2001) "Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**, 2049-2054.

Chang SY, Li CT, Hiang SY, Chang MC (1995). "Intraspecific protoplast fusion of *Candida tropicalis* for enhancing phenol degradation". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, 534-538.

Chtourou M, Ammar E, Nasri M, Medhioub K (2004). "Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum*, able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 869-878.

Connor DJ (2005). "Adaptation of olive (*Olea europaea* L.) to water limited environments". *Australian Journal Agricultural Research*, **56**, 1181-1189.

Correia A, Sampaio P, Almeida J, Pais C (2004). "Study of molecular epidemiology of Candidiasis in Portugal by PCR fingerprinting of *Candida* clinical isolates". *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(12), 5899-5903.

Correia A, Sampaio P, James S, Pais C (2006). "*Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*". *Int. Jour. Os Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 313-317.

Crognale S, Federici F, Petruccioli M (2003). "β-glucan production by *Botryosphaeria rhodina* on undiluted olive-mill wastewaters". *Biotechnology Letters*, **25**, 2013-2015.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000). "Natural products (secondary metabolites)" in *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan BB, Grissem W e Jones RL (editors), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Mariland, USA, pp. 1250-1318.

D'Annibale A, Crestini C, Vinciguerra V, Sermanni GG (1998). "The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus". *Journal of Biotechnology*, **61**, 209-218.

D'Annibale A, Ricci M, Quaratino D, Federici F, Fenice M (2004). "*Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater". *Research in Microbiology*. **155**, 596-603.

D'Annibale A, Sermanni GG, Federici F, Petruccioli M (2006). "Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production". *Bioresource Technology*, **97** (15), 1828-1833.



Da Silva EM, Soares AMVM, Moreno AJM (1998). "The use of the mitochondrial transmembrane electric potential as an effective biosensor in ecotoxicological research". *Chemosphere*, **36**, 2375-2390.

Dalis D, Anagnostidis K, Lopez A, Letsiou I, Hartman L (1996). "Anaerobic digestion of total raw olive oil wastewater in a two-stage pilot plant (up-flow and fixed-bed bioreactors)". *Bioresource Technology*, **57**, 237-243.

De Leonardis A, Macciola V, Lembo G, Aretini A, Nag A (2007). "Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater". *Food Chemistry*, **100**, 998-1004.

De Marco E, Savarese M, Paduano A, Sacchi R (2007). "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters". *Food Chemistry*, **104**(2), 858-867.

De Stefano G, Piacquadio P, Servili M, Di Giovachino L, Sciancalepora V (1999). "Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils". *Fett Lipid*, **101**, 328-332.

DellaGreca M, Monaco P, Pinto G, Pollio A, previtera L, Temussi F (2001). "Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wastewaters". *Bulletin of Environment Contamination Toxicology*, **67**, 352-359.

Delneri D, Degrassi G, Rizzo R, Bruschi CV (1995). "Degradation of trans-ferulic and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM586". *Biochimica et Biophysica Acta*, **1244**, 363-367.

Dhouib A, Aloui F, Hamad N, Sayadi S (2006a). "Pilot-plant treatment of olive mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration". *Process Biochemistry*, **41**, 159-167.

Dhouib A, Ellouz M, Aloui F, Sayadi S (2006b). "Effect of bioaugmentation of activated sludge with white-rot fungi on olive mill wastewater detoxification". *Letters in Applied Microbiology*, **42**, 405-411.

Di Gioia D, Bertin L, Fava F, Marchetti L (2001a). "Biodegradation of hydroxylated and methoxylated benzoic, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains". *Research in Microbiology*, **152**, 83-93.

Di Gioia D, Fava F, Bertin L, Marchetti L (2001b). "Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 619-626.

Di Gioia D, Barberio C, Spagnesi S, Marchetti L, Fava F (2002). "Characterization of four olive-mill-wastewater indigenous bacterial strains capable of aerobically degrading hydroxylated and methoxylated monocyclic aromatic compounds". *Archives in Microbiology*, **178**, 208-217.

Di Giovachino 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.

Dias AA, Bezerra RM, Nazaré-Pereira A (2004). "Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater". *Bioresource Technology*, **92**, 7-13.

Dias, JA (2004). "Biorremediação de Águas Ruças: Caracterização de Lacases do Fungo Euc-1". Tese de Doutorado. UTAD – Vila Real. Portugal.

Dice LR (1945). "Measures of the amount of ecologic association between species". *Ecology*, **26**, 297-302.

Dimitrios B (2006). "Sources of natural phenolic antioxidants". *Trends in Food Science and Technology*, **17**, 505-512.

Dlauchy D, Tornai-Lehoczki J, Peter G (1999). "Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as taxonomic tool in yeast identification". *Systematic and Applied Microbiology*, **22**, 445-453.

Egli T (1995). "The ecological and physiological significance of the growth of the heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates". *Advanced Microbial Ecology*, **14**, 305-386.

ENEAPAI (2007). "Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais". Min. Ambiente, Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional e Min. Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Entsch B, Vn Berkel WJH (1995). "Structure and mechanism of p-hydroxybenzoate hydroxylase". *The FASEB Journal*, **9**, 476-483.



Ergul FE, Sargin S, Ongen G, Sukan FV (2008). "Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*". *International Biodeterioration and Biodegradation*, doi: 10.1016/j.ibiod.2008.01.018

Eschenhagen M, Schuppler M, Röske I (2003). "Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents". *Water Research*, **37**, 3224-3232.

Ettayebi K, Errachidi F, Jamai L, Tahri-Jouti MA, Sendide K, Ettayebi M (2003). "Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction". *FEMS Microbiology Letters*, **223**, 215-219.

Eusébio A, Mateus M, Baeta-Hall L, Sàágua MC, Tenreiro R, Almeida-Vara E, Duarte JC (2007). "Characterization of the microbial communities in jet-loop (JACTO) reactors during aerobic olive oil wastewater treatment". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **59**, 226-233.

Fadil K, Chahlaoui A, Ouahbi A, Zaid A, Borja R (2003). "Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry". *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**, 37-41.

FAOSTAT (2007). "FAO statistical databases. Production. Core production data <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?PageID=340>

Farre M, Barcelo D (2003). "Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis". *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 299-310.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000). "Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis". *International Journal of Systematics and Evolucionary Microbiology*, **50**, 1351-1371.

Fernandez-Bolaños J, Rodríguez G, Rodríguez R, Heredia A, Guillén R, Jiménez A (2002). "Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alpeorujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6804-6811.

Field JA, Lettinga G (1989). "The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols". *Biological Wastes*, **29**, 161-179.

Fiorentino A, Gentili A, Isidori M, Monaco P, Nardelli A, Parrella A, Temussi F (2003). "Environmental effects caused by olive mill wastewaters: toxicity comparison of low-molecular-weight phenol components". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1005-1009.

Flórez AB, Mayo B (2006). "Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE". *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 165-171.

Fountoulakis MS, Dokianakis SN, Kornaros ME, Aggelis GG, Lyberatos G (2002). "Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*". *Water Research*, **36**, 4735-4744.

Frutos RL, Fernandez-Espinar MT, Querol A (2004). "Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers". *Antonie Van Leeuwenhoek*, **85**, 175-185.

García-García I, Jimenez Peña PR, Bonilla Venceslada JL, Martín Martín A, Martín Santos MA, Ramos Gómez E (2000). "Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Arpergillus terreus* and *Geotrichum candidum*". *Process Biochemistry*, **35**, 751-758.

García-Gómez A, Roig A, Bernal MP (2002). "Composting of the solid fraction of olive mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity". *Bioresource Technology*, **86**, 59-64.

Gazzotti P, Malmström K, Crompton M (1997). "Membrane biochemistry. A laboratory Manual on Transport and Bioenergetics". Springer, New York.

Gernjak W, Krutzler T, Glaser A, Malato S, Cáceres J, Bauer R (2003). "Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants". *Chemosphere*, **50**, 71-78.

Gharsallah N, Labat M, Aloui F, Sayadi S (1999). "The effect of *Phanerochaete chrysosporium* pretreatment of olive mill wastewaters on anaerobic digestion". *Resources, Conservation and Recycling*, **27**, 187-192.

Giannoutsou EP, Meintanis C, Karagouni AD (2004). "Identification of yeast strains isolated from a two-phase decanter system olive oil waste and investigation of their ability to its fermentation". *Bioresource Technology*, **93**, 301-306.



Gonçalves BMC (2006). “Ecofisiologia da cerejeira (*Prunus avium* L.), composição fenólica e actividade antioxidante dos frutos”. Tese de Doutoramento. UTAD. Vila Real.

Gonçalves C, Lopes M, Ferreira JP, Belo I (2009). “Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts”. *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2009.01.004.

Gouveia, JM (1995). “Azeites Virgens do Alto Alentejo. Comportamento químico, tecnológico e sensorial”. Tese de Doutoramento. ISA – Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

GPPAA (2007). “Azeite e Azeitona de Mesa”. In: *Anuário Vegetal 2005*. Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar, pag 230-237.

Hamdi M (1993). “Thermoacidic precipitation of darkly coloured polyphenols of olive mill wastewaters”. *Environmental Technology*, **14**, 495-500.

Hamdi M, Festino C, Aubart C (1992). “Anaerobic digestion of olive mill wastewaters in fixed film bioreactors”. *Process Biochemistry*, **27**, 37-42.

Hamdi M (1992). “Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **37**, 155-163.

Hamdi M (1993). “Future prospects and constraints of OMW use and treatment: a review”. *Bioprocess Engineering*, **8**, 209-214.

Hamman OB, La Rubia T, Martín J (1999). Decolorization of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete flavidio-alba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18** (11), 2410-2415.

Hernando MD, Malato O, Farre M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D (2006). “Application of ring study: water toxicity determinations by bioluminescence assay with *V. fischeri*”. *Talanta*, **69**, 370–376.

Ho K, Chung Y, Lin Y, Tseng C (2008). “Microbial populations analysis and field application of biofilter for the removal of volatile-sulfur compounds from swine wastewater treatment system”. *Journal of Hazardous Materials*, **152**(2), 580-588.

Huang Z, Dostal L, Rosazza JPN (1993). “Mechanism of ferulic acid conversion to vanillic acid and guaicol by *Rhodotorula rubra*”. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 23954-23958.

Iero A, Manente S, Perin G, Bragadin M (2003). “Frozen mitochondria as rapid water quality bioassay”. *Chemosphere*, **52**, 1115-1123.

Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A (2005). "Model study on the effect of 15 phenolic olive mill wastewater constituents on seed germination and *Vibrio fischerii* metabolism". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8414-8417.

James SA, Cai JP, Roberts IN, Collins MD (1997). "A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**, 453-460.

Jaouani A, Sayadi S, Vanthourhout M, Penninckx MJ (2003). "Potent fungi decolourisation of olive oil mill wastewaters". *Enzyme and Microbial Technology*, **33**, 802-809.

Kachouri S, Halaouli S, Lomascolo A, Asther M, Hamdi M (2005). "Decolourization of black oxidized olive-mill wastewater by a new tannase-producing *Aspergillus flavus* strain isolated from soil". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21**, 1465-1470.

Katayama-Hirayama K, Tobita S, Hirayama K (1994). "Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*". *Water Science and Technology*, **30**, 59-66.

Khoufi S, Aloui F, Sayadi S (2006). "Treatment of olive oil mill wastewater by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion". *Water Research*, **40**, 2007-2016.

Knupp G, Rücker G, Ramos-Cormenzana A, Garrido Hoyos S, Neugebauer M, Ossenkop T (1996). "Problems of identifying phenolic compounds during the microbial degradation of olive mill wastewater". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 277-282.

Komilis PD, Karatzas E, Halvadakis CP (2005). "The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pretreatment techniques". *Journal of Environmental Management*, **74**, 339-348.

Kotsou M, Mari I, Lasaridi K, Chatzipavlidis I, Balis C, Kyriacou A (2004). "The effect of olive oil mill wastewater (OMW) on soil microbial communities and suppressiveness against *Rhizoctonia solani*". *Applied Soil Ecology*, **26**, 113-121.

Kumar B, Trivedi P, Mishra AK, Pandey A, Planí LK (2004). "Microbial diversity of soil from two hot springs in Uttarakhand Himalaya". *Microbiological Research*, **159**, 141-146.



Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). "Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences". *Antonie Van Leeuwenhoek*, **3**, 331-371.

Kurtzman CP (2001). "Four new *Candida* species from geographically diverse locations". *Antonie Van Leeuwenhoek*, **79**, 353-361.

Laitila A, Wihelmsen A, Kotaviita E, Oikku J, Home S, Juvonen R (2006). "Yeasts in an industrial malting ecosystem". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, 953-966.

Lanciotti R, Gianotti A, Baldi D, Angrisani R, Suzzi G, Mastrocola D, Guerzoni ME (2005). "Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewaters". *Bioresource Technology*, **96**, 317-322.

Landete JM, Curiel JÁ, Rodríguez H, De las Rivas B, Muñoz R (2008). "Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains". *Food Chemistry*, **107**, 320-326.

Lee, Jeong-Soon, Eun-Jeong Kang, Min-Ok Kim, Dong-Hun Lee, Kyung Sook Bae, Chi-Kyung Kim (2001). "Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol". *Journal of microbiology and Biotechnology*, **11**(1), 112-117.

Lesage-Meessen L, Navarros D, Maunier S, Sigoillot JC, Lorquin J, Delattre M, Simon JL, Asther M, Labat M (2001). "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems". *Food Chemistry*, **75**, 501-507.

Lin CCS, Fung DY (1987). "Conventional and rapid methods for yeast identification". *Critical Reviews in Microbiology*, **14**, 273-289.

Liu W, Chan O, Fang H (2002). "Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater". *Water Research*, **36**, 1767-1775.

Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F, Prillinger H (2006). "Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques". *Food Microbiology*, **23**, 341-350.

López C, Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM (2002). "Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation". *Journal of Biotechnology*, **99**, 249-257.

Lovell CR, Eriksen NT, Lewitus AJ, Chen YP (2002). "Resistance of the marine diatom *Thalassiosira* sp. to toxicity of phenolic compounds". *Marine Ecology Progress Series*, **229**, 11-18.

Mac Gillivray A, Shiaris M (1993). "Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments". *Applied Environmental Microbiology*, **59**, 1613-1618.

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J (1990). "Fruit Phenolics". CRC Press, Boca Raton, FL, 378 pp.

Mantzavinos D, Kalogerakis N (2005). "Treatment of olive mill effluents Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes – an overview". *Environment International*, **31**, 289-295.

Martinez-Garcia G, Johnson AC, Bachman RT, Williams CJ, Burgoyne A, Edyvean RGJ (2007). "Two-stage biological treatment of olive mill wastewater with whey as co-substrate". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **59**, 273-282.

Martinez-Garcia G, Johnson AC, Bachman RT, Williams CJ, Burgoyne A, Edyvean RGJ (2009). "Anaerobic treatment of olive mill wastewater and piggery effluents fermented with *Candida tropicalis*". *Journal of Hazardous Materials*, **164**, 1398-1405.

Martins F, Gomes-Laranjo J, Amaral C, Almeida J, Peixoto F (2008). "Evaluation of olive oil mill wastewaters acute toxicity: a study on the mitochondrial bioenergetics". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**, 480-487.

Martirani L, Giardina P, Marzullo L, Sannia G (1996). "Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*". *Water Research*, **30**(8), 1914-1918.

McClelland M, Petersen C, Welsh J (1992). "Length polymorphisms in tRNA intergenic spacer detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species". *Journal of Clinical Microbiology*, **30**, 1499-1504.

McNamara CJ, Anastasiou CC, O'Flaherty V, Mitchell R (2008). "Bioremediation of Olive Mill Wastewater: Review". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **61**, 127-134.

Mechichi T, Sayadi S (2005). "Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters". *Process Biochemistry*, **40**, 139-145.



Mekki A, Dhouib A, Feki F, Sayadi S (2008). "Assessment of toxicity of the untreated and treated olive mill wastewaters and soil irrigated by using microbiotests". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**, 488-495.

Mekki A, Dhouib A, Sayadi S (2006). "Changes in microbial and soil properties following ammendment with treated and untreated OMW". *Microbiological Research*, **161**, 93-101.

Mendonça E, Martins A, Anselmo AM (2004). "Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*". *Electronic Journal of Biotechnology*, **7** (1), 30-37.

Meunier JR, Grimont PAD (1993). "Factors affecting reproduceibility of amplified polymorphic DNA fingerprint". *Research in Microbiology*, **144**, 373-379.

Meysami B, Kasaeian AB (2005). "Use of coagulants in treatment of olive oil wastewater model solutions by induced air flotation". *Bioresource Technology*, **96**, 303-307.

Montedoro G, Servili M, Baldioli M, Miniati E (1992). "Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1 Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 1571-1576.

Monteiro A (1999). "A Oliveira". *Colecção Património Natural Transmontano*. João Azevedo Editor. Mirandela. Portugal.

Mouncif M, Tamoh S, Faid M, Achkari-Begdouri A (1993). "A study of chemical and microbiological characteristics of olive mill waste water in Morocco". *Grasas y Aceites*, **44** (6), 335-338.

Nei M, Li WH (1979). "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5269-5273.

Novotny C, Dias N, Kapanen A, Malachova K (2006). "Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes". *Chemosphere* **63**, 1436-1442.

Obied HK, Allen MS, Bedgood DR, Prenzler PD, Robards K, Stockman R (2005). "Bioactivity and analisis of biophenols recovered from olive mill waste". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 823-837.

Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB (2001). "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans". *Journal of Nutrition*, **131**, 66-71.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B (2000). "Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants". *The Lancet Oncology*, **1**, 107-112.

Páca Jr J, Kremlácková V, Turek M, Suchá V, Vilimková L, Páca J, Halecky M, Stiborová M (2007). "Isolation and partial characterization of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in *Candida tropicalis* yeast". *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 919-926.

Paixão SM, Mendonça E, Picado A, Anselmo AM (1999). "Acute toxicity evaluation of olive oil mill wastewaters: a comparative study of three aquatic organisms". *Environmental Toxicology*, **14**, 263-269.

Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G (2007). "Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media". *Bioresource Technology*, **99**(7), 2419-2428.

Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G (2008). "Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media". *Bioresource Technology*, **29**(7), 2419-2428.

Paredes C, Bernal MP, Cegarra J, Roig A (2002). "Biodegradation of olive mill wastewater sludge by tis co-composting with agricultural wastes". *Bioresource Technology*, **85**, 1-8.

Paredes C, Bernal MP, Roig A, Cegarra J (2001). "Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes". *Biodegradation*, **12**, 225-234.

Paredes C, Cegarra J, Roig A, Sanchez-Monedero MA, Bernal MP (1999). "Characterization of olive-mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes". *Bioresource Technology*, **67**, 111-115.

Paredes C, Roig A, Bernal MP, Sánchez-Monedero MA, Cegarra J (2000). "Evolution of organic matter and nitrogen during co-composting of olive mill wastewater with solid organic wastes". *Biology and Fertility of Soils*, **32**, 222-227.

Paredes MJ, Moreno E, Ramos-Cormenzana A, Martinez J (1987). "Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive extraction plants". *Chemosphere*, **16**, 1557-1564.



Pearson K (1896). "Regression, heredity, and panmixia". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Ser. A*, **187**, 253-318. (in STATISTICA electronic manual)

Peixoto F (2005). "Comparative effects of the roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation". *Chemosphere*, **61**, 1115-1122.

Peixoto F, Carvalho MJM, Almeida J, Matos PAC (2004). "Daphnetoxin interacts with mitochondrial oxidative phosphorylation and induces membrane permeability transition in rat liver". *Planta Med*, **11**, 1064-1068.

Peixoto F, Martins F, Amaral C, Gomes-Laranjo J, Almeida JC, Palmeira CM (2008). "Evaluation of olive oil mill wastewater toxicity on the mitochondrial bioenergetics after treatment with *Candida oleophila*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **70** (2), 266-275.

Peixoto F, Vicente JAF, Madeira VMC (2003). "The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions". *Archives Toxicology*, **77**, 403-409.

Pelillo M, Rincón B, Raposo F, Martín A, Borja R (2006). "Mathematical modelling of the aerobic degradation of two-phase olive mill effluents in a batch reactor". *Biochemical Engineering Journal*, **30**, 308-315.

Pereira P (1992). "Processos de tratamento em curso: águas ruças na Região Alentejo". *Revista Ambiente*, 32-36.

Peres JA (2001). "Degradação de ácidos fenólicos por processos de oxidação avançados e pré-tratamento de águas ruças pelo Reagente de Fenton". Tese de Doutoramento. UTAD. Vila Real. Portugal.

Perez S, Farre M, Garcia MJ, Barcelo D (2001). "Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge and their contribution to its toxicity in the ToxAlerts 100 bioassay". *Chemosphere*, **45**, 705-712.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V (2006). "The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function". *Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**, 429-445.

Pinto G, Pollio A, Previtera L, Temussi F (2002). "Biodegradation of phenols by microalgae". *Biotechnology Letters*, **24**, 2047-2051.

Piperidou CI, Chaidou CI, Stalikas CD, Soulti K, Pilidis GA, Balis C (2000). "Bioremediation of olive mill wastewater: chemical alterations induced by *Azotobacter vinelandii*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1941-1948.

Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A (1997). "Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate". *Journal of Bacteriology*, **179**, 2595-2607.

Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Van de Put F, Dacombe C, Rice-Evans C (2002). "The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition". *Free Radicals Research*, **36**, 217-233.

Ramos Ayerbe F (1986). "Application for extracted olive residue". *Proceedings of International Symposium on Olive By-products Valorization (FAO)*. 365-370.

Ramos Suria R (1986). "Extracted olive residue as an energy source". *Proceedings of International Symposium on Olive By-products Valorization (FAO)*. 518-525.

Ramos-Cormenzana A, Juarez-Jimenez B, Garcia-Pareja MP (1996). "Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38** (3-4), 283-290.

Readon KF, Mosteller DC, Rogers JD (2000). "Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1". *Biotechnology and Bioengineering*, **69**, 385-400.

Reineke W, Knackmuss HJ (1988). "Microbial degradation of haloaromatics". *Annual Review Microbiology*, **42**, 263-287.

Ricco G, Tomei MC, Ramadorib R, Laera G (2004). "Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox". *Water Research*, **38**, 2103-2110.

Rivas FJ, Bentrán FJ, Gimeno O, Frades J (2001). "Treatment of olive oil mill wastewaters by Fenton's Reagent". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 1873-1880.

Robles A, Lucas R, Cienfuegos GA de, Gálvez A (2000). "Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds". *Bioresource Technology*, **74**, 217-221.



Rodis PS, Karathanos VT, Mantzavinou A (2002). "Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.

Rohlf FJ (1963). "Classification of *Aedes* by numerical taxonomic methods (Diptera: Culicidae)". *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **56**, 798-804.

Roig A, Cayuela ML, Sánchez-Monedero MA (2006). "An overview on olive mill wastes and their valorisation methods". *Waste Management*, **26**, 960-969.

Roncero AV, Durán RM, Constante EG (1974). "Componentes fenólicos de la aceituna. II. Polifenoles del alpechín". *Grasas y Aceites*, **25**(6), 341-345.

Rosa MF, Vieira AM (1995). "Perspectivas e limitações no tratamento e utilização das águas residuais de lagares de azeite: situação portuguesa". *Boletim de Biotecnologia*, nº **52**, 8-14.

Ruíz- Barba JL, Brenes-Balbuena M, Jiménez-Díaz R, García-García P, Garrido-Fernández A (1993). "Inhibition of *L. plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine". *Journal of Applied Bacteriology*, **74**, 15-19.

Ryan D, Robards K, Lavee S (1999). "Changes in phenolic content of olive during maturation". *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265-274.

Sabate J, Cano J, Esteves-Zaroso B, Guillamón JM (2002). "Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA". *Microbiological Research*, **157**, 267-274.

Saitta M, Salvo F, Di Bella G, Dugo G, La Torre GL (2009). "Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils". *Food Chemistry*, **112**, 525-532.

Saldanha MH (1999). "Benefícios do Azeite na Saúde Humana". Direcção-Geral do Desenvolvimento Rural. Lisboa. 34p.

Sampedro I, Aranda E, Martín J, Garcia-Garrido JM, Garcia-Romera I, Ocampo JA (2004a). "Saprobic fungi decrease plant toxicity caused by olive mill residues". *Applied Soil Ecology*, **26**, 149-156.

Sampedro I, Romero C, Ocampo JA, Brenes M, Garcia I (2004b). "Removal of monomeric phenols in dry mill olive residue by saprobic fungi". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4487-4492.

Sampedro I, D'Annibale A, Ocampo JA, Stazi SR, Garcia-Romera I (2007). "Solid-state cultures of *Fusarium oxysporium* transform aromatic components of olive-mill dry residue and reduce its toxicity". *Bioresource Technology*, **98**, 3547-3554.

Sánchez S, Olson B (2005). "Ecology and industrial microbiology. Microbial Diversity – the bright and promising future of microbial manufacturing". *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 229-233.

Santos VL, Linardi VR (2004). "Biodegradation of phenols by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential". *Process Biochemistry*, **39**, 1001-1006.

Sarika R, Kalogerakis N, Mantzavinos D (2005). "Treatment of olive mill effluents. Part II: Complete removal of solids by direct flocculation with polyelectrolytes". *Environment International*, **31** (2), 297-304.

Sassi AB, Boularbah A, Jaouad A, Walker G, Boussaid (2006). "A comparison of olive mill wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco". *Process Biochemistry*, **41**(1), 74-78.

Sassi AB, Ouazzani N, Walker GM, Ibsouda S, El Mzibri M, Boussaid A (2008). "Detoxification of olive mill wastewaters by Moroccan yeast isolates". *Biodegradation*, **19**, 337-346.

Sayadi S, Allouche N, Jaoua M, Aloui F (2000). "Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment". *Process Biochemistry*, **35**(7), 725-735.

Sayadi S, Ellouz R (1995). "Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolourization of olive mill wastewaters". *Applied and Environmental Microbiology* **61**(3), 1098-1103.

Scalbert A, Williamson G (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols". *Journal of Nutrition*, **130**, 2073S-2085S.

Scioli C, Vollaro L (1997). "The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters". *Water Research*, **31**(10), 2520-2524.

Senses-Ergul S, Ágoston R, Belák A, Déak T (2006). "Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular methods". *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 120-124.



Servili M, Montedoro GF (2002). "Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality". *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 602-613.

Shahidi F, Naczk M (1995). "Food Phenolics". Technomic Publishing Co., Lancaster, USA, 340 pp.

Sierra J, Martí E, Montserrat G, Cruañas R, Garau MA (2001). "Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal". *The Science of the Total Environment*, **279**, 207-214.

Silva CF, Schwan RF, Dias ES, Wheals AE (2000). "Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil". *International Journal of Food Microbiology*, **60**, 251-260.

Sneath PHA, Sokal RR. (1973). "Principles of Numerical Taxonomy". Freeman. San Francisco.

Stanchev V, Stoilova I, Krastanov A (2008). "Biodegradation dynamics of high catechol concentrations by *Aspergillus awamori*". *Journal of Hazardous Materials*, **154**, 396-402.

Stoilova I, Krastanov A, Yanakieva I, Kratchanova M, Yemendjiev H (2007). "Biodegradation of mixed phenolic compounds by *Aspergillus awamori* NRRL 3112". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **60**, 342-346.

Thanos M, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz H-J (1996). "Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR". *Journal of Clinical Microbiology*, **34** (3), 615-621.

Tomati U, Galli E, Fiorelli F, Pasetti L (1996). "Fertilizers from composting of olive-mill wastewaters". *International Biodeterioration and Biodegradation*, **38**, 155-162.

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". *Bioresource Technology*, **84**, 251-257.

Tsonis SP, Tsola VP, Grigoropoulos SG (1989). "Systematic characterization and chemical treatment of olive oil mill wastewater". *Toxicological and Environmental Chemistry*, **20-21**, 437-457.

Tsui MTK, Chu LM (2003). "Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors". *Chemosphere*, **52**, 1189–1197.

Tuck KL, Hayball PJ (2002). "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects". *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 636-644.

Ursinos JA, Ros de, Borja Padilla R (1992). "Use and treatment of OMW: current situation and prospects in Spain". *Grasas y Aceytes*. **43**(2), 101-106.

Vinciguerra V, D'Annibale A, Delle Monache G, Sermanni GG (1995). "Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*". *Bioresource Technology*, **51**, 221-226.

Visioli F, Galli C (1998). "Olive oil phenols and their potential effects on human health". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4292-4296.

Visioli F, Poli A, Gali C (2002). "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil". *Medical Research Reviews*, **22**(1), 65-75.

Visioli F, Romani A, Mulinacci N, Zarini S, Conte D, Vincieri FF, Galli C (1999). "Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3397-3401.

Vissers MN, Zock PL, Katan MB (2004). "Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review". *European Journal of Clinical Nutrition*, **58**, 955-965.

Vitolo S, Petarca L, Bresci B (1999). "Treatment of olive oil industry wastes". *Bioresource Technology*, **67**, 129-137.

Vlyssides AG, Loizides M, Karlis PK (2004). "Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products". *Journal of Cleaner Production*, **12**, 603-611.

Wallace DC (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse". *Science*, **283**, 1482-1488.

Wang CX, Yediler A, Lienert D, Wang ZJ, Kettrup A (2002). "Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *V. fischeri*". *Chemosphere*, **46** (2), 339–344.



Welsh J, McLelland M (1990). "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers". *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-7218.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535.

Wuczowski M, Prillinger H (2004). "Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen")". *Microbiological Research*, **159**, 263-275.

Yang D-P, Kong D-X, Zhang H-Y (2007). "Multiple pharmacological effects of olive oil phenols". *Food Chemistry*, **104**(3), 1269-1271.

Yesilada E, Ozmen M, Yesilada O (1999). "Studies on the toxic and genotoxic effect of olive oil mill wastewater". *Fresenius Environment Bulletin*, **8**, 732-739.

Zafra A, Juarez MJB, Blanc R, Navalón A, González J, Vilchez JL (2006). "Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography-mass spectrometry". *Talanta*, **70**(1), 213-218.

Zucconi FA, Pera MF, Bertoldi M (1981). "Evaluating toxicity of immature compost". *Biocycle*, **22**, 54-57.

Zurita JL, Repetto G, Jos A, del Peso A, Salguero M, Lopez-Artiguez M, Olano D, Camean A (2005). "Ecotoxicological evaluation of diethanolamine using a battery of microbiotests". *Toxicology In Vitro*, **19**, 879-886.

