



Redução de compostos fenólicos de resíduos de lagares de azeite utilizando culturas de *Coriolus versicolor*

A. Pereira¹, D. Antunes¹, A.T. Caldeira^{1,3}, J.R. Marques da Silva^{2,4}, J.M. Arreiro^{1,3}

¹ Departamento de Química da ECT da Universidade de Évora

² Departamento de Engenharia Rural da ECT da Universidade de Évora.

³ CQE, Centro de Química da ECT da Universidade de Évora

⁴ ICAAM, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas da Universidade de Évora.

Abstract

In this study, *C. versicolor* cultures were performed during 20 days with different RLA (olive mill wastes) subtracts, 50%, 75% and 100%. During this assay, samples were collected in regular time intervals, cell growth were evaluated and broth decolorization was observed. The organic matter and total phenolic compounds level in the culture broth showed a decrease in all RLA ratios. 50% and 75% RLA presented high total phenolic removal, 85% and 90% respectively. In the end of the assay, toxicological evaluation of the culture broth was performed against *Artemia salina*. These results showed a toxicological decrease of these residues after biological treatment with *C. Versicolor*.

Resumo

Foram efectuadas culturas de *C. versicolor*, durante de 20 dias, com diferentes razões de substratos, RLA (Resíduos de lagares de azeite) 50%, 75% e 100%. Recolheram-se amostras em intervalos de tempo regulares, avaliou-se o crescimento celular e observou-se uma clarificação do caldo de cultura, durante o período do ensaio. Os níveis de matéria orgânica e de fenóis totais no caldo de cultura ao longo do tratamento, diminuíram para as diferentes razões de RLA. As culturas com uma razão de 50% e 75% apresentaram os melhores índices de remoção de fenóis totais, 85% e 90% respectivamente. No final dos ensaios avaliou-se a toxicidade dos resíduos resultantes, utilizando um modelo de *Artemia salina* e comparou-se com a toxicidade inicial destes resíduos, ocorrendo uma clara diminuição da toxicidade dos RLA depois de sujeitos ao tratamento com *C. Versicolor*.

Palavras-Chave: Resíduos; Fenóis; CQO; *Coriolus_versicolor*; Biotratamento.

INTRODUÇÃO

Em Portugal, a oliveira é uma das culturas que maior superfície ocupa no território nacional, estando esta distribuída por todas as Regiões Agrárias do Continente, destacando-se o Alentejo com cerca de metade da produção nacional (INE, 2010).

A indústria de obtenção de azeite, com elevado interesse económico, está associada à produção de resíduos com elevado CQO que, aliada à presença de fenóis origina um problema ambiental de elevada dimensão. De facto, são águas residuais de difícil biodegradabilidade e

de elevado poder contaminante. São caracterizadas por elevadas cargas de CQO, contendo compostos fenólicos que inibem o crescimento microbiano. Apresentam, também, um elevado conteúdo orgânico, nomeadamente em lípidos (McNamara *et al.*, 2008).

A implementação de processos de centrifugação em duas fases (sem adição externa de água) para a extracção do azeite reduziu ainda assim substancialmente o consumo de água e o volume de resíduos que se produzem. No Alentejo entrou em funcionamento em 2001 uma grande unidade de secagem que processa parte dos bagaços húmidos produzidos na região, porém em grande parte dos lagares utilizam-se lagoas de armazenamento para as águas resultantes, bem como de alguns dos resíduos da limpeza da azeitona, sem que estes tenham hipótese de ser comercializados ou processados.

Os custos económicos associados ao problema ambiental não têm permitido encontrar soluções, daí que a aplicação da legislação ambiental tem sido por enquanto adiada e têm sido encorajados protocolos de investigação no sentido da valorização destes resíduos.

Diversos microrganismos especialmente fungos da classe dos Basidiomicetos têm sido utilizados na transformação de águas ruças (Afify *et al.*, 2009). O efluente resultante da degradação aeróbia utilizando culturas destes fungos apresenta uma carga de CQO inferior e, principalmente, um teor fenólico mais baixo (Aggelis *et al.*, 2003).

Neste trabalho pretende-se otimizar o processo de crescimento de *Coriolus Versicolor* em fermentação submersa, utilizando resíduos de uma lagoa de armazenamento de detritos de lagar de azeite (RLA). O lagar seleccionado para este estudo opera num sistema de duas fases e produz em simultâneo, azeitonas em conserva, pelo que os resíduos da lagoa também apresentam a água da salmoura.

MATERIAL E MÉTODOS

Resíduos de Lagares de Azeite (RLA)

Os Resíduos foram obtidos no Lagar de azeite Herdade de Castros em Campo Maior, distrito de Portalegre. Este Lagar funciona num sistema de duas fases, sendo que a água da conserva de azeitonas é incorporada aos resíduos, resultando com isto num aumento da salinidade. Após a recolha, os resíduos foram esterilizados em autoclave a 121°C. Sendo depois usados nas culturas *C.Versicolor*.

Preparação dos inóculos

As células de *C. Versicolor* foram conservadas a 4°C, em rampas com meio sólido contendo 4g/L de extracto de batata, 20 g/L de dextrose e 15 g/L de agar (PDA). Antes da utilização as células são repicadas para novas rampas de PDA e incubadas a 28°C, durante 7 dias.

Culturas Líquidas

C. Versicolor foi pré incubado em frascos agitados Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio de cultura contendo extracto de malte, glucose 20 g/L e peptona 2 g/L (MGP). O crescimento do *C. Versicolor* foi levado a cabo durante duas semanas a 150rpm e 28°C num agitador orbital (IKA®, KS 4000 i control). As culturas líquidas foram efectuadas em frascos

Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de diferentes razões entre os RLA e o meio de cultura MGP, 50% RLA, 75% RLA e 100% RLA esterilizadas a 121°C. Usaram-se 10 ml do inoculo descrito no ponto anterior. As culturas foram agitadas a 150rpm a uma temperatura constante de 28°C durante 20 dias, tendo sido recolhidas amostras periódicas durante esse período. O ensaio foi elaborado em triplicado.

Métodos Analíticos

Durante este ensaio foram analisados o conteúdo total em compostos fenólicos, a carência química de oxigénio (CQO) e a coloração do meio de cultura. O método de Folin–Ciocalteu adaptado de BOX(1984) foi utilizado na determinação de conteúdo total em fenóis. O CQO foi determinado utilizando o método descrito por Greenberg *et al.*(1992). As amostras foram recolhidas em ambiente estéril, centrifugadas durante 10 minutos a 3000 r.p.m. e o sobrenadante foi analisado utilizando os métodos enunciados. Posteriormente as amostras foram conservadas a -20°C.

Ensaio Toxicológicos

A toxicidade dos RLA foi testada utilizando o modelo de *Artemia salina* de acordo com ARTOXKIT (1990). Os RLA foram diluídos em água do mar sintética com a finalidade de perceber o efeito tóxico deste resíduo antes e após o tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento biológico dos RLA usando culturas de *C. Versicolor* foi conduzido utilizando 50% RLA, 75% RLA e 100% RLA, durante 20 dias.

No início do ensaio a cor do meio de cultura era castanho-escuro e tinha um cheiro intenso, característico.

As Fig 1 e 2 mostram alguns pormenores das culturas efectuadas com 50% e 75% de RLA passados 4 e 20 dias, respectivamente. Pode observar-se um aumento da biomassa fúngica e simultaneamente uma clarificação do meio de cultura.

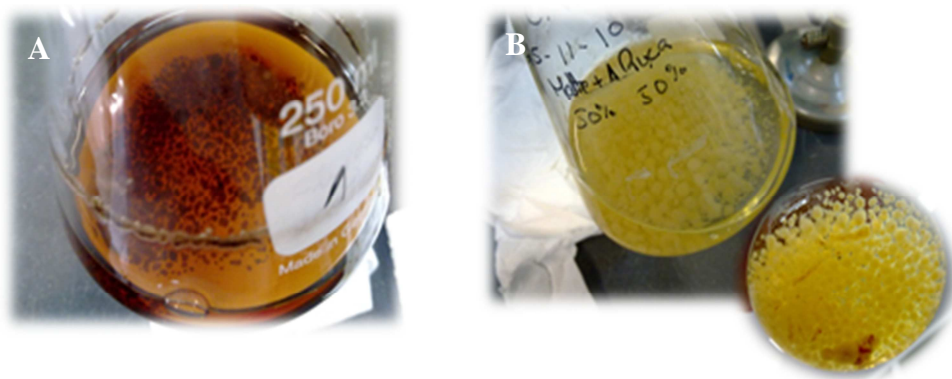


Figura 1: Aspecto das culturas efectuadas com 50% de RLA passados 4 dias (A) e no final do ensaio (B).

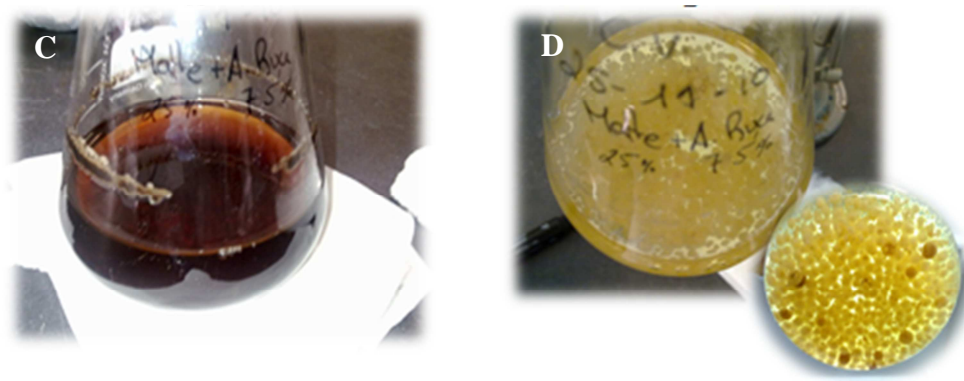


Figura 2: Aspecto das culturas efectuadas com 75% de RLA passados 4 dias (C) e no final do ensaio (D).

Sabe-se que os RLA contêm todos os elementos essenciais para o crescimento microbiano (minerais, hidrogénio e fontes de carbono), mas também vários inibidores de crescimentos, tais como ácidos orgânicos e compostos fenólicos. A sua composição depende da maturidade e variedade da azeitona que vai originar o resíduo, e ainda da tecnologia empregada na extracção do óleo usado (Festas De RosUrsinos e Borja-Padilla, 1992).

Os resultados mostraram que *C. Versicolor* tem capacidade de utilizar estes resíduos como fonte de carbono e energia, em culturas líquidas, até 75% de RLA, conduzindo a densidades celulares elevadas nas culturas.

Variacção do Conteúdo Fenólico nas culturas

Determinou-se o conteúdo em fenóis totais durante 20 dias de cultura. As Fig. 3 e 4 representam a percentagem da redução total de fenóis durante os ensaios, usando 50% e 75% de RLA, respectivamente. Pode observar-se que existiu uma redução no conteúdo de fenóis totais para as razões de 50% e 75% de RLA (Fig. 3 e 4).

Nos caldos de cultura onde se utilizou RLA com a razão de 100%, sem adição de meio nutritivo, obtiveram-se reduções de fenóis totais em cerca de 50%, abaixo das reduções observadas para as outras razões. Dado que não foi efectuada diluição do RLA, a toxicidade apresentada poderá ter condicionado o crescimento do *C. Versicolor*, daí, o fraco crescimento do microrganismo em relação às outras culturas. Observou-se assim um menor crescimento biológico, resultando numa pouca clarificação do caldo de cultura.

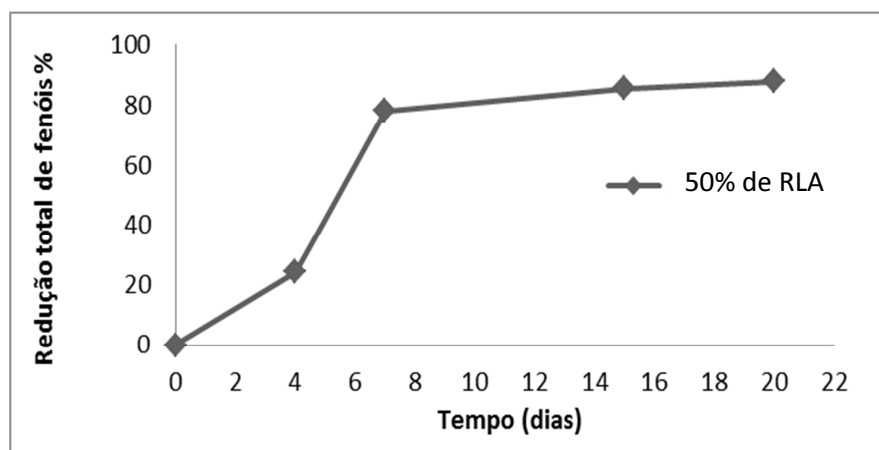


Figura 3: Percentagem da redução total de fenóis durante 20 dias, usando 50% RLA.

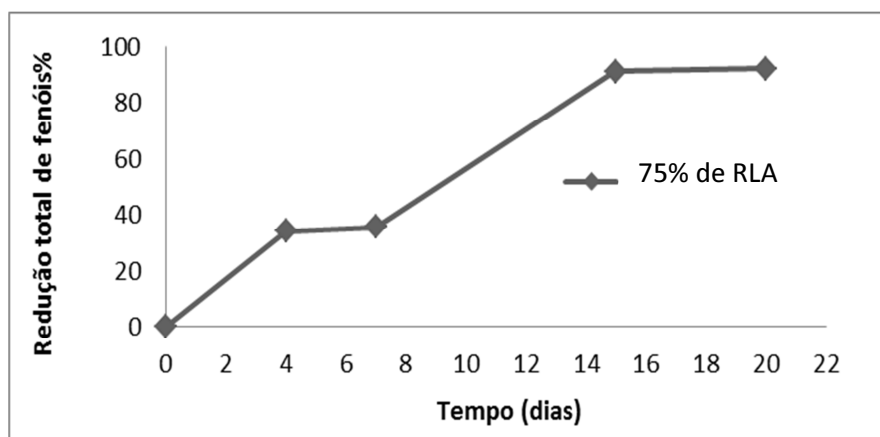


Figura 4: Percentagem da redução total de fenóis durante 20 dias, usando 75% RLA.

A Fig 3 mostra que após 7 dias de cultura, para a razão de 50% RLA, a remoção de fenóis já era de aproximadamente 80%, ou seja, cerca de 94% da remoção atingida no final do ensaio, o que sugere que poderá não ser necessário o prolongamento do tempo de cultura nestas condições.

Contudo, para uma razão de 75% de RLA, ao fim de 7 dias a remoção de fenóis foi de aproximadamente 40%, metade da remoção observada para a razão de 50%, e só após mais algum tempo, cerca do 14º dia de cultura a remoção atinge um nível de 90%.

A partir dos 14 dias a cultura efectuada com 75% RLA mostrou um perfil de percentagem de redução de fenóis totais equivalente ao da cultura efectuada com 50% RLA (Fig 3 e 4) e, de facto, ambas as culturas (razões 50% e 75% de RLA) foram eficientes na remoção de compostos fenólicos, com percentagem de remoção de 85% e 90% respectivamente.

Medição da Carência Química de Oxigénio (CQO)

O valor da Carência química de Oxigénio (CQO) é um parâmetro que mede indirectamente a quantidade de matéria orgânica susceptível de ser oxidada por meios químicos que existam numa amostra líquida. No sobrenadante das culturas de 50% e 75%, obteve-se uma redução do valor de CQO de 55% e 60% respectivamente (Fig.5). O que nos indica uma diminuição da matéria orgânica nos RLA depois de sujeitas ao tratamento biológico com *C. versicolor*.

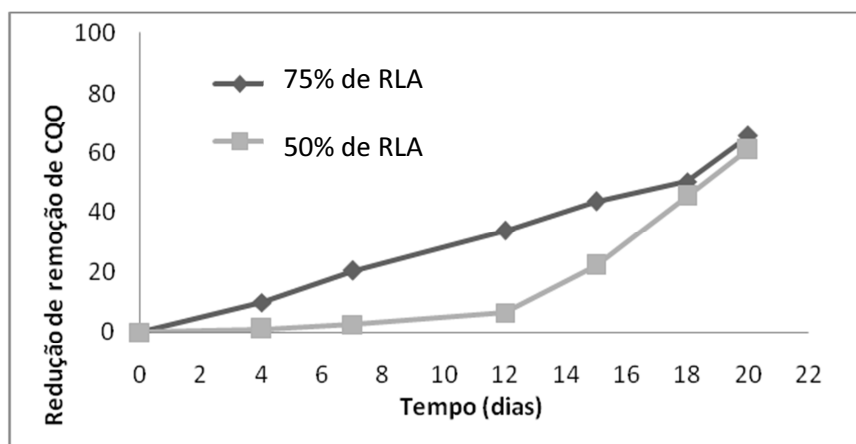


Figura 5: Percentagem da redução total de CQO durante 20 dia, usando 75% e 50% de RLA.

No caso específico do caldo de cultura com uma razão de 50%, só após o 12º dia a remoção de matéria orgânica passou a ser mais efectiva, tendo desde então uma grande remoção até ao final do tratamento. No caso do caldo de cultura com uma razão de 75% a remoção foi mais uniforme, tendo um crescimento contínuo até ao final do tratamento. Pode ainda observar-se uma maior redução dos níveis de CQO na cultura de 75% nos primeiros dias comparativamente com a cultura de 50%, sendo que no final as percentagens de remoção foram as duas cerca de 60%.

Toxicidade

A toxicidade dos RLA foi testada utilizando o modelo de *Artemia salina* descrito anteriormente. Testaram-se os meios de cultura e os sobrenadantes correspondentes às culturas de 20 dias, para cada uma das % de RLA utilizadas.

A Fig 6 mostra a percentagem da Mortalidade de *Artemia salina* na presença dos meios de cultura com RLA a 50% (não tratado) e na presença do sobrenadante das culturas, após 20 dias de crescimento (tratado). Pode observar-se que tanto os RLA tratados como os não tratados apresentaram uma % de mortalidade elevada quando não diluídos. Para os RLA não tratados, até uma diluição de 60% continua a observar-se % de mortalidade de 100%. Para os RLA tratados (sobrenadante das culturas de 20 dias) a uma diluição de 60% corresponde uma % de mortalidade inferior a 1%, mostrando que estes extractos não apresentam toxicidade para *A.salina*, nestas condições de ensaio

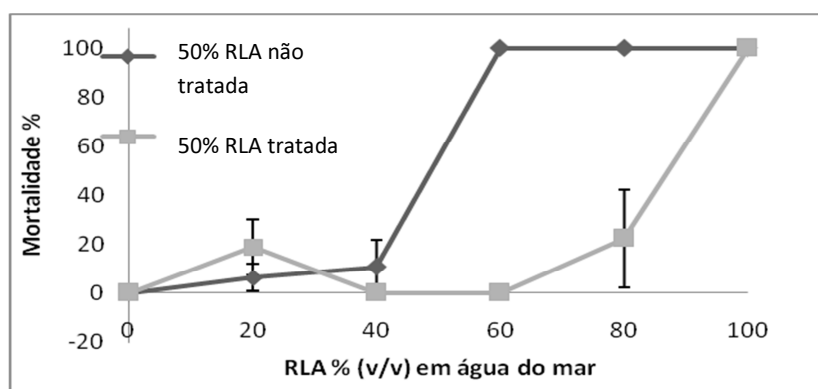


Figura 6: Percentagem da Mortalidade de *Artemia salina* nos RLA a 50% (tratado e não tratado).

A Fig. 7 mostra a percentagem de Mortalidade de *Artemia salina* na presença dos meios de cultura com RLA a 75%. Estes ensaios mostraram uma maior toxicidade do caldo de cultura, comparativamente aos de 50%. Quando usados os RLA, tratados e não tratados, sem diluição ou com uma diluição de 80%, a % de mortalidade de *A. salina* foi 100%. Para os RLA sem tratamento, este valor de mortalidade manteve-se até uma diluição de 40%, decrescendo para perto de 50% de mortalidade quando a diluição correspondeu a 20% de amostra. Os RLA tratados e diluídos a 60% apresentaram uma toxicidade de 20%, decrescendo depois gradualmente com as diluições.

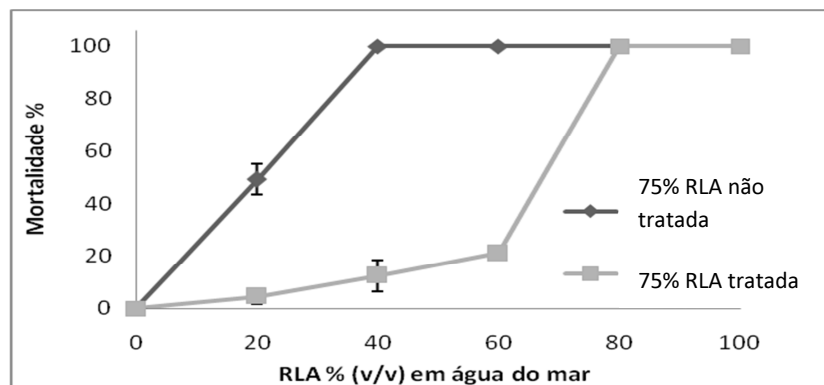


Figura 7: Percentagem da Mortalidade de *Artemia salina* nos RLA a 75% tratado e não tratado.

CONCLUSÕES

C. Versicolor apresentou a capacidade de crescer em RLA, reduzindo o conteúdo em fenóis totais para aproximadamente 85% do seu valor inicial. As culturas de *C. Versicolor* apresentaram ainda capacidade de diminuir o CQO dos caldos de cultura, evidenciando uma diminuição da matéria orgânica presente nestes resíduos.

As reduções de toxicidade foram verificadas num modelo de *Artemia salina*. No caso dos RLA não tratados a % de mortalidade foi sempre superior aos tratados. Este trabalho abre novas perspectivas para uma valorização destes resíduos a nível biológico.

BIBLIOGRAFIA

- Afify, A. S., Mahmoud, M. A., Emara, H. A. & Abdelkreem, K. I. (2009). Phenolic Compounds and COD Removal from Olive Mill Wastewater by Chemical and Biological Procedures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2): 1087-1095.
- Artoxkit, M. (1990). *Artemia Toxicity Screening Test for Estuarine and Marine Waters In Standard operational procedure* Belgium: University of Ghent.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. & Eaton, A. D. (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Aggelis, G., Iconomoub, D., Christouc, M., Bokasa, D., Kotzailiasa, S., Christoua, G., Tsagoua, V. & Papanikolaoua, S. (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(16): 3897-3904.
- FAOSTAT: Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistics Division, 2011. ProdSTAT: crops: olive (1 Setrmbro 2011)—based on 2008 data, online at: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>
- McNamara, C., Anastasiou, C., Oflaherty, V. & Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 127-134.

- BOX, J. (1984). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* 18(12): 1597-1599.
- Zervakis, G., Yiatras, P. & Balis, C. (1996). Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38(3-4): 237-243.
- Olivieri, G., Marzocchella, A., Salatino, P., Giardina, P., Cennamo, G. & Sanna, G. (2006). Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Engineering Journal* 31(3): 180-187.
- Jaouani & A. (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology* 33(6): 802-809.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Vinciguerra, V. & Sermanni, G. G. (1998). The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. *J Biotechnol* 61(3): 209-218.