



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Biodegradação Anaeróbia de Compostos Derivados de Lignina e Xenobióticos

Dalila Esteves Daniel

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Isolina Gonçalves

Covilhã, Outubro de 2014

Resumo

Os resíduos gerados no setor agroindustrial apresentam um grande impacto ambiental, nomeadamente os de natureza lignocelulósica (carboidratos complexos) e halogenada. Estes compostos originam produtos fenólicos tóxicos ameaçando o equilíbrio dos ecossistemas.

A aplicação da digestão anaeróbia como processo biotecnológico de degradação de compostos fenólicos derivados de lignina, assim como de compostos de natureza halogenada, constitui um método alternativo particularmente atraente para o tratamento de efluentes agroindustriais, uma vez que assegura a redução da poluição garantindo, ao mesmo tempo, a conservação ambiental.

No presente trabalho efetuou-se o estudo da biodegradação anaeróbia, em descontínuo, dos compostos fenólicos derivados de lignina, como a vanilina e a ortovanilina, assim como o 4-clorofenol, em regime mesófilo e termófilo, com o intuito de compreender os fatores que influenciam os sistemas biológicos de degradação destes compostos e assim viabilizar a sua aplicação futura no tratamento de efluentes e resíduos agroindustriais garantindo a sustentabilidade ambiental.

Os resultados obtidos indicam que é possível seguir a degradação destes compostos por medição da absorvência a um determinado comprimento de onda. A adição de cosubstratos favorecem a degradação da ortovanilina, mas não afetam a degradação da vanilina. A vanilina é facilmente metabolizável pelas populações anaeróbias mistas, em particular em regime mesófilo, apresentando uma taxa de remoção de CQO de $75\% \pm 3$ no final de 7 dias. A ortovanilina, apesar de apresentar uma bioeliminação mais favorável em regime mesófilo, tem taxas de remoção de CQO mais baixas (82% ao fim de 52 dias) do que as obtidas para a vanilina para igual tempo de reação.

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos (k) de degradação da CQO e da diminuição da absorvência a 280 nm sugerem claramente uma velocidade mais elevada em regime mesófilo para os dois compostos. Os valores dos parâmetros cinéticos em regime mesófilo foram significativamente mais elevados para a vanilina ($k_m = 0,214 \text{ d}^{-1}$ e $K_{am} = 0,016 \text{ d}^{-1}$) do que para a ortovanilina ($k_m = 0,028 \text{ d}^{-1}$ e $K_{am} = 0,036 \text{ d}^{-1}$), corroborando o aumento da recalcitrância dos compostos por deslocação do grupo substituinte OH da posição *para* a posição *orto* no anel aromático.

Palavras-chave

Biodegradação Anaeróbia, Compostos Fenólicos, Compostos Halogenados

Abstract

The increase in the production of agro residues generate severe environmental impacts originated by the presence of lignocellulosic (complex carbohydrates) and halogenated compounds. These phenolic compounds generate toxic products threatening the equilibrium of ecosystems.

The application of anaerobic digestion as a biotechnological process of degradation of lignin derived phenolic compounds, as well as halogen compounds, is a particularly attractive for the treatment of agro-industrial effluents alternative method, since it ensures the reduction of pollution ensuring at the same time, protection of ecosystems.

Thus, in the present work the anaerobic biodegradation of lignin derived phenolic compounds, such as vanillin and orthovanillin, as well as 4-chlorophenol in mesophilic and thermophilic regime was carried out in batch mode. To understand the main factors that influence the degradation process is of utmost importance, hence the future application of this information to the treatment of agro industrial residues ensures the environmental sustainability.

The results obtained show that is possible to study the degradation process by measuring the absorbance in the ultraviolet region at a characteristic wavelength of the aromatic compounds. Vanillin is an easily metabolized compound particularly under mesophilic regime, although ortovanillin has hardly undergone biodegradation. In mesophilic regime the COD removal rate for vanillin was on average of $75 \pm 3\%$ (within a period of 7 days), however for reaching a similar COD removal rate ortovanillin required a much longer period of time (almost 52 day). Also, the addition of co-substrates do not seem to alter the degradation rate of vanillin, although for ortovanillin a slight increase of the degradation rate has been observed.

The values of kinetic parameters calculated for the COD removal rate (k_m) and the rate at which the absorbance decrease at 280nm (ka_m) clearly suggest a higher removal rate in mesophilic conditions. Under mesophilic regime the values of k_m ($0,214 \text{ d}^{-1}$) and ka_m ($0,486 \text{ d}^{-1}$) for vanillin were in general an order of magnitude higher than those obtained for the degradation of orthovanillin (k_m of $0,028 \text{ d}^{-1}$ and ka_m of $0,036 \text{ d}^{-1}$), corroborating the idea that the recalcitrance level increases as the functional group hydroxyl changes from the *para* to the *ortho* position in the aromatic ring.

Keywords

Anaerobic Biodegradation, Phenolic Compounds, Halogenated Compounds

Índice

	Página
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Objetivo	3
1.2. Estrutura da Dissertação	4
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1. Constituição dos Compostos Lignocelulósicos	5
2.2. Digestão Anaeróbia de Compostos Lignocelulósicos	9
2.2.1. Digestão Anaeróbia	9
2.2.2. Degradação de Compostos Lignocelulósicos	12
2.3. Compostos Fenólicos Derivados de Lignina	15
2.4. Degradação de Clorofenóis	18
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	21
3.1. Meio de Cultura	21
3.2. Substratos Utilizados nos Ensaio de Biodegradação Anaeróbia	22
3.2.1. Vanilina	22
3.2.2. Ortovanilina	23
3.2.3. 4-Clorofenol	24
3.3. Inóculo	25
3.4. Parâmetros Analisados	25
3.4.1. Absorvência	25
3.4.2. Biogás	25
3.4.3. Carência Química de Oxigênio	25
3.4.4. pH	26

3.4.5. Sólidos	26
3.6. Metodologia Experimental	26
3.6.1. Preparação do Inóculo	26
3.6.2. Biodegradação Anaeróbia em Regime Mesófilo	27
3.6.2.1. Estudo da Solução de Ortovanilina	28
3.6.3. Biodegradação Anaeróbia em Regime Termófilo	28
3.6.3.1. Ensaio Abióticos	30
3.6.4. Tratamento das Amostras	31
Capítulo 4 - Análise de Resultados e Discussão	32
4.1. Biodegradação Anaeróbia em Regime Mesófilo	32
4.1.1. Biodegradação da Vanilina	32
4.1.1.1. Caracterização da Biomassa	32
4.1.1.2. Ensaio de Biodegradação	33
4.1.2. Biodegradação da Ortovanilina	38
4.1.2.1. Caracterização da Biomassa	38
4.1.2.2. Ensaio de Biodegradação	38
4.1.2.3. Estudo da Solução de Ortovanilina	44
4.2. Biodegradação Anaeróbia em Regime Termófilo	45
4.2.1. Biodegradação da Vanilina	45
4.2.1.1. Caracterização da Biomassa	45
4.2.1.2. Ensaio de Biodegradação	45
4.2.1.3. Ensaio Abióticos	53
4.2.2. Biodegradação da Ortovanilina	53
4.2.2.1. Caracterização da Biomassa	53
4.2.2.2. Ensaio de Biodegradação	54
4.2.2.3. Ensaio Abióticos	61

4.2.3. Biodegradação do 4-Clorofenol	62
4.2.3.1. Caracterização da Biomassa	62
4.2.3.2. Biodegradação do 4-Clorofenol	62
4.2.3.3. Ensaio Abióticos	65
4.2.4. Estudo Preliminar da Cinética de Degradação da Vanilina e Ortovanilina	66
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras	72
Bibliografia	75
Cibergrafia	78

Lista de Figuras

Figura 1 - Peso das diferentes fontes de energia elétrica em Portugal Continental (valores acumulados até Julho 2014) (Adaptado de <http://www.apren.pt/pt/>, Associação Portuguesa das Energias Renováveis, 2014).

Figura 2 - a) Representação esquemática da cadeia de celulose (Chandra *et al*, 2012). b) Dímeros estruturais da celulose (Collard e Blin, 2014).

Figura 3 - Esquema das ligações de hidrogénio (a tracejado) que se estabelecem entre as cadeias de celulose formando estruturas complexas (Adaptado de Campos, 1998).

Figura 4 - a) Estrutura parcial do xilano que constitui a hemicelulose. b) Estrutura parcial da B - glucomanose que constitui a hemicelulose (Xyl - xilopiranoose; 4-OmG - 4-O-ácido metilglucorónico; Man - manopiranoose; Glu - glucopiranoose; Gal - Galactose; Ac - Acetil) (Adaptado de Collard e Blin, 2014).

Figura 5 - a) Estrutura geral dos monómeros de lignina e b) respetivos monómeros (Adaptado de Collard e Blin, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática das ligações básicas da lignina (Kang *et al*, 2013).

Figura 7 - Representação esquemática de uma cadeia de lignina e respetivas ligações químicas (Carvalho *et al*, 2009).

Figura 8 - Constituição da matriz lignocelulósica com a respetiva organização dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina e sua hidrólise por pré-tratamento (Chandra *et al*, 2012).

Figura 9 - Esquema global da formação de derivados lignocelulósicos após o pré-tratamento térmico, termo-químico e físico da biomassa lignocelulósica (Monlau *et al*, 2014).

Figura 10 - a) Esquema das diversas etapas da digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica utilizando culturas microbianas mistas (adaptado de Lima N. e Mota M., 2003; Monlau F. *et al*, 2014). b) Conversão da matéria orgânica ao longo do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Chandra *et al*, 2012).

Figura 11 - Esquemática das duas vias de biodegradação do fenol na metanogénese: via caproato ou via 4-hidroxibenzoato. Enzimas envolvidas na transformação do fenol: 1. Fenol carboxilase/4-hidroxibenzoato descarboxilase; 2. 4-hidroxibenzoato-CoA ligase; 3. 4-hidroxibenzoato-CoA redutase (Leven *et al*, 2012).

Figura 12 - Representação do 4-clorofenol (Nordin, 2004).

Figura 13 - Estrutura química da vanilina (Walton *et al*, 2003).

Figura 14 - Estrutura química da ortovanilina (Barik *et al*, 2003).

Figura 15 - Estrutura química do 4-clorofenol (Nordin, 2004).

Figura 16 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado no tratamento das amostras recolhidas ao longo dos ensaios.

Figura 17 - a) Análise comparativa da evolução da CQO média dos ensaios de biodegradação da vanilina ao longo do tempo (dias), em regime mesófilo. b) Evolução comparativa do pH nos ensaios de biodegradação da vanilina.

Figura 18 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da vanilina em regime mesófilo: a) 1 VMB b) 2 VMB c) 3 VMB d) 4 VMB e) CONTROLO (glucose e acetato de sódio) e BRANCO f) 4 VMB e BRANCO.

Figura 19 - Evolução da CQO média e absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm ao longo do tempo (dias) nos ensaios de biodegradação anaeróbia da vanilina em regime mesófilo: a) 1 VMB b) 2 VMB c) 3 VMB d) 4 VMB.

Figura 20 - a) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da ortovanilina em regime mesófilo. b) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios de biodegradação da ortovanilina.

Figura 21 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime mesófilo: a) 1 OVMB b) 2 OVMB c) 3 OVMB d) 4 OVMB e) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO f) 4 OVMB e BRANCO.

Figura 22 - Evolução da CQO média e absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm ao longo do tempo (dias) nos ensaios de biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime mesófilo: a) 1 OVMB b) 2 OVMB c) 3 OVMB d) 4 OVMB.

Figura 23 - a) Evolução da absorvência da solução de ortovanilina em mesófilo. b) Ensaio 4 OVMB. c) Evolução da CQO da solução de ortovanilina e do ensaio biótico 4 OVMB.

Figura 24 - a₁) e a₂) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da vanilina em regime termófilo no banho e agitador orbital respetivamente. b₁) e b₂) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios de biodegradação da vanilina no banho e agitador orbital respetivamente.

Figura 25 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da vanilina em regime termófilo no banho: a₁) 1 VTB; b₁) 2 VTB; c₁) 3 VTB; d₁) 4 VTB; e₁) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; f₁) 4 VTB e BRANCO e no agitador orbital: a₂) 1 VTO; b₂) 2 VTO; c₂) 3 VTO; d₂) 4 VTO; e₂) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; f₂) 4 VTO e BRANCO.

Figura 26 - Evolução da CQO e da absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm, ao longo do tempo, para os ensaios de biodegradação da vanilina em termófilo no banho:

a₁) 1 VTB b₁) 2 VTB c₁) 3 VTB d₁) 4 VTB e no agitador orbital: a₂) 1 VTB b₂) 2 VTB c₂) 3 VTB d₂) 4 VTB.

Figura 27 - a) Evolução da CQO para o ensaio abiótico da vanilina comparativamente com a CQO média do ensaio 4 VTO em regime termófilo. b) Absorvência do ensaio abiótico com vanilina e biomassa autoclavadas comparativamente ao espectro obtido no final do ensaio 4 VTO.

Figura 28 - a₁) e a₂) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da ortovanilina em regime termófilo no banho e agitador orbital respetivamente. b₁) e b₂) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios no banho e agitador orbital respetivamente.

Figura 29 - Evolução comparativa da CQO média dos ensaios da biodegradação da ortovanilina em termófilo: a) 4 OVTB e 4 OVTO; b) 5 (OV+V) TO e 4 OVTB.

Figura 30 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os ensaios da biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime termófilo no agitador orbital: a) 1 OVTO; b) 2 OVTO; c) 3 OVTO; d) 5 (OV+V) TO; e) 4 OVTO; g) CONTROLO (Vanilina) e BRANCO; i) 4 OVTO e BRANCO; e banho: f) OVTB; h) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; j) 4 OVTB e BRANCO.

Figura 31 -Evolução da CQO média e da absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm para os ensaios da ortovanilina em termófilo.

Figura 32 - a₁) Evolução da CQO média do ensaio abiótico da ortovanilina e do ensaio 4 OVTO. a₂) Evolução da CQO do ensaio com a solução de ortovanilina e sua comparação com ensaio 4 OVTO. b₁) Evolução da absorvência do ensaio abiótico da ortovanilina e da última amostra do ensaio biótico 4 OVTO. b₂) Evolução da absorvência para a solução de ortovanilina comparativamente com a última amostra do ensaio biótico 4 OVTO.

Figura 33 - a) Evolução da CQO média ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação do 4-clorofenol em termófilo no agitador orbital. b) Evolução média do pH dos ensaios.

Figura 34 - Evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os ensaios da biodegradação anaeróbia do 4-clorofenol em regime termófilo no agitador orbital: a) CFT. b) CONTROLO e BRANCO. c) CFT, BRANCO e CONTROLO.

Figura 35 - Evolução média da CQO e absorvência para os comprimentos de onda de 223 nm, 266 nm, 280 nm e 380 nm ao longo do tempo (dias) no ensaio de biodegradação do 4-clorofenol em regime termófilo no agitador orbital.

Figura 36 - a) Evolução da CQO média do ensaio abiótico. b) Evolução do espectro do 4 - clorofenol (500 mg/L) obtido no ensaio abiótico.

Figura 37 - Modelação da influência do teor de co-substratos na biodegradação da vanilina (CQO) em mesófilo e termófilo nos ensaios: a) 1VMB e 1VTB. b) 2VMB e 2VTB. c) 3VMB e 3VTB. d) 4VMB e 4VTB.

Figura 38 - Modelação da influência do teor de co-substratos na biodegradação da vanilina (Abs 280 nm) em mesófilo e termófilo nos ensaios : a) 1VMB e 1VTB. b) 2VMB e 2VTB. c) 3VMB e 3VTB. d) 4VMB e 4VTB.

Figura 39 - a) Modelação da CQO do controlo (acetato de sódio + glucose) e b) evolução das absorvências (Abs 280nm) dos ensaios com vanilina em mesófilo e termófilo.

Figura 40 - Modelação da bioeliminação da ortoalinalina (CQO) em mesófilo e termófilo: a) 1OVMB e 1OVTO. b) 2OVMB e 2OVTO. c) 3OVMB e 3OVTO. e d) 4OVMB e 4OVTO.

Figura 41 - Modelação da bioeliminação da ortoalinalina (Abs) em mesófilo e termófilo: a) 1OVMB e 1OVTO. b) 2OVMB e 2OVTO. c) 3OVMB e 3OVTO. d) 4OVMB e 4OVTO.

Figura 42 - a) Modelação da CQO do ensaio termófilo com mistura (50% v/v) de vanilina e ortovanilina (5(OV+V)TO). b) Modelação da absorvência para o ensaio 5(OV+V)TO.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Poluentes em Rios Após Descarga de Efluentes Residuais e AgroIndustriais Líquidos Não Tratados (Adaptado de Lima e Mota, 2003)

Tabela 2 - Comparação das emissões gasosas de diversos combustíveis utilizados em veículos pesados de passageiros (autocarros) (Adaptado de Chandra *et al*, 2012)

Tabela 3 - Tipos de bactérias metanogénicas e respetivos substratos (Adaptado de Chandra *et al*, 2012)

Tabela 4 - Algumas Populações Metanogénicas Recolhidas em Reatores Para Tratamento de Fenóis (Adaptado de Leven *et al*, 2012)

Tabela 5 - Composição do Meio de Cultura Utilizado Para o Desenvolvimento da Biomassa Anaeróbia Mista (adaptado de Wiegant e Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Tabela 6 - Composição da Solução de Micronutrientes (adaptado de Wiegant e Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Tabela 7 - Ensaio Com a Vanilina no Banho

Tabela 8 - Ensaio Com a Ortovanilina no Banho

Tabela 9 - Ensaio Com a Vanilina no Banho

Tabela 10 - Ensaio Com a Vanilina no Agitador Orbital

Tabela 11 - Ensaio Com a Ortovanilina no Agitador Orbital

Tabela 12 - Ensaio Com a Ortovanilina no Banho

Tabela 13 - Ensaio Com o 4-clorofenol no Agitador Orbital

Tabela 14 - Ensaio Realizados

Tabela 15 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Tabela 16 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais de CQO

Tabela 17 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Tabela 18 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais de CQO

Tabela 19 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Tabela 20 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais da CQO

Tabela 21 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Tabela 22 - Valores Médios e Desvios Padrão Iniciais e Finais de CQO

Tabela 23 - Concentração Média e Desvio Padrão de Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Tabela 24 - Valores Médios e Desvios Padrão Iniciais e Finais de CQO

Tabela 25 - Parâmetros Cinéticos Obtidos na Análise Cinética da Biodegradação da Vanilina

Tabela 26 - Parâmetros Cinéticos Obtidos na Análise Cinética da Bioeliminação da Ortovanilina

Lista de Acrónimos

CFT	4-Clorofenol
CQO	Carência Química de Oxigênio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
SS	Sólidos Suspensos
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
UV	Ultra-violeta
Van	Vanilina
OVan	Ortovanilina

Capítulo 1 - Introdução

Atualmente o aumento das atividades humanas para satisfazer as exigências da sociedade de consumo contemporânea têm vindo a aumentar a pressão poluente sobre os solos e recursos hídricos. O aumento populacional dos centros urbanos e o aumento das atividades agrícolas e industriais teve como consequência o aumento da produção de efluentes residuais e agroindustriais que, pela sua elevada carga orgânica e inorgânica de natureza diversa, constituem um grave problema ambiental, causando a poluição dos solos, das águas superficiais e subterrâneas e ambientes marinhos, afetando o equilíbrio dos ecossistemas. Na Tabela 1 encontram-se alguns poluentes encontrados em rios após descargas de efluentes residuais e agroindustriais não tratados:

Tabela 1 - Poluentes em Rios Após Descarga de Efluentes Residuais e Agroindustriais Líquidos Não Tratados (Adaptado de Lima e Mota, 2003)

Categorias de Poluentes
Ácidos
Amoníaco
Aniões (Sulfatos, Sulfuretos, Cianetos, Nitratos, Fosfatos)
Compostos Clorados, Clorofenóis
Metais (Cádmio, zinco, chumbo, crómio)
Óleos e gorduras
Resíduos Orgânicos Tóxicos (fenóis e formaldeídos)

Muitas das tecnologias tradicionalmente utilizadas no tratamento de resíduos tóxicos são processos físico-químicos, que além de apresentarem elevados custos de aplicação, podem conduzir à formação de novos produtos igualmente tóxicos.

A digestão anaeróbia constitui um processo de tratamento biológico que envolve a degradação e estabilização de materiais orgânicos sob condições anaeróbias por populações microbianas (Chen *et al*, 2008). A grande capacidade demonstrada pela digestão anaeróbia para eliminar vários poluentes orgânicos, nomeadamente compostos halogenados e aromáticos torna este processo particularmente atraente para o tratamento dos efluentes residuais e agroindustriais, uma vez que constitui um método que assegura a redução da poluição, e ao mesmo tempo, a proteção ambiental. Ainda que este processo seja eficientemente aplicado no tratamento de efluentes residuais tem tido uma aplicação limitada no tratamento de resíduos agroindustriais (Lima e Mota, 2003).

Os resíduos agrícolas incluem as porções não comestíveis de culturas agrícolas (como por exemplo: as folhas, talos, espigas do milho, bagaço da cana de açúcar e azeitona, cascas do arroz), resíduos herbáceos e lenhosos urbanos (provenientes de limpezas de jardins

municipais e domésticos) e resíduos florestais de natureza lignocelulósica (carboidratos complexos) (Chandra *et al*, 2012), cujos derivados originam compostos fenólicos tóxicos para muitos microorganismos (Veeresh *et al*, 2005). Uma elevada quantidade de resíduos provenientes de culturas agrícolas e florestais são produzidos anualmente no mundo apresentando um impacto ambiental significativo (Chandra *et al*, 2012).

Também os clorofenóis, amplamente utilizados na produção de herbicidas, fungicidas, inseticidas, fármacos e corantes, são libertados para o meio ambiente através dos efluentes industriais, assim como pela atividade agrícola através da aplicação de herbicidas, fungicidas e inseticidas. Este facto constitui um elevado risco para os ecossistemas, devido à sua elevada toxicidade e persistência tendo sido classificados como poluentes prioritários pela Comissão Europeia (European Decision 2455/2001/EC) (Munoz *et al*, 2013).

Com efeito, a investigação da biodegradação anaeróbia dos compostos fenólicos derivados da lignina e dos clorofenóis apresenta grande relevância para o conhecimento dos fatores e mecanismos que regulam o funcionamento dos sistemas microbianos de degradação destes compostos, e assim a sua aplicação no tratamento de efluentes e resíduos agroindustriais possibilitando a proteção da biosfera.

Além disso, a biomassa lignocelulósica e efluentes ricos em compostos orgânicos constituem uma fonte de energia primária e renovável, devido à sua natureza hidrocarbonada e abundância na Terra, podendo vir assim a constituir a segunda geração de combustíveis. Estes podem contribuir para a diminuição do consumo de combustíveis fósseis e minimização da libertação de dióxido de carbono para a atmosfera terrestre, prevenindo o aquecimento global, assim como reduzir a dependência da economia global dos combustíveis fósseis e da produção de dióxido de carbono.

A bioenergia contribui atualmente com 10 -15 % da energia total mundial. Muitos países estabeleceram metas/objetivos para a utilização de combustíveis produzidos a partir da biomassa. Muitos investigadores sugerem que em 2050, 10 - 50 % do mercado energético mundial terá origem em biomassa (Chandra *et al*, 2012).

Em Portugal 34,3% da energia elétrica consumida atualmente tem origem em fontes renováveis (PRE Renovável), sendo 5,3 % correspondentes à biomassa (Figura 1).

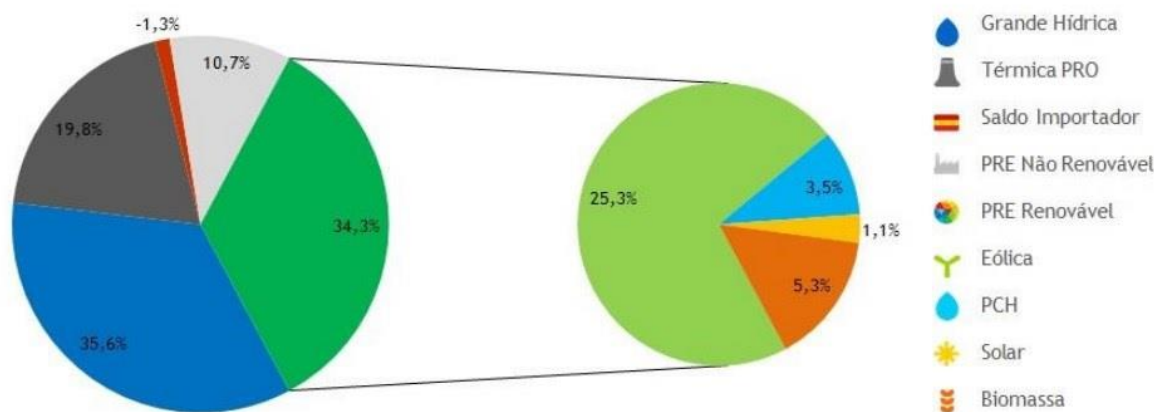


Figura 1 - Peso das diferentes fontes de energia elétrica em Portugal Continental (valores acumulados até Julho 2014) (Adaptado de <http://www.apren.pt/pt/>, Associação Portuguesa das Energias Renováveis, 2014).

Na Resolução do Conselho de Ministros n.º 29/2010 de 15 de Abril foi estabelecida a Estratégia Nacional Para a Energia (ENE 2020), que consiste num plano no qual foram definidos objetivos, do ponto de vista energético, que Portugal tem de atingir até 2020, de forma a garantir o crescimento e independência energética do país, através da aposta nas energias renováveis e da promoção integrada da eficiência energética, garantindo a segurança de abastecimento e a sustentabilidade económica e ambiental da sua utilização. Assim, de acordo com esta Estratégia Nacional Para a Energia (ENE 2020) Portugal prevê que para 2020, 31% de toda a energia consumida e 60% da eletricidade consumida tenham origem nas fontes de energia renováveis.

É no sentido de contribuir para o conhecimento da aplicação da biotecnologia à degradação de compostos tóxicos e à sua possível valorização que se desenvolveu a presente investigação, visando uma sociedade futura baseada na sustentabilidade ambiental.

1.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a biodegradação anaeróbia de compostos modelo derivados da lignina, a vanilina e a ortovanilina, na presença de diferentes teores de cosubstratos e utilizando populações anaeróbias mistas previamente adaptadas à glucose e à vanilina respetivamente, em regime mesófilo e termófilo.

Para complementar este estudo foi também estudada a biodegradação anaeróbia do 4-clorofenol por populações anaeróbias mistas previamente adaptadas à vanilina em regime termófilo.

1.2. Estrutura da Dissertação

A dissertação está organizada em cinco Capítulos, dos quais se apresenta uma descrição sumária:

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO - Num contexto mundial de preocupação crescente com uma economia “verde” baseada na sustentabilidade ambiental, a investigação de métodos biotecnológicos, como a digestão anaeróbia, que possam constituir alternativas viáveis aos tratamentos físicos - químicos utilizados na degradação de resíduos derivados de lignina e clorofenóis assume especial relevância. Neste Capítulo além do objetivo do trabalho é, ainda, referida a importância e atualidade do tema estudado.

Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - Neste Capítulo é descrita a constituição geral dos compostos lignocelulósicos, seus derivados fenólicos, assim como a caracterização da digestão anaeróbia. São ainda abordados os clorofenóis, o seu impacto ambiental e degradação.

Capítulo 3 - MATERIAIS E MÉTODOS - Descrição dos reagentes utilizados: vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol, assim como as metodologias aplicadas para o estudo da biodegradação anaeróbia destes compostos.

Capítulo 4 - ANÁLISE DE RESULTADOS E DISCUSSÃO - Os resultados obtidos nos diversos ensaios de biodegradação anaeróbia dos compostos fenólicos vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol, nos regimes mesófilo e termófilo, são aqui apresentados e discutidos, procurando-se interpretar os resultados.

Capítulo 5 - CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS - São descritas as conclusões obtidas da realização da biodegradação anaeróbia dos derivados lignocelulósicos (vanilina e ortovanilina) e do 4-clorofenol em regime mesófilo e termófilo.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

Têm sido desenvolvidas pesquisas sobre a conversão e biodegradação de substratos lignocelulósicos (resíduos agrícolas, culturas específicas cultivadas em solos não aráveis especificamente para a produção de energia, resíduos florestais e determinados tipos de madeiras) devido à sua composição hidrocarbonada e ao facto de estes compostos serem abundantes na natureza, constituindo assim uma fonte renovável e de produção de compostos hidrocarbonados (Chandra *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014; Quemeneur *et al*, 2012; Risberg *et al*, 2013). A compreensão da constituição dos compostos lignocelulósicos e as principais vias de degradação de alguns dos seus componentes constitui um aspeto fundamental a desenvolver no presente Capítulo.

2.1. Constituição dos Compostos Lignocelulósicos

Os compostos lignocelulósicos são os principais constituintes das paredes celulares vegetais, garantindo o suporte estrutural e proteção à planta, sendo uma matriz constituída principalmente por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina, conjuntamente com pequenas quantidades de pectinas, proteínas e açúcares solúveis.

A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal, sendo um polissacárido linear cristalino (estrutura organizada) constituído por monómeros de D-glucose ligados por ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 2a). O dímero estrutural é a celobiose (Figura 2b). As cadeias de celulose estão estreitamente associadas através das forças de Van der Waals e por ligações de hidrogénio formando deste modo estruturas organizadas complexas, praticamente insolúveis (Figura 3) (Campos, 1998; Villareal *et al*, 2012). As cadeias de celulose agregam-se para formar microfibrilas, que são altamente cristalinas e insolúveis, cada uma com aproximadamente 3 nm de diâmetro, quimicamente estáveis e resistentes ao ataque enzimático (Villareal *et al*, 2012). A celulose é mais suscetível à biodegradação na forma amorfa (Monlau *et al*, 2014).

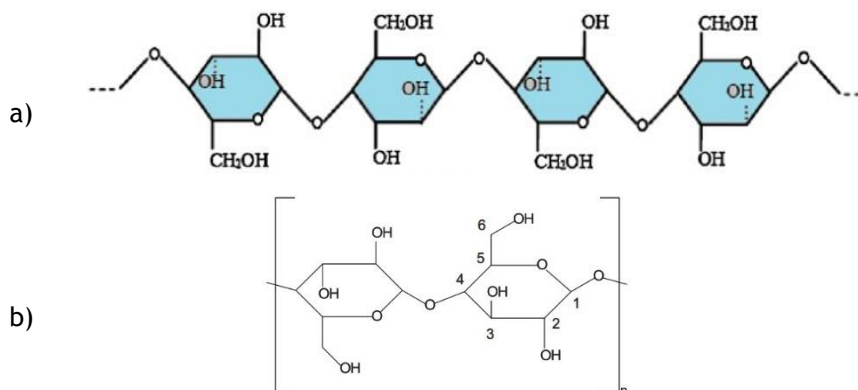


Figura 2 - a) Representação esquemática da cadeia de celulose (Chandra *et al*, 2012). b) Dímeros estruturais da celulose (Collard e Blin, 2014).

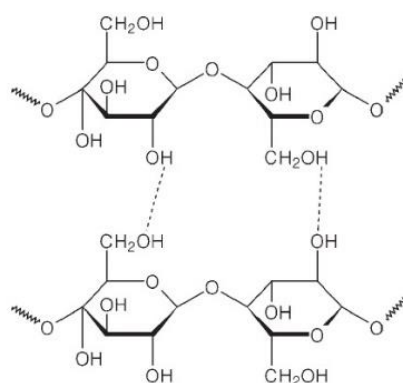


Figura 3 - Esquema das ligações de hidrogênio (a tracejado) que se estabelecem entre as cadeias de celulose formando estruturas complexas (Adaptado de Campos, 1998).

A hemicelulose é um heteropolissacárido cuja cadeia pode ser formado por D-xilose, manose, glucose, galactose, β -glucanos e xiloglucanos, podendo apresentar também resíduos acetilados (Campos, 1998; Peng e She, 2014). A hemicelulose está associada às fibras de celulose, reforçando a rigidez da parede celular. Geralmente nas espécies vegetais utilizadas para a produção de madeira (angiospérmicas) verifica-se a presença maioritária de unidades de β -D-xilopiranoses unidas por ligações β (1 \rightarrow 4) contendo também resíduos 4-O-metil- α -D-ácido glucorónico, α -D-ácido glucorónico e α -L-arabinofuranose, enquanto nas gimnospérmicas verifica-se a presença de galactoglucomanoses acetiladas ligadas pelas extremidades β (1 \rightarrow 4) (Figura 4) (Collard e Blin, 2014). Nas gramíneas é mais frequente a arabinoxilose. A hemicelulose apresenta elevada biodegradabilidade sendo utilizada para diversas aplicações, desde a indústria alimentar à indústria química e energética (produção de H_2 e de biocombustíveis) (Peng e She, 2014).

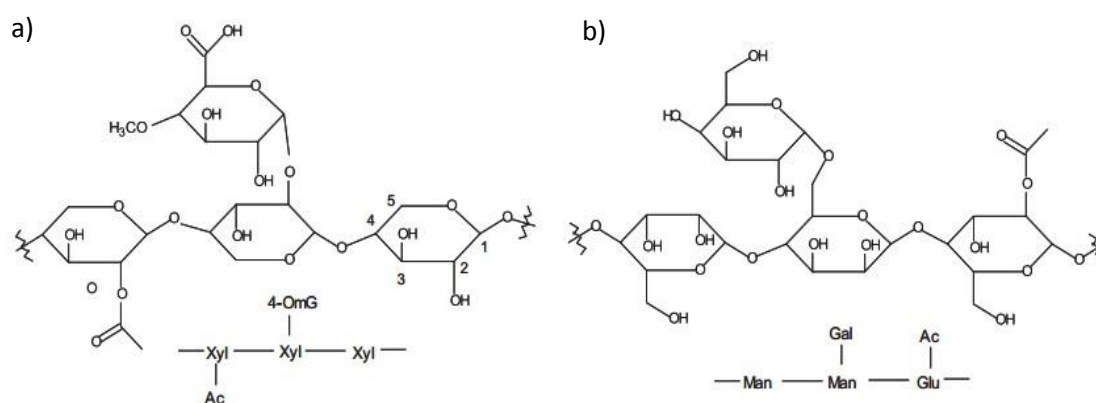


Figura 4 - a) Estrutura parcial do xilano que constitui a hemicelulose. b) Estrutura parcial da β -glucomanose que constitui a hemicelulose (Xyl - xilopiranosose; 4-OmG - 4-O-ácido metilglucorónico; Man - manopiranosose; Glu - glucopiranosose; Gal - Galactose; Ac - Acetil) (Adaptado de Collard e Blin, 2014).

A lignina é o terceiro polímero mais abundante na natureza, depois da celulose e hemicelulose, sendo também um componente essencial das paredes celulares vegetais conferindo às plantas rigidez estrutural, impermeabilidade e resistência a stress oxidativo (Monlau *et al*, 2014). A lignina é um biopolímero aromático (Figura 5a) complexo e amorfo composto por três monómeros diferentes de fenilpropano a partir das unidades: p - hidroxifenil (H), guaiacil (G) e seringil (S) (Figura 5b), que contêm um grupo hidroxilo na posição *para* do anel aromático, diferindo no seu grau de metiloxidação (Collard e Blin J., 2014).

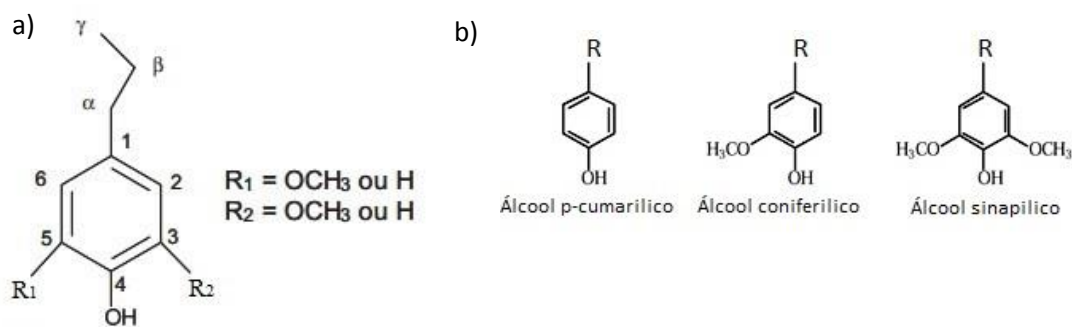


Figura 5 - a) Estrutura geral dos monómeros de lignina e b) respectivos monómeros (Adaptado de Collard e Blin, 2014).

Estas unidades estão ligadas por ligações éter e ligações C - C, sendo as mais comuns as indicadas na Figura 6 (Collard e Blin, 2014; Kang *et al*, 2013).

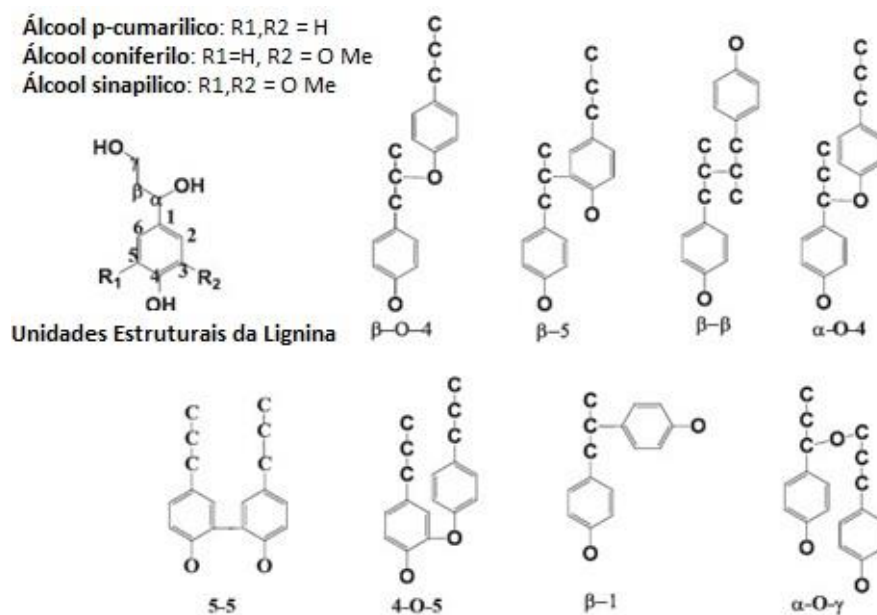


Figura 6 - Representação esquemática das ligações básicas da lignina (Kang *et al*, 2013).

As proporções dos diferentes monómeros (H, G e S) variam de acordo com a espécie vegetal, a maturidade da planta e a região/localização das células na planta. A lignina nas gimnospermas (coníferas) contém sobretudo unidades de guaiacil (G), enquanto nas angiospermas predominam as unidades guaiacil (G) e seringil (S). Normalmente as plantas herbáceas contêm os três monómeros (H, G e S) em quantidades significativas (Monlau *et al*, 2014). A Figura 7 representa o esquema de uma cadeia de lignina e respetivas ligações químicas.

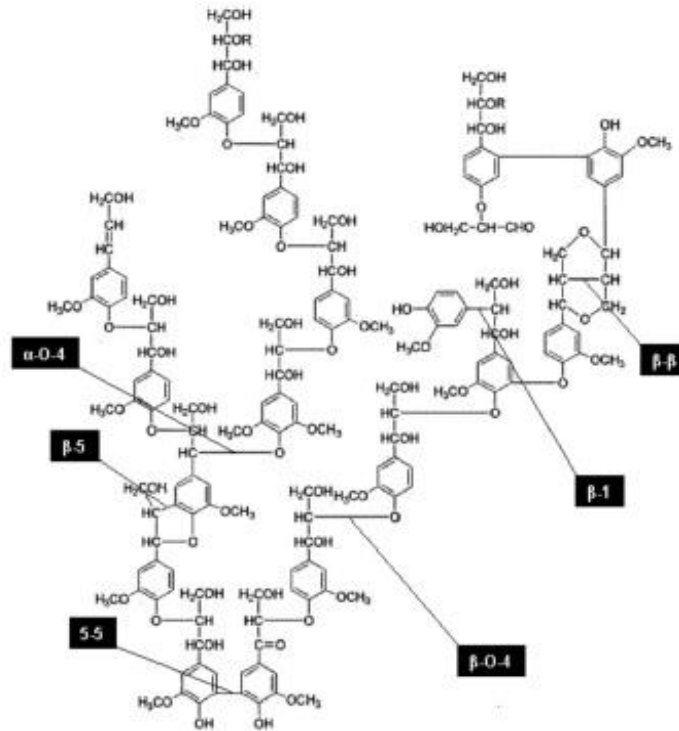


Figura 7 - Representação esquemática de uma cadeia de lignina e respetivas ligações químicas (Carvalho *et al*, 2009).

A organização dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina que constituem a matriz lignocelulósica encontra-se representada na Figura 8.

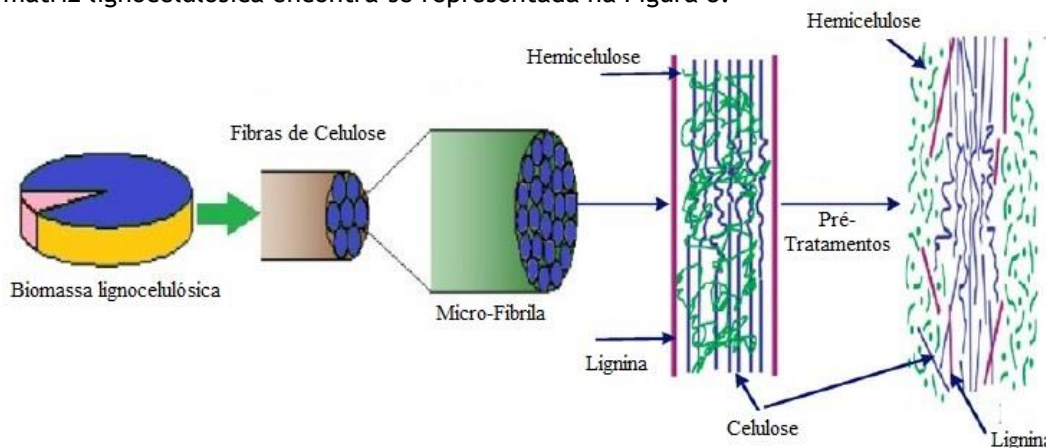


Figura 8 - Constituição da matriz lignocelulósica com a respetiva organização dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina e sua hidrólise por pré-tratamento (Chandra *et al*, 2012).

2.2. Digestão Anaeróbia de Compostos Lignocelulósicos

A degradação anaeróbia da matéria orgânica por culturas microbianas anaeróbias mistas permite simultaneamente proteger os ecossistemas da carga poluente e valorizar os substratos.

2.2.1. Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia corresponde à degradação microbiológica da matéria orgânica, sob condições anaeróbias, conduzindo à sua estabilização e à formação de biogás, composto sobretudo por metano (55 - 75%) e dióxido de carbono (25 - 45%) (Monlau *et al*, 2014). A digestão anaeróbia tem inúmeras vantagens como a baixa produção de lamas, o baixo consumo de energia e a possibilidade de recuperação energética através da utilização do biogás (metano) produzido no processo (Chen *et al*, 2008). Além disso, o consumo de biogás (metano) produzido neste processo apresenta ainda as seguintes vantagens:

- É produzido a partir de recursos renováveis.
- A sua combustão não contribui com elevadas quantidades de gases de estufa para a atmosfera terrestre.
- O processo utilizado permite reduzir a poluição devido à utilização dos resíduos orgânicos na sua produção.

O metano produzido na digestão anaeróbia é tão eficiente como o gás natural, podendo ser utilizado para a produção de energia elétrica, calor e biocombustíveis (Chandra *et al*, 2012; Risberg *et al*, 2013). Além disso, a combustão do metano liberta emissões gasosas muito menores quando comparados com o gasóleo ou gás natural (Chandra *et al*, 2012) (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação das emissões gasosas de diversos combustíveis utilizados em veículos pesados de passageiros (autocarros) (Adaptado de Chandra *et al*, 2012)

g/km	CO	HC	NO _x	CO ₂
Gasóleo	0.20	0.40	9.73	1053
Gás Natural	0.40	0.60	1.10	524
Biogás (Metano)	0.08	0.35	5.44	223

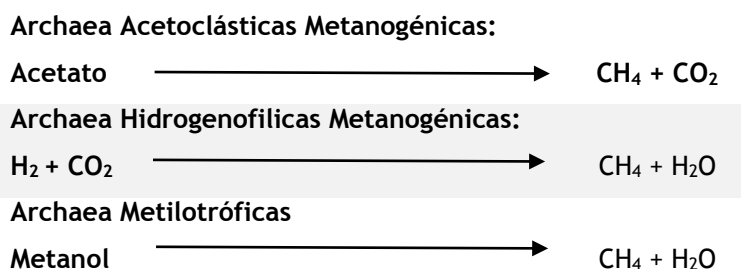
As comunidades microbianas anaeróbias mistas incorporam uma grande diversidade de populações bacterianas em cada uma das fases do processo: populações hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas e as *archaea* metanogénicas, que diferem muito entre si do ponto de vista fisiológico, nutricional, metabólico, dinâmica populacional e na sensibilidade às condições ambientais (Chandra *et al*, 2012; Chen *et al*, 2008).

A digestão anaeróbia pode ser dividida em quatro fases principais: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese (Chandra *et al*, 2012; Lima e Mota, 2003; Monlau *et al*, 2014).

Na fase inicial (hidrólise) as bactérias fermentativas heterotróficas, anaeróbias facultativas ou obrigatórias, começam por hidrolisar os vários polímeros (proteínas, lípidos) constituintes da matéria orgânica, assim como a componente lignocelulósica (celulose e outros polissacáridos), através da intervenção de enzimas extracelulares - as hidrolases - desencadeando fermentações ácidas mistas, produzindo um conjunto de ácidos orgânicos, álcoois e dióxido de carbono, entre outros produtos (acidogénese). A hidrólise dos carboidratos é rápida, ocorrendo em poucas horas, enquanto a hidrólise das proteínas e lípidos é mais lenta, podendo demorar vários dias. A degradação dos compostos lignocelulósicos é lenta e incompleta (Chandra *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014).

Por outro lado, as bactérias sintróficas homoacetogénicas, a partir dos ácidos orgânicos e álcoois, dão origem por reações de beta-oxidação a hidrogénio e ácido acético (acetogénese). O hidrogénio produzido vai ser utilizado para reduzir o dióxido de carbono a metano (metanogénese) pelas *archaea* hidrogenofilicas metanogénicas. As *archaea* acetoclásticas metanogénicas clivam o acetato, proveniente quer da atividade das bactérias sintróficas quer de fermentações ácidas mistas, dando origem a moléculas de metano e dióxido de carbono (metanogénese) (Chandra *et al*, 2012; Lima e Mota, 2003). Assim, a metanogénese corresponde à conversão final do acetato, formato, metanol, dióxido de carbono e hidrogénio em biogás constituído essencialmente por metano e dióxido de carbono de acordo com a Tabela 3 (Chandra *et al*, 2012; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014).

Tabela 3 - Tipos de bactérias metanogénicas e respetivos substratos (Adaptado de Chandra *et al*, 2012).



As *archaea* hidrogenofílicas metanogénicas ao converterem o hidrogénio conjuntamente com o dióxido de carbono em metano, asseguram uma baixa pressão parcial de hidrogénio, possibilitando o desenvolvimento das populações acetoclásticas metanogénicas. A abundância relativa das populações hidrogenofílicas metanogénicas e acetoclásticas metanogénicas é variável e depende de factores ambientais (concentração de acetato, amónia, hidrogénio) e das condições de operação (pH, temperatura, tipo de substrato, origem do inóculo), assim como a concentração de sólidos. No entanto, estudos recentes demonstraram que em digestores anaeróbios as populações hidrogenofílicas metanogénicas são, numa fase inicial, as dominantes. Porém, com a conseqüente diminuição da concentração de hidrogénio e estabilização do processo, ocorre o posterior desenvolvimento das populações bacterianas acetoclásticas metanogénicas (Chandra *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014).

No entanto, a presença de substâncias inibidoras no meio pode conduzir à diminuição ou à completa inibição da digestão anaeróbia, traduzida pela diminuição ou ausência de produção de metano e acumulação de ácidos orgânicos no meio (Chen *et al*, 2008).

Por exemplo a amónia, ainda que seja um nutriente essencial para os microorganismos, quando em elevadas concentrações no meio conduz à inibição da digestão anaeróbia. A amónia é produzida pela degradação biológica da matéria orgânica nitrogenada, como proteínas e ureia. Muitos mecanismos de inibição por amónia têm sido descritos, como a variação do pH intracelular, aumento da energia de manutenção intracelular e inibição de reações enzimáticas essenciais ao metabolismo. O ião amónio (NH_4^+) e a amónia (NH_3) são as principais formas azotadas inorgânicas presentes em solução. A amónia (NH_3) foi descrita como sendo mais inibidora que o ião amónio (NH_4^+), uma vez que a amónia apresenta uma maior hidrofocidade relativamente ao ião amónio. Este facto faz com que a amónia atravesse mais facilmente a membrana celular, comprometendo o equilíbrio interno de protões e/ou a deficiência em iões potássio (K^+). Entre os diversos microorganismos anaeróbios as populações bacterianas metanogénicas são as menos tolerantes à inibição devido à presença em elevadas concentrações da amónia. A diferença significativa da inibição pela concentração da amónia é atribuída a diferenças no substrato e inóculo, assim como aos períodos de aclimatização das populações microbianas (Chen *et al*, 2008).

Também o pH afeta significativamente o processo de digestão anaeróbia pois condiciona o crescimento das diversas populações microbianas envolvidas nas várias fases do processo de digestão. O pH do meio depende da concentração dos compostos intermédios produzidos durante a fermentação (Chandra *et al*, 2012) e da capacidade tampão do sistema.

A maioria das bactérias anaeróbias, nomeadamente as metanogénicas, têm um crescimento ótimo para valores de pH entre 6,8 e 7,2. O pH inicial na digestão anaeróbia diminui até aproximadamente 6,0 devido à produção de ácidos voláteis e de dióxido de carbono. No entanto, o pH aumenta entretanto para valores entre 7,0 e 8,0 devido ao consumo dos ácidos voláteis pelas bactérias metanogénicas e pela sua produção de metano.

O intervalo ótimo de produção de metano ocorre para valores de pH entre 7,0 e 7,2, embora a sua produção também possa ocorrer satisfatoriamente para intervalos de pH entre 6,6 e 7,6. Porém, valores de pH inferiores a 6,6 causam a inibição completa das populações metanogénicas, pois as condições ambientais ácidas são tóxicas para estas bactérias (Chandra *et al*, 2012).

A temperatura também influencia a concentração de amónia (NH₃), assim como a taxa de crescimento das populações anaeróbias microbianas, especialmente as bactérias metanogénicas (Chandra *et al*, 2012). O aumento da temperatura tem, geralmente, um efeito positivo na taxa metabólica dos microorganismos. Porém, também conduz ao incremento da concentração da amónia (NH₃) que pode levar à inibição da digestão anaeróbia (Chen *et al*, 2008).

2.2.2. Degradação de Compostos Lignocelulósicos

As características físico-químicas dos compostos lignocelulósicos conferem um carácter recalcitrante constituindo, assim, uma barreira à hidrólise e degradação durante os processos fermentativos e um factor limitante da digestão anaeróbia. Para ultrapassar estas barreiras naturais diversas tecnologias de pré-tratamento térmicos, termoquímicos e físicos ou mecânicos têm sido utilizadas com o objetivo de incrementar a produção de biohidrogénio e metano a partir de resíduos lignocelulósicos. Embora estes pré-tratamentos contribuam para a hidrólise e solubilização dos polímeros hidrocarbonados em açúcares solúveis (glucose, xilose, manose, arabinose e galactose), conduzem também à formação de compostos lignocelulósicos derivados da lignina como a vanilina (a partir da degradação das unidades guaiacil da lignina), ortovanilina, siringaldeido (a partir da degradação das unidades seringil da lignina) e outros compostos fenólicos. A desidratação das pentoses e hexoses conduz, por sua vez, à formação de furanos (furfural e hidroximetil furfural, respetivamente) que podem depois ser degradados a ácidos fracos (ácido fórmico e ácido levulinico) (Monlau *et al*, 2014; Quemeneur *et al*, 2012). O processo de formação de compostos derivados lignocelulósicos encontra-se esquematizado na Figura9.

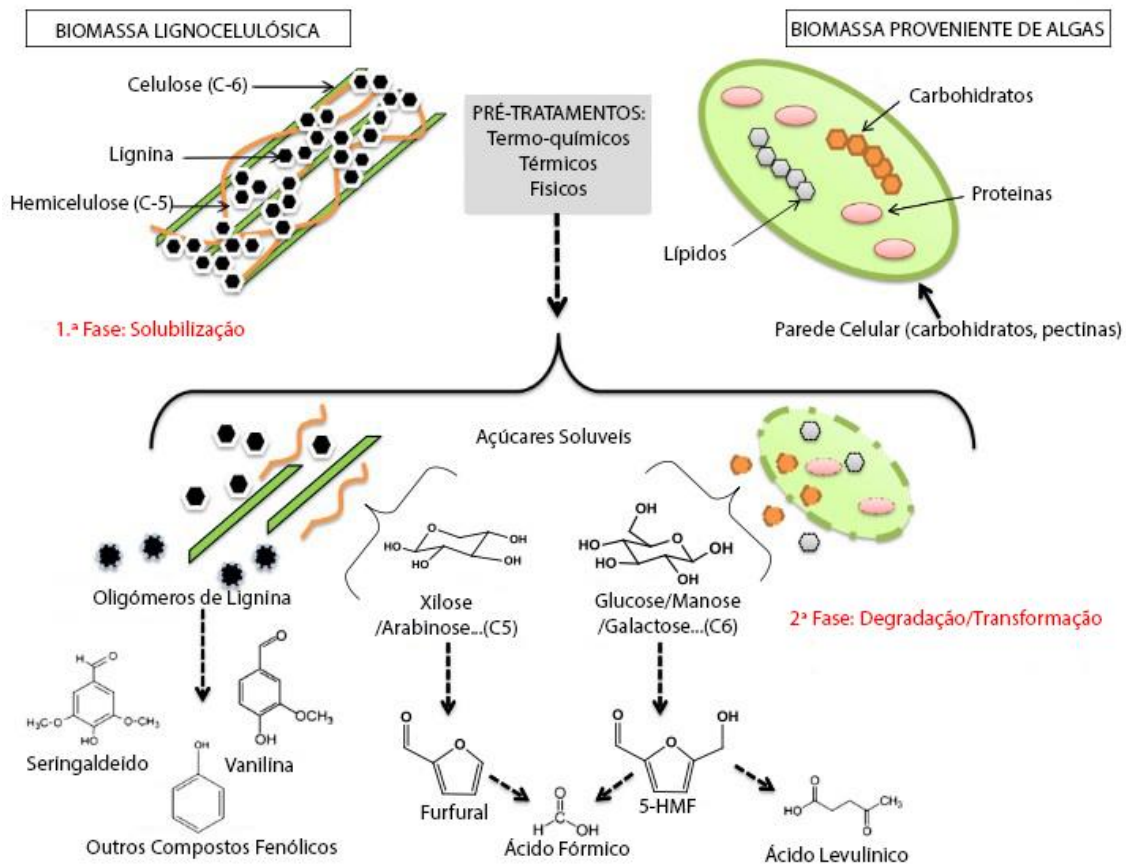
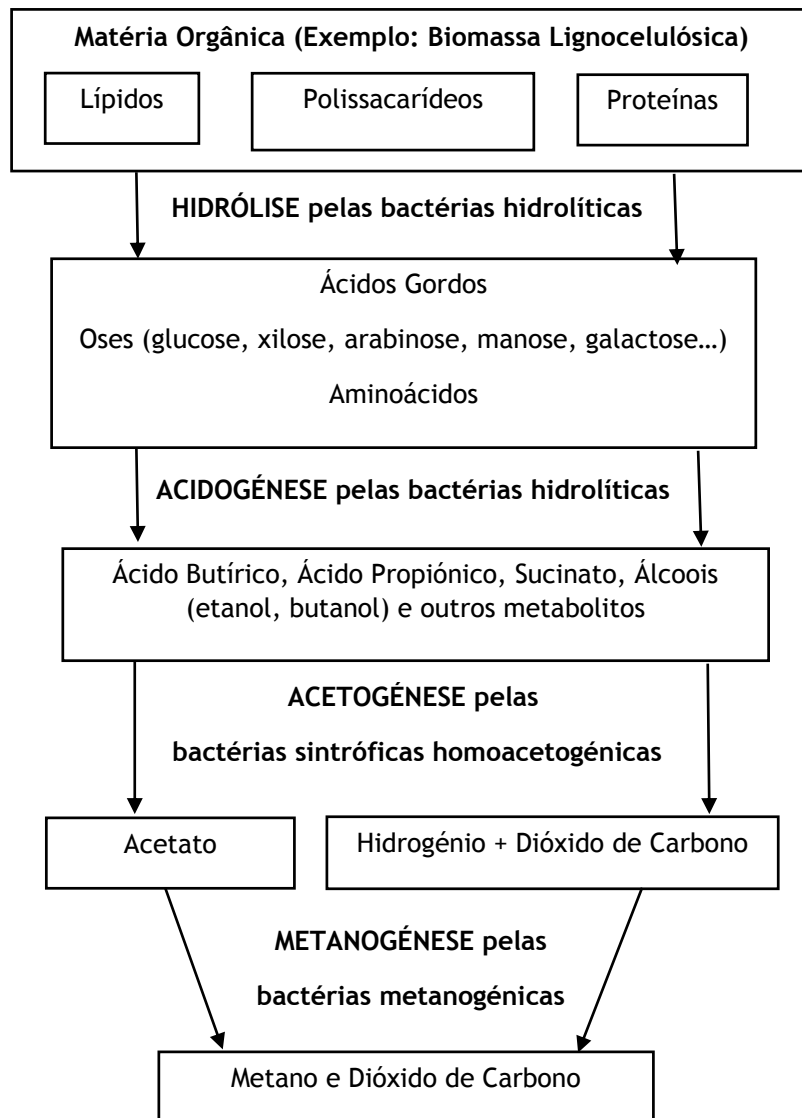


Figura 9 - Esquema global da formação de derivados lignocelulósicos após o pré-tratamento térmico, termo-químico e físico da biomassa lignocelulósica (Monlau *et al*, 2014).

A natureza dos compostos derivados da lignina formados em consequência dos pré-tratamentos lignocelulósicos depende do tipo de biomassa assim como da natureza e severidade do pré-tratamento. Com efeito, os compostos furfural e hidroximetil furfural (5-HMF) são formados em condições de pH baixo (pré-tratamentos térmicos e termo-ácidos), sendo a sua concentração negligenciável quando se verifica um pH elevado (por exemplo, nos pré-tratamentos termo-alcalinos). Por outro lado, a concentração dos compostos fenólicos é significativa para valores de pH elevados, uma vez que os pré-tratamentos alcalinos são os que mais significativamente contribuem para a degradação da lignina (Monlau *et al*, 2014).

As diversas fases da digestão anaeróbia, assim como a conversão matéria orgânica biodegradável estão indicadas na Figura 10.

a)



b)

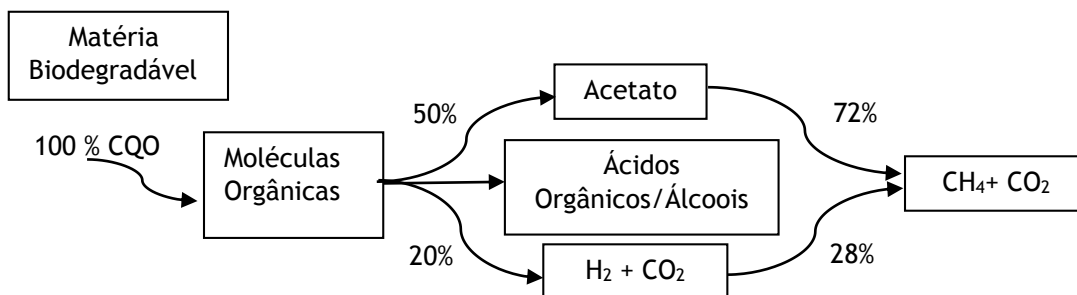


Figura 10 - a) Esquema das diversas etapas da digestão anaeróbia de biomassa lignocelulósica utilizando culturas microbianas mistas (adaptado de Lima N. e Mota M., 2003; Monlau F. *et al*, 2014). b) Conversão da matéria orgânica ao longo do processo de digestão anaeróbia (adaptado de Chandra *et al*, 2012).

2.3. Compostos Fenólicos Derivados da Lignina

Os compostos fenólicos danificam as células microbianas, uma vez que alteram a permeabilidade da membrana celular afetando a sua seletividade, causando danos nos componentes intracelulares e inativação dos sistemas enzimáticos, ameaçando assim a homeostasia da célula. Os compostos fenólicos de baixo peso molecular são considerados mais tóxicos para os microorganismos relativamente aos de elevado peso molecular, uma vez que apresentam níveis de hidrofobicidade superiores afetando os transportadores membranares e comprometendo a integridade celular. Os compostos fenólicos originam também espécies reativas (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}) que têm impacto negativo nas células microbianas, induzindo à sua apoptose (Monlau *et al*, 2014; Quémeneur *et al*, 2012; Veeresh *et al*, 2005).

Estudos recentes da degradação anaeróbia utilizando compostos fenólicos (vanilina, seringaldeido) e furanos (furfural e 5-HMF) como fonte única de carbono, com uma concentração inicial de 1 g/L, demonstraram ser recalcitrantes para os microorganismos verificando-se a ausência de produção de biogás, mesmo utilizando culturas anaeróbias mistas (Barakat *et al*, 2012; Quémeneur *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014). Porém, o efeito inibitório destes compostos está dependente da adaptação inicial do ecossistema microbiano a esses compostos tóxicos, assim como a sua concentração inicial. O aumento progressivo da concentração de compostos fenólicos conduz à adaptação do ecossistema microbiano (aclimatização), diminuindo a fase *lag*, e conseqüentemente ao aumento progressivo da taxa de remoção de fenóis durante a digestão anaeróbia (Chen *et al*, 2008; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005). A aclimatização dos microorganismos anaeróbios aumenta a sua tolerância à presença de compostos tóxicos incrementado a sua biodegradabilidade (Chen *et al*, 2008).

Além disso, a diversidade microbiana das culturas anaeróbias mistas faz com que os microorganismos apresentem diferentes “habilidades” para se adaptarem e crescerem na presença de compostos tóxicos podendo utilizar diferentes mecanismos de adaptação para evitar ou repararem danos causados por estes compostos tóxicos. De forma a manter a integridade da membrana celular, algumas espécies bacterianas reagem à presença de compostos tóxicos convertendo ácidos gordos insaturados *cis* em ácidos gordos insaturados *trans* ao nível da membrana. Outras espécies microbianas produzem proteínas “SOS” que reparam eventuais danos no DNA e mantêm a estrutura do sistema enzimático, assim como transformam e degradam os compostos tóxicos, utilizando-os diretamente como fonte de carbono (Monlau *et al*, 2014).

Substratos de difícil degradação como os fenóis também podem ser efetivamente biodegradados na presença de outros substratos facilmente metabolizáveis (Ferreira e Sousa, 1998; Parshina *et al*, 2000; Veeresh *et al*, 2005). A presença de co-substratos é importante quando um substrato não pode servir como fonte de energia imediata para o crescimento bacteriano (Ferreira e Sousa, 1998).

Co-substratos (glucose, sacarose, acetato) na presença de fenóis em efluentes mantêm as populações metanogénicas ativas e conduzem progressivamente à sua aclimatização, conduzindo à posterior fragmentação dos anéis aromáticos e degradação dos fenóis (Veeresh *et al*, 2005). Ensaio experimentais efetuados com populações bacterianas anaeróbias puras por Lux *et al*, 1990 (*in* Parshina *et al*, 2000) indicaram que a adição de co-substratos (hidrogénio, sacarose, monóxido de carbono) incrementou a conversão de derivados lignocelulósicos como a vanilina. A adição de hidrogénio, butirato ou sacarose também favorece a degradação do benzaldeído (Todini e Hulshoff Pol, 1992 *in* Parshina *et al*, 2000). Para a ortovanilina foi também conseguida a degradação na presença de uma estirpe pura (Sembiring e Winter, 1990 *in* Parshina *et al*, 2000)

A eficiência da degradação dos fenóis está também inversamente relacionada com a temperatura. Uma taxa de degradação mais elevada foi verificada em regimes mesófilos (30°C - 40°C) relativamente a regimes termófilos (50°-60°C) (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014; Risberg *et al*, 2013). Uma possível explicação poderá ser a diversidade microbiana das culturas anaeróbias mistas ou/e a presença de enzimas termosensíveis/lábeis (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014). Na Tabela 4 estão indicadas algumas bactérias recolhidas em bioreatores usados no tratamento de fenóis.

Tabela 4 - Algumas Populações Metanogénicas Recolhidas em Reatores Para Tratamento de Fenóis (Adaptado de Leven *et al*, 2012)

Populações Metanogénicas	Origem	Temperatura (°C) ^(b)	Substrato ^(c)
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	UASB ⁽¹⁾ para tratamento de efluentes com fenóis	26	Fenol
<i>Clostridia</i> , <i>Syntrophorhabdaceae</i>	UASB ⁽¹⁾ para tratamento de efluentes com fenóis	55	Fenol
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	WWTP ^{(2)(a)}	37	Fenol, benzoato, tereftalato
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	WWTP ^{(2)(a)}	55	Fenol, benzoato, tereftalato
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	GAC-AFB ⁽³⁾ para tratamento de efluentes com fenóis	35	Fenol
<i>Syntrophorhabdaceae</i>	Mesófilo CSTR ⁽⁴⁾ para tratamento OMSW ⁽⁵⁾	37	Fenol, ⁽⁶⁾ 4-OHBa, benzoato
<i>Desulfotomaculum subcluster lh</i>	Termófilo para tratamento OMSW ⁽⁵⁾	55	Fenol, ⁽⁶⁾ 4-OHBa, benzoato

⁽¹⁾UASB: Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor; ⁽²⁾WWTP: Wastewater Treatment Plant; ⁽³⁾ GAC-AFB: Granular Activated Carbon-Anaerobic Fluidized Bed; ⁽⁴⁾ CSTR: Continuous Stirred Tank Reactor; ⁽⁵⁾ OMSW Organic Municipal Solid Waste; ⁽⁶⁾ 4-OHBa: 4-hidroxibenzoato; (a) Culturas enriquecidas; (b) Temperatura do Processo; (c) Substrato utilizado para enriquecimento das comunidades microbianas.

Na degradação anaeróbia em regime mesófilo os compostos fenólicos são convertidos em hidroxibenzoato, por carboxilação. Este é depois “clivado” e através de uma β -oxidação, origina propionato e butirato sendo ambos degradados e transformados pelas bactérias sintróficas em acetato e H_2/CO_2 (Figura 11) (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014; Parshina *et al*, 2000; Veeresh *et al*, 2005). As bactérias metanogénicas convertem depois o acetato e H_2/CO_2 em metano. Em regime termófilo os compostos fenólicos parecem ser degradados pela via do caproato em vez da via do hidroxibenzoato, sendo a velocidade de biodegradação dos compostos fenólicos mais lenta relativamente ao regime mesófilo. Este facto pode dever-se à sensibilidade térmica das enzimas chave na degradação do fenol via hidroxibenzoato, que em temperaturas mais altas ficam inativas ou desnaturadas impossibilitando a degradação via hidroxibenzoato. (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Parshina *et al*, 2000; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005). Além disso, a biodegradação dos compostos fenólicos está também dependente de uma comunidade microbiana diversa, que difere igualmente na sua capacidade de degradação dos fenóis, estando por isso sujeita a pressões seletivas diferentes. Foi observada uma grande diferença na composição populacional das comunidades microbianas metanogénicas que degradam compostos fenólicos a diferentes temperaturas o que pode explicar as diferenças na capacidade e vias de biodegradação (Chen *et al*, 2008; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012).

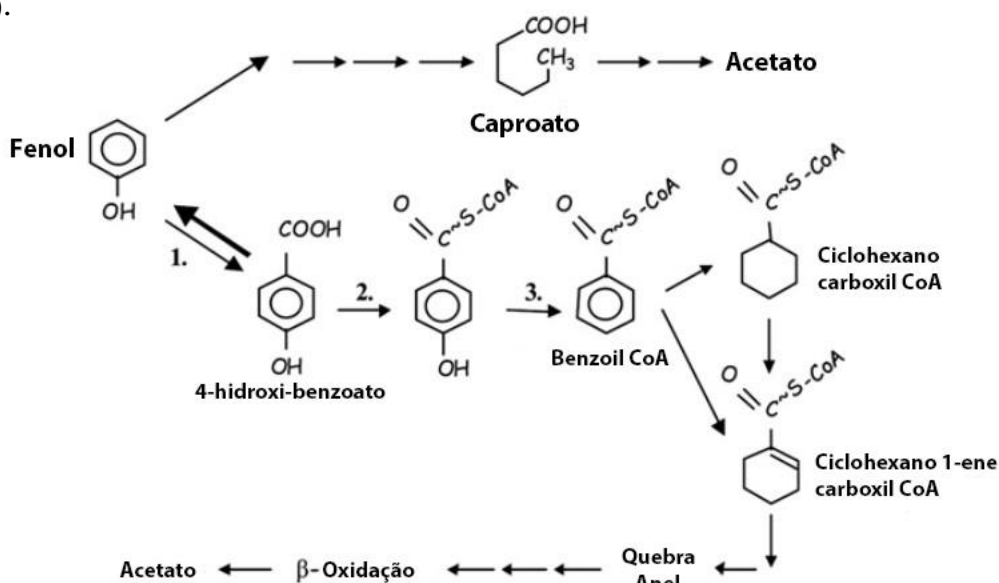


Figura 11 - Esquemática das duas vias de biodegradação do fenol na metanogénese: via caproato ou via 4-hidroxibenzoato. Enzimas envolvidas na transformação do fenol: 1. Fenol carboxilase/4-hidroxibenzoato descarboxilase; 2. 4-hidroxibenzoato-CoA ligase; 3. 4-hidroxibenzoato-CoA redutase (Leven *et al*, 2012).

2.4. Degradação de Clorofenóis

Os fenóis cloretados ou clorofenóis são um grupo de dezanove isômeros, contendo de um a cinco átomos de cloro ligados em diferentes posições a um anel de benzeno, do qual fazem parte os monoclorofenóis (CP), diclorofenóis (DCP), triclorofenóis (TCP), tetraclorofenóis (TeCP) e pentaclorofenóis (PCP). (Chen *et al*, 2008; Penttinen, 1995; Shaikh *et al*, 2002).

Os compostos fenólicos cloretados ou clorofenóis são um dos grupos de xenobióticos mais prevalentes e dos poluentes orgânicos mais utilizados no setores industrial e comercial. Os clorofenóis são libertados para o meio ambiente através dos efluentes das diversas indústrias, incluindo a indústria petroquímica, refinarias, indústria do papel e de tanoaria (Li *et al*, 2013; Moussavi *et al*, 2014; Shaikh *et al*, 2002). A sua libertação para o ambiente também pode ocorrer devido ao seu uso comercial, agrícola (pesticidas/herbicidas) e doméstico (produtos de limpeza e higiene doméstica) (Moussavi *et al*, 2014).

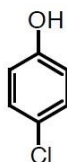
Os clorofenóis são persistentes e quando libertados no meio ambiente podem acumular-se nos tecidos vivos adiposos (bioacumulação) e nas cadeias alimentares (bioampliação) (Moussavi *et al*, 2014; Shaikh *et al*, 2002). Os clorofenóis são também compostos tóxicos para os microorganismos. A sua elevada hidrofobicidade e lipossolubilidade facilita a sua adesão às membranas bacterianas o que leva à disrupção do gradiente de protões ao longo da membrana interferindo com os processos metabólicos e consequentemente com a homeostasia celular. (Nordin, 2004; Puyol *et al*, 2012).

Os clorofenóis afetam também a metanogénese, pois os microorganismos metanogénicos são os mais sensíveis, entre as populações microbianas, no processo de digestão anaeróbia. De acordo com Puyol *et al*, 2012, para uma concentração de 40 mg/L de 4-clorofenol no meio, ocorre uma redução de 16,6% na atividade metanogénica específica. Os pentaclorofenóis são os clorofenóis mais tóxicos, havendo evidências que indicam que a toxicidade dos clorofenóis está relacionada com a sua hidrofobicidade (Puyol *et al*, 2012). Compostos com maior hidrofocidade, por serem mais lipossolúveis, interagem mais eficientemente com as moléculas das membranas celulares, conduzindo mais facilmente à alteração da sua estrutura. (Chen *et al*, 2008; Moussavi *et al*, 2014).

A presença destes compostos no ambiente trouxe, para além dos problemas de contaminação ambiental, problemas de saúde pública, pois estes compostos têm efeitos carcinogénicos, mutagénicos e teratogénicos para o Homem, assim como para os animais. (Li *et al*, 2013; Moussavi *et al*, 2014). Os clorofenóis podem ainda ser lixiviados, migrando através das diversas camadas do solo alcançando aquíferos e contaminando-os. A água destes aquíferos ao ser explorada através de furos e consumida pelo Homem ou pelos animais pode constituir um grave problema de saúde pública (Moussavi *et al*, 2014).

O carácter recalcitrante dos clorofenóis deve-se à ligação muito forte carbono (C) - halogéneo (Cloro) o que conduz ao incremento da energia necessária para “quebrar” a ligação, a qual confere uma elevada estabilidade ao anel aromático (Moussavi *et al*, 2014).

A degradação dos compostos aromáticos halogenados depende do número e da posição do halogéneo (cloro). Quanto maior o número de substituintes halogéneos tiver o composto mais facilmente se dá a desalogenação reductiva. O cloro na posição *para*, como o 4-clorofenol ou para - 4 - clorofenol, é o mais difícil de remover (Figura 12) (Davies-Vem *et al*, 1992 in Chen *et al*, 2008). A biodegradação destes compostos pode ocorrer por desalogenação da estrutura do anel, por oxidação, redução ou substituição ou a quebra do anel pode preceder a desalogenação, formando-se compostos alifáticos desalogenados. A desalogenação pode ocorrer espontaneamente após a quebra do anel aromático, formando-se subprodutos como piruvato e succinato (Lima e Mota, 2003).



4-Chlorophenol

Figura 12 - Representação do 4-clorofenol (Nordin, 2004).

Devido às características adversas dos clorofenóis estes foram classificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental norte americana desde 1993 (Moussavi *et al*, 2014). De forma a proteger a saúde pública e ambiental dos efeitos tóxicos dos clorofenóis os efluentes contendo estes poluentes são tratados com métodos apropriados. Diferentes métodos físico-químicos, como a adsorção, oxidação química e extração por solventes, têm sido utilizados para tratar os efluentes de origem industrial. Embora estes processos sejam capazes de remover eficientemente os clorofenóis são métodos com elevados custos económicos e de grande complexidade, sendo necessários vários tratamentos para obter a completa mineralização. Processos de oxidação avançada foram recentemente introduzidos com eficiência e como métodos emergentes no tratamento de efluentes com compostos recalcitrantes. Porém, são também métodos dispendiosos e complexos, podendo conduzir à formação de compostos intermédios indesejáveis (Moussavi *et al*, 2014).

Vários bioprocessos biológicos aeróbios como SBR (Sequencing Batch Reactor), lamas activadas, RBC (Rotating Biological Contactor) e PBBR (Packed Bed Bio-Reactor) têm sido utilizados para biodegradar compostos com clorofenóis. Embora os métodos de biodegradação aeróbia tenham taxas de degradação elevadas (entre 0,14 e 1,87 Kg/m³ dia) apresentam também elevados custos de arejamento, sendo métodos complexos na sua manutenção e

operação, originando elevadas quantidades de biomassa rica em compostos voláteis (Moussavi *et al*, 2014).

Recentemente tratamentos biológicos anaeróbios têm sido aplicados e desenvolvidos em tratamentos de efluentes industriais e águas residuais como forma de reduzir a carga de poluentes cloretados. (Li *et al*, 2013; Moussavi *et al*, 2014). Os processos biológicos demonstraram capacidade de conduzir à completa mineralização dos compostos poluentes orgânicos, sendo relativamente simples na sua aplicação e manutenção, sendo assim métodos preferenciais, uma vez que constituem métodos ecológicos de degradação e mineralização dos contaminantes orgânicos, incluindo os clorofenóis.

Os métodos anaeróbios (por exemplo: AFR - Anaerobic Fixed Reactor, AnBR - Anoxic Baffled Reactor) ainda que apresentem taxas de biodegradação mais baixas (1,39 g COD/L para o AnBR) relativamente aos métodos de biodegradação aeróbios, são métodos que têm a vantagem de reduzir a quantidade de biomassa produzida, apresentando ainda menores custos de manutenção e operação e produção de biogás (metano), o que torna estes processos mais atrativos para o tratamento de efluentes contaminados (Moussavi *et al*, 2014).

Estes métodos têm sido amplamente investigados no sentido de incrementar as taxas de biodegradação, sem comprometer o equilíbrio das condições ambientais que permitam o crescimento ótimo das populações microbianas. Estudos recentes demonstraram que a aclimatização prévia das populações microbianas anaeróbias a concentrações progressivas de clorofenóis incrementa a taxa de biodegradação destes compostos (Moussavi *et al*, 2014).

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Neste Capítulo irá ser descrita a metodologia experimental utilizada neste trabalho, assim como os reagentes e materiais utilizados.

3.1. Meio de Cultura

Além de água, todos os microorganismos necessitam de nutrientes que forneçam os diferentes elementos químicos (carbono, azoto, fósforo, enxofre, magnésio, etc) que entram na composição da célula microbiana e que são essenciais às reações metabólicas. Assim, o meio de cultura, constituído pelo meio base e substratos, contém os nutrientes essenciais para o desenvolvimento e crescimento das populações anaeróbias mistas. O meio de cultura utilizado neste trabalho encontra-se descrito por Wiegant and Lettinga, 1985 (Tabela 5). Para neutralizar e tamponizar o meio de cultura foi utilizado um tampão de fosfato constituído por hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4 , 4g/L), dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4 0,46 g/L) e hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, 100 mg/L) de forma a estabilizar o valor do pH no intervalo entre 7 e 8. Ao tampão de fosfato foi também adicionado sulfureto de sódio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/L) para reforçar as condições de anaerobiose do meio de cultura.

Tabela 5 - Composição do Meio de Cultura Utilizado Para o Desenvolvimento da Biomassa Anaeróbia Mista (adaptado de Wiegant e Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Componentes	Substância	Concentração
Nutrientes	CaCl_2	0,058 g/L
	KCl	0,025 g/L
	NH_4Cl	0,017 g/L
	MgCl_2	0,011 g/L
	NaH_2PO_4	0,037 g/L
	Solução de Micronutrientes	1,0 ml/L
Fonte de Carbono	Glucose	1,8 g/L
Tampão Fosfato	Na_2HPO_4	4,0 g/L
	NaH_2PO_4	0,46 g/L
	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	100 mg/L
	$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50 mg/L

A solução de micronutrientes utilizada para o fornecimento de oligoelementos tinha a composição indicada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição da Solução de Micronutrientes (adaptado de Wiegant e Lettinga, 1985 e Lopes, 2005)

Compostos	Concentração
H ₃ BO ₃	50 mg/L
FeCl ₂ .4H ₂ O	2000 mg/L
ZnCl ₂ .2H ₂ O	50 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	30 mg/L
HCl (37%)	1 ml/L
(NH ₄) ₆ MoO ₇ .4H ₂ O	90 mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	50 mg/L
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	100 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	500 mg/L
EDTA	1000 mg/L

Como co-substratos, em alguns ensaios de biodegradação dos compostos fenólicos vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol, utilizou-se uma solução de acetato de sódio e glucose (a+g). Esta solução foi preparada por mistura de uma solução de glucose (g) 55 g/L e de uma solução de acetato de sódio (a) 55 g/L na proporção de 4:1 (v/v).

3.2. Substratos Utilizados nos Ensaios de Biodegradação Anaeróbia

3.2.1. Vanilina

A Vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) é um aldeído fenólico cuja fórmula molecular é C₈H₈O₃. Tem como grupos funcionais um aldeído, um éter (grupo metóxido) e um fenol (Figura 13). É o principal componente do extrato da vagem de uma orquídea tropical, a *Vanilla planifolia*, fazendo dela a única orquídea de interesse comercial fora do contexto decorativo (Velcheva *et al*, 2003). No entanto, a grande parte da vanilina produzida mundialmente (aproximadamente 12 000 toneladas anuais) é sintetizada por processos químicos por ser economicamente mais rentável relativamente ao processo de extração da planta, sendo as suas principais aplicações a indústria alimentar (como anti-oxidante/conservante e aroma a baunilha), química, farmacêutica e cosmética (Walton *et al*, 2003).

A vanilina é também um dos compostos fenólicos derivados da lignina (um importante constituinte vegetal que existe associado à celulose e hemicelulose nas paredes celulares vegetais) podendo ter efeitos inibitórios para determinadas espécies microbianas quando em elevadas concentrações no meio, interferindo negativamente com o crescimento e metabolismo celular (Monlau *et al*, 2014). Embora se considere a lignina e seus derivados fenólicos recalcitrantes, a elevada disponibilidade destes compostos na natureza tem atraído recentemente a atenção da comunidade científica, no sentido de serem desenvolvidas pesquisas sobre os processos de biodegradação e bioconversão destes compostos, e a possibilidade de serem utilizados como biocombustíveis no futuro, em alternativa aos combustíveis fósseis (Kang *et al*, 2013).

Neste trabalho foi estudada a biodegradação anaeróbia da vanilina (500 mg/L) em regime mesófilo ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e termófilo ($55 \pm 2^\circ\text{C}$).

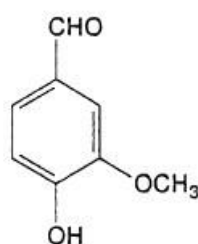


Figura 13 - Estrutura química da vanilina (Walton *et al*, 2003).

3.2.2. Ortovanilina

A ortovanilina (2-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído) é, tal como a vanilina, um composto fenólico natural contendo um grupo OH ligado a um fenol e um grupo aldeído (Figura 14). Ortovanilina e vanilina são isómeros posicionais. No caso da ortovanilina o grupo OH está numa ligação de hidrogénio intramolecular com o grupo aldeído, o que não se observa no caso da vanilina. Assim, os dois isómeros apresentam comportamentos reacionais completamente diferentes. Existem ainda vários estudos que indicam que a ortovanilina induz à ocorrência de mutações génicas e cromossômáticas. No entanto, são ainda necessárias mais pesquisas sobre a reatividade biológica da ortovanilina (Barik *et al*, 2003).

Neste trabalho foi estudada a biodegradação anaeróbia da ortovanilina (500 mg/L) em regime mesófilo ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e termófilo ($55 \pm 2^\circ\text{C}$).

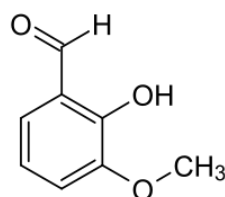


Figura 14 - Estrutura química da ortovanilina (Barik *et al*, 2003).

3.2.3. 4-Clorofenol

Os clorofenóis são compostos tóxicos para os microorganismos anaeróbios, sendo a sua fórmula molecular $C_6H_nCl_mO$ ($1 \leq m \leq 5$ e $1 \leq n \leq 4$). Nestes compostos um ou mais átomos de hidrogénio do anel de benzeno do fenol é substituído por átomos de cloro. No caso do paraclorofenol ou 4 - clorofenol, o hidrogénio da posição 4 (posição *para*) do anel benzénico do fenol é substituído por um átomo de cloro (Figura 15).

A sua elevada hidrofobicidade facilita a adesão destes compostos às membranas bacterianas, interferindo com o gradiente de protões ao longo da membrana e consequentemente ao desequilíbrio homeostático, assim como inibem a atividade enzimática tendo um impacto negativo nas reações metabólicas (Puyol *et al*, 2012).

O 4-clorofenol é um dos compostos fenólicos cloretados com maior toxicidade, sendo assim a sua remoção importante para a proteção ambiental. Existem já processos avançados de oxidação que degradam efetivamente os clorofenóis. Porém, a maioria destes processos requer a utilização de oxidantes dispendiosos (ozono e peróxido de hidrogénio) e elevadas quantidades de energia (luz UV e energia elétrica) (Huang *et al*, 2014).

No entanto, estudos recentes demonstraram que a biodegradação do 4-clorofenol é incrementada na presença de outros co-substratos fenólicos menos tóxicos (Liu *et al*, 2014), podendo assim a biodegradação constituir um método alternativo de degradação deste composto contribuindo para a conservação dos ecossistemas.

Neste trabalho foi estudada a biodegradação anaeróbia do paraclorofenol (100 mg/L) em regime termófilo ($55 \pm 2^\circ\text{C}$).

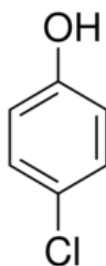


Figura 15 - Estrutura química do 4-clorofenol (Nordin, 2004).

3.3. Inóculo

O inóculo utilizado nos ensaios de biodegradação em condições anaeróbias foi desenvolvido no laboratório em reatores *batch* sem agitação, em regime mesófilo ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e termófilo ($55 \pm 2^\circ\text{C}$). Os reatores foram alimentados de forma descontínua, em intervalos de 48 horas, por substituição da descarga do sobrenadante residual por um volume idêntico de meio de cultura contendo glucose (1,5 g/L) como substrato principal.

Considera-se que a concentração dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) é proporcional ao teor de células microbianas do inóculo. Assim procedeu-se à quantificação da biomassa por determinação dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) seguindo-se os protocolos descritos na literatura sobre o assunto (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Treatment, 22.ª Edição, 2012).

3.4 Parâmetros Analisados

3.4.1. Absorvência

A absorvência foi medida, após a centrifugação das amostras, num espectrofotómetro de Ultra Violeta - Visível Thermo Evolution 260 BIO, no intervalo de comprimentos de onda entre os 200 e 750 nm. As amostras foram previamente diluídas de 1:20 antes de se efetuarem as leituras.

3.4.2. Biogás

Antes de cada recolha, foi medida a quantidade de biogás produzido em cada frasco inoculado através de uma Seringa Hipodérmica Intermutável (NORMAX PORTUGAL) de 10 ml.

3.4.3. Carência Química de Oxigénio

A carência química de oxigénio (CQO) baseia-se na oxidação das amostras, em refluxo fechado, por um excesso conhecido de dicromato de potássio, em ácido sulfúrico concentrado/sulfato de prata, durante duas a duas horas e meia, à temperatura de refluxo do ácido ($148 \pm 2^\circ\text{C}$) num bloco de digestão HACH e/ou Lovibond ($148 \pm 2^\circ\text{C}$). Nestas condições, a matéria orgânica suscetível de oxidação é oxidada a H_2O e CO_2 sendo acompanhada da redução de uma quantidade equivalente de dicromato hexavalente (cor amarela) a crómio trivalente (cor verde). Depois da oxidação, o dicromato restante foi titulado com sulfato ferroso amoniacal (SFA) (titulante) usando-se ferroína como indicador e os equivalentes de oxidante consumidos durante a reação foram expressos em miligramas de oxigénio consumidos por litro

de amostra. Como controlo do método analisaram-se padrões preparados com hidrogenoftalato de potássio (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Treatment, 22.^a Edição, 2012).

3.4.4. pH

O pH é um dos parâmetros mais importantes a monitorizar durante os ensaios de biodegradação anaeróbia pois influencia diretamente a atividade microbiana e o crescimento populacional (Lima e Mota, 2003). Nos ensaios realizados o pH foi monitorizado previamente à recolha de amostras num equipamento 744 pH Meter da Methrom.

3.4.5. Sólidos

A quantificação dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foi realizada de acordo com os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Treatment, 22.^a Edição, 2012.

Os SS foram quantificados através da realização de uma filtração a vácuo de um volume conhecido de amostra, utilizando-se uma membrana filtrante em micro fibra de vidro Whatmann GF/C de 1,2 µm de porosidade. As frações sólidas retidas nas membranas após secagem numa estufa (Bindman) a 104 °C foram utilizadas na quantificação dos SS. Os resíduos secos foram depois calcinados numa mufla (Nabertherm L9/12/B170) a 500°C para quantificação dos SSV. Estas medições foram efetuadas em duplicado.

3.6. Metodologia Experimental

Os ensaios de biodegradação anaeróbia dos substratos fenólicos por populações mistas foram realizados na presença e ausência de co-substratos (glucose e acetato de sódio), em regime mesófilo (37 ± 2°C) e termófilo (50 ± 2°C), para 2-4 replicados.

3.6.1. Preparação do inóculo

Antes da realização dos ensaios de biodegradação, a biomassa utilizada como inóculo foi lavada (duas vezes) com solução tampão de fosfato (4g/L de hidrogenofosfato de sódio Na₂HPO₄ e 0,46 g/L de dihidrogenofosfato de sódio NaH₂PO₄) de modo a remover-se o substrato residual existente. O tampão fosfato de lavagem foi também previamente fervido durante 10 minutos, de forma a remover-se o oxigénio dissolvido. A lavagem foi efetuada à temperatura de incubação das culturas. Entre cada lavagem deixou-se decantar o meio, separou-se o sobrenadante que foi descartado, e a seguir adicionou-se igual volume de solução tampão.

3.6.2. Biodegradação Anaeróbia em Regime Mesófilo

Os ensaios em regime mesófilo da biodegradação anaeróbia da vanilina e ortovanilina foram efetuados em frascos de incubação de cor âmbar de 100 ml de capacidade, colocados num banho (OLS 200 Grant), com agitação de 50 rpm e aclimatizados a uma temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foi preparada uma solução de vanilina (Van) 500 mg/L e de ortovanilina (OVan) 500 mg/L em meio base (Mb), assim como uma solução de acetato de sódio (55 g/L) + glucose (55 g/L) em meio base (solução a+g) conforme descrito na seção 3.1. Estas soluções depois de devidamente aclimatizadas a 37°C , foram adicionadas aos frascos de incubação nas composições indicadas nas Tabelas 7 e 8, perfazendo um volume total de 58 ml em cada frasco.

Tabela 7 - Ensaio Com a Vanilina no Banho

Biomassa	Ensaio	Composição das Soluções
Adaptada à glucose	1 VMB	55 ml solução 500 mg/L Van + 2,5 ml Mb + 0,5 ml solução (a+g)
	2 VMB	55 ml solução 500 mg/L Van + 2 ml Mb + 1 ml solução (a+g)
	3 VMB	55 ml solução 500 mg/L Van + 3 ml solução (a+g)
	4 VMB	55 ml solução 500 mg/L Van + 3 ml Mb
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução (a+g)
	BRANCO	58 ml solução Mb

Tabela 8 - Ensaio Com a Ortovanilina no Banho

Biomassa	Ensaio	Composição das Soluções
Adaptada à vanilina	1 OVMB	55 ml solução 500 mg/L OVan + 2,5 ml Mb + 0,5 ml solução (a+g)
	2 OVMB	55 ml solução 500 mg/L OVan + 2 ml Mb + 1 ml solução (a+g)
	3 OVMB	55 ml solução 500 mg/L OVan + 3 ml solução (a+g)
	4 OVMB	55 ml solução 500 mg/L OVan + 3 ml Mb
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução (a+g)
	BRANCO	58 ml solução Mb

Os ensaios em regime mesófilo foram realizados em duplicado. Cada frasco foi incubado com 10 ml de biomassa mesófila, de forma a obter-se um teor final de SSV entre 2 e 4 g SSV/L.

Os ensaios relativos à biodegradação da vanilina decorreram durante 16 dias, tendo sido recolhidas amostras de 1,5 ml de cada um dos frascos inoculados ao fim de 0,02, 2, 5, 7, 9, 12, 14 e 16 dias. Os ensaios relativos à biodegradação da ortovanilina decorreram durante 52 dias,

tendo sido recolhidas amostras (1,5 ml) ao fim de 0,02, 7, 11, 20, 27, 34 e 52 dias. Antes de cada recolha, mediu-se o valor de pH e, sempre que possível, quantificou-se o biogás produzido.

3.6.2.1. Estudo da Solução de Ortovanilina

Foi realizado um ensaio com a solução da ortovanilina colocando 58 ml desta solução num frasco de incubação de 100 ml de capacidade. O ensaio decorreu no banho (OLS 200 Grant) com a agitação de 50 rpm e aclimatizado a uma temperatura de $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 dias, tendo sido recolhidas amostras de 1,5 ml ao fim de 0,02, 4, 8, 17, 23, 30 e 48 dias.

3.6.3. Biodegradação Anaeróbia em Regime Termófilo

Os ensaios de biodegradação anaeróbia em regime termófilo foram efetuados para a vanilina, a ortovanilina e o 4-clorofenol. Consistiram na incubação de soluções previamente preparadas e aclimatizadas com biomassa anaeróbia termófila, em frascos de cor âmbar de 60 e 100 mL, e aclimatizados a uma temperatura de $50 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para cada ensaio foi preparada uma solução de vanilina 500 mg/L, ortovanilina 500 mg/L ou 4-clorofenol (100 mg/L) em meio base (Mb), assim como uma solução de acetato de sódio (55 g/L) + glucose (55 g/L) em meio base (solução a+g) conforme descrito na seção 3.1.

Relativamente à vanilina, foram realizados dois ensaios simultâneos, ambos em duplicado, nos quais os ensaios em frascos de 100 ml foram incubados num banho (OLS 200 Grant), a 50 rpm, e os de 60 ml num agitador orbital (Aralab Agitorb 200), a 80 rpm. Após 48h, de forma a aproximar a agitação de ambos os equipamentos, procedeu-se à mudança da agitação de 80 rpm para 70 rpm do agitador orbital. Utilizou-se como inóculo biomassa termófila adaptada à glucose.

Para a ortovanilina, foram realizados dois ensaios, ambos em duplicado, em frascos de incubação de 100 ml de capacidade. Num dos ensaios, efetuado no banho (OLS 200 Grant), a 50 rpm, efetuou-se a inoculação com biomassa adaptada à glucose. No outro, efetuado no agitador orbital (Aralab Agitorb 200), a 70 rpm, efetuou-se a inoculação com biomassa adaptada à vanilina.

Os ensaios relativos ao 4-clorofenol, realizados em frascos de 100 ml de capacidade em duplicado, foram efetuados no agitador orbital, a 70 rpm, e inoculados com biomassa adaptada à vanilina. O planeamento seguido nos ensaios está apresentado nas Tabelas 9, 10, 11,12 e 13.

Tabela 9 - Ensaios Com a Vanilina no Banho

Biomassa	Ensaios	Composição das Soluções
Adaptada à glucose	1 VTB	55 ml solução 500 mg/L Van + 2,5 ml Mb + 0,5 ml solução (a+g)
	2 VTB	55 ml solução 500 mg/L Van + 2 ml Mb + 1 ml solução (a+g)
	3 VTB	55 ml solução 500 mg/L Van + 3 ml solução (a+g)
	4 VTB	55 ml solução 500 mg/L Van + 3 ml Mb
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução (a+g)
	BRANCO	58 ml solução Mb

Tabela 10 - Ensaios Com a Vanilina no Agitador Orbital

Biomassa	Ensaios	Composição das Soluções
Adaptada à glucose	1 VTO	27,5 ml solução 500 mg/L Van + 1,25 ml Mb + 0,25 ml solução (a+g)
	2 VTO	27,5 ml solução 500 mg/L Van + 1 ml Mb + 0,5 ml solução (a+g)
	3 VTO	27,5 ml solução 500 mg/L Van + 1,5 ml solução (a+g)
	4 VTO	27,5 ml solução 500 mg/L Van + 1,5 ml Mb
	CONTROLO	27,5 ml solução Mb + 1,5 ml solução (a+g)
	BRANCO	29 ml solução Mb

Tabela 11 - Ensaio Com a Ortovanilina no Agitador Orbital

Biomassa	Ensaios	Composição das Soluções
Adaptada à vanilina	1 OVTO	55 ml solução 500 mg/L OVan + 2,5 ml Mb + 0,5 ml solução (a+g)
	2 OVTO	55 ml solução 500 mg/L OVan + 2 ml Mb + 1 ml solução (a+g)
	3 OVTO	55 ml solução 500 mg/L OVan + 3 ml solução (a+g)
	4 OVTO	55 ml solução 500 mg/L OVan + 3 ml Mb
	5 (OV+V)TO	29 ml solução 500 mg/L OVan + 29 ml solução 500 mg/L Van
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução Van 500 mg/L
	BRANCO	58 ml solução Mb

Tabela 12 - Ensaio Com a Ortovanilina no Banho

Biomassa	Ensaios	Composição das Soluções
Adaptada à glucose	4 OVTB	55 ml solução 500 mg/L OVan + 3 ml Mb
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução (a+g)
	BRANCO	58 ml solução Mb

Tabela 13 - Ensaio Com o 4-clorofenol no Agitador Orbital

Biomassa	Ensaio	Composição das Soluções
Adaptada à vanilina	CFT	58 ml solução 100 mg/L CF
	CONTROLO	55 ml solução Mb + 3 ml solução (a+g)
	BRANCO	58 ml solução Mb

Os frascos de incubação de 100 ml e 60 ml de capacidade foram inoculados com 10 ml e 5 ml de biomassa termófila, respetivamente, de modo a obter-se um teor de SSV entre 2 e 4 g SSV/L.

Em todos os ensaios, antes de cada recolha, mediu-se o valor de pH e, sempre que possível, quantificou-se o biogás produzido.

Os ensaios relativos à vanilina decorreram durante 44 dias, tendo sido recolhidas amostras (1,5 ml) ao fim de 0,02, 2, 7, 9, 14, 16, 21, 27, 31, 37 e 44 dias para o ensaio no banho e 2, 7, 9, 14, 16, 21, 27, 31, 37 e 44 dias para o ensaio no agitador orbital.

Os ensaios com a ortovanilina efetuados no agitador orbital decorreram durante 104 dias, tendo sido recolhidas amostras ao fim de 0,02, 7, 14, 21, 35, 42, 49, 54, 61, 68, 78, 85 e 104 dias. Os ensaios no banho, prolongaram-se por 138 dias, tendo-se recolhido amostras aos 0,02, 7, 22, 28, 37, 51, 68, 89, 96, 103, 113 e 138 dias.

O ensaio relativo ao 4-clorofenol decorreu durante 21 dias. Efetuou-se a amostragem aos 0,02, 7, 14 e 21 dias.

3.6.3.1. Ensaio Abióticos

Os ensaios abióticos foram realizados, em duplicado, para a vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol. Estes consistiram na autoclavagem prévia das soluções, durante 20 minutos, à temperatura de 120.°C. Estas soluções foram depois colocadas em frascos também esterilizados com biomassa previamente autoclavada, numa razão volume de solução/volume de biomassa idêntica à utilizada nos ensaios de biodegradação.

Os ensaios decorreram durante 25 dias. Foram recolhidas amostras aos 4, 11, 18 e 25 dias.

Foi ainda realizado um ensaio com a solução de ortovanilina, colocando 58 ml desta solução, previamente autoclavada, num frasco de incubação de 100 ml de capacidade. O ensaio decorreu no agitador orbital (Aralab Agitorb 200), com a agitação de 70 rpm e aclimatizado a

uma temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 dias, tendo sido recolhidas amostras de 1,5 ml ao fim de 0,02, 3, 14, 24, 41 e 48 dias.

3.6.4 - Tratamento das amostras

Recolheu-se um volume de 1,5 mL em cada amostragem. Após a recolha, as amostras foram centrifugadas numa Microcentrifuga (Sigma P15) durante 10 minutos a uma velocidade 15 000 rpm, separando-se o sobrenadante para novos eppendorffs, sendo o resíduo descartado. O sobrenadante foi depois analisado por espectrofotometria de UV-Visível e quantificada a respetiva CQO. O procedimento experimental para os ensaios em regime mesófilo encontra-se esquematizado na Figura 16.

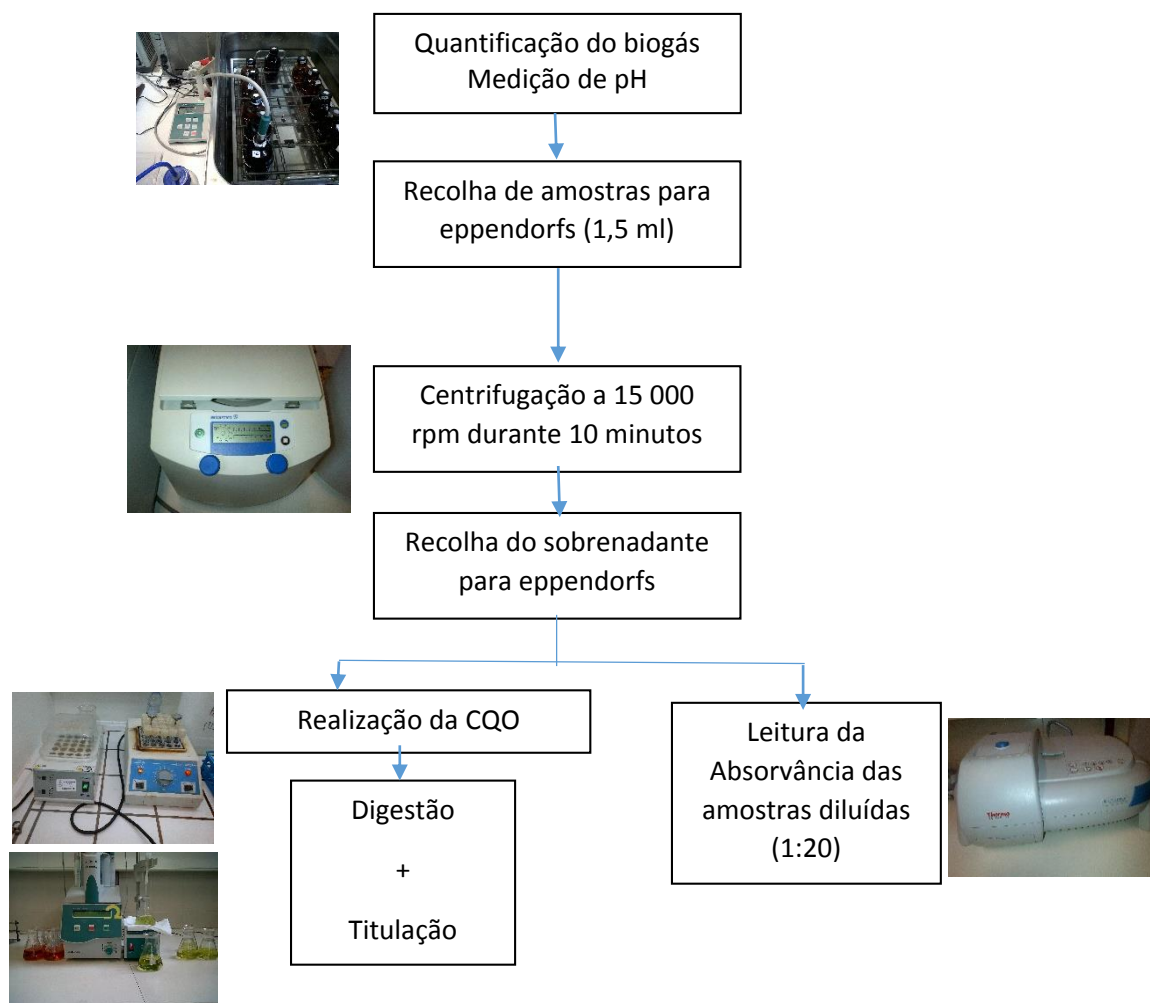


Figura 16 - Representação esquemática do procedimento experimental utilizado no tratamento das amostras recolhidas ao longo dos ensaios.

Capítulo 4 - Análise de Resultados e Discussão

O processo de digestão anaeróbia envolve um ecossistema complexo, com a intervenção de uma comunidade microbiana heterogénea. A contribuição da biotecnologia tem sido inestimável para o aprofundamento do conhecimento dos ecossistemas biológicos e para o aumento da capacidade de controlo e de monitorização da operação dos sistemas de tratamento de efluentes e/ou valorização de resíduos orgânicos, garantindo assim a proteção ambiental.

Neste sentido, os resultados experimentais obtidos nos diferentes ensaios, sistematizados na Tabela 14, foram tratados e analisados com o objetivo de contribuir para o conhecimento da biodegradação dos compostos fenólicos vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol pelos sistemas biológicos anaeróbios em regime mesófilo e termófilo, na presença e ausência de cosubstratos (acetato de sódio e glucose).

Tabela 14 - Ensaios Realizados

Regime	Substrato	Tipo de Biomassa (inóculo)
Mesófilo	Vanilina	Adaptada à glucose
Mesófilo	Ortovanilina	Adaptada à vanilina
Termófilo	Vanilina	Adaptada à glucose
Termófilo	Ortovanilina	Adaptada à vanilina
Termófilo	4-clorofenol	Adaptada à vanilina

4.1. Biodegradação Anaeróbia em Regime Mesófilo

4.1.1. Biodegradação da Vanilina

4.1.1.1. Caracterização da Biomassa

No início dos ensaios procedeu-se à caracterização da biomassa anaeróbia mista, adaptada à glucose, determinando a concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) assim como o respetivo desvio padrão (Tabela 15).

Tabela 15 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ensaio	Biomassa (inóculo)	Sólidos	
		SS (g/L)	SSV (g/L)
Banho	Adaptada à glucose	28,3 ± 0,9 (2)*	17,8 ± 0,4 (2)*

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

4.1.1.2. Ensaio de Biodegradação

O ensaio de biodegradação da vanilina decorreu durante 16 dias no banho (OLS 200 Grant). Após a colheita e tratamento das amostras de cada ensaio foi realizada a respetiva CQO, encontrando-se os resultados obtidos indicados na Tabela 16.

Tabela 16 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais de CQO

Parâmetros Ensaio	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção	Tempo (Dias)
1 VMB	1154 ± 13 (2)*	104 ± 0 (2)*	91 ± 0 (2)*	12
2 VMB	1702 ± 49 (2)*	122 ± 25 (2)*	93 ± 2 (2)*	12
3 VMB	3125 ± 0 (2)*	131 ± 21 (2)*	96 ± 1 (2)*	16
4 VMB	845 ± 0 (2)*	214 ± 24 (2)*	75 ± 3 (2)*	7
Solução Controlo (acetato de sódio + glucose)	2488 ± 82 (2)*	203 ± 40 (2)*	92 ± 1 (2)*	14

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

Analisando os dados da Tabela 16, pode verificar-se que a taxa de remoção da CQO foi muito elevada nos ensaios 1 VMB, 2 VMB e 3 VMB. Mesmo no ensaio 4 VMB, que ocorre na ausência de cosubstratos, a taxa de remoção de CQO foi elevada, ocorrendo 75% de remoção da CQO em apenas 7 dias. Os gráficos a) e b) da Figura 17 representam respetivamente a evolução média da CQO e do pH nos diferentes ensaios.

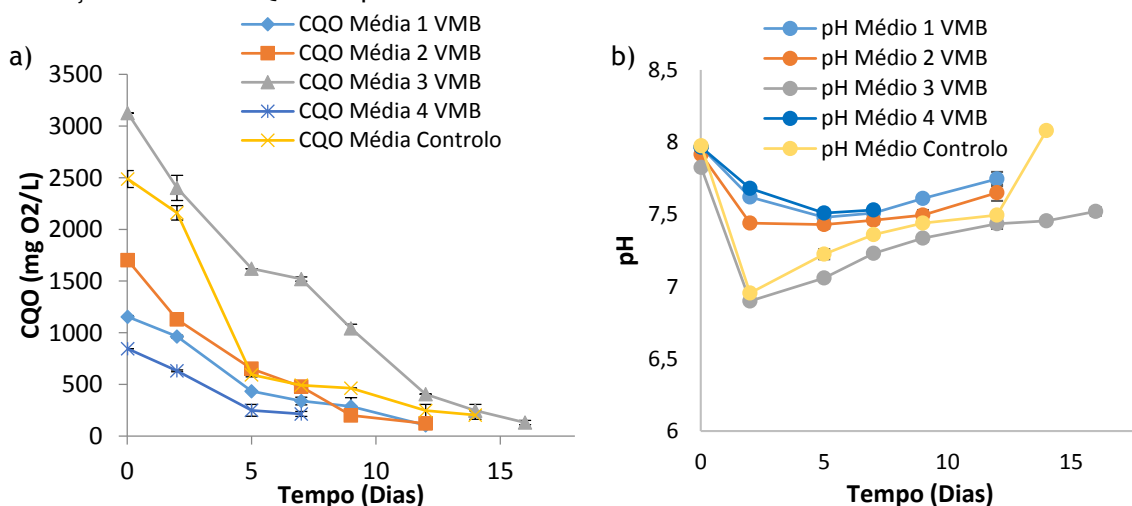


Figura 17 - a) Análise comparativa da evolução da CQO média dos ensaios de biodegradação da vanilina ao longo do tempo (dias), em regime mesófilo. b) Evolução comparativa do pH nos ensaios de biodegradação da vanilina.

Da análise do gráfico a) da Figura 17 pode verificar-se que a CQO diminuiu em todos os ensaios, sendo esta diminuição mais acentuada para os ensaios 3 VMB e controlo, relativamente aos restantes ensaios em que a diminuição da CQO não é tão brusca. Este facto deve-se à presença de um maior teor de cosubstratos facilmente biodegradáveis (acetato de sódio e glucose), o que faz com que as populações microbianas os utilizem inicialmente como fonte de carbono e energia em detrimento da vanilina, que é um substrato mais complexo e de mais difícil biodegradação (Ferreira e Sousa, 1998; Parshina *et al*, 2000; Veeresh *et al*, 2005). As fontes de energia rapidamente metabolizáveis reprimem a formação de enzimas necessárias ao catabolismo dos substratos energéticos mais dificilmente utilizáveis, fenómeno designado de repressão catabólica (Ferreira e Sousa, 1998). Esta biodegradação inicial dos cosubstratos nos ensaios 3 VMB e controlo conduz a uma diminuição mais acentuada do pH relativamente aos restantes ensaios, em que a concentração de cosubstratos é menor ou nula (Figura 17 b). No entanto, entre os dias 5 e 7 a variação da CQO para o ensaio 3 VMB foi pouco significativa o que pode estar associado a uma nova fase *lag* (fase de latência) devido ao esgotamento dos cosubstratos no meio e à necessidade de adaptação (aclimatização) das populações bacterianas em degradarem substratos alternativos presentes no meio (vanilina), através da produção de novas enzimas específicas capazes de degradarem a vanilina utilizando-a como fonte de carbono e que beneficiam o crescimento celular, pois a partir do sétimo dia os valores de CQO para este ensaio voltam a diminuir acentuadamente (Chen *et al*, 2008; Ferreira e Sousa, 1998; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005).

Também no ensaio 2 VMB (que a seguir ao ensaio 3 VMB é o que apresenta maior teor de cosubstratos) se verificou uma diminuição da CQO e do pH mais acentuada na fase inicial do ensaio, sendo esta diminuição gradual a partir do segundo dia. Esta diminuição inicial mais acentuada da CQO e do pH pode estar também associada ao consumo inicial de cosubstratos, mais facilmente biodegradáveis, nos primeiros dois dias do ensaio. Após esgotamento dos cosubstratos as populações microbianas degradam a vanilina como substrato alternativo traduzida pela diminuição progressiva da CQO.

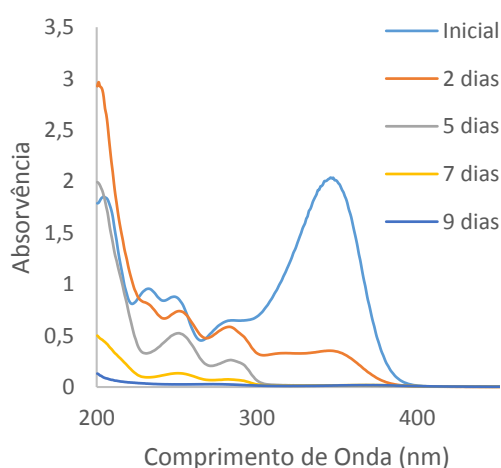
No ensaio 1 VMB, com a menor concentração de cosubstratos, verificou-se uma diminuição inicial da CQO menos acentuada relativamente aos ensaios 2 VMB e 3 VMB, assim como uma diminuição menos acentuada do pH. Este facto pode estar associado ao rápido esgotamento de cosubstratos, uma vez que a sua concentração no meio é muito baixa. A necessidade de utilização de uma fonte de carbono alternativa, leva à adaptação das populações bacterianas à degradação da vanilina como substrato, através da produção de enzimas específicas, pois a partir do segundo dia a diminuição da CQO para este ensaio foi mais acentuada.

Na ausência de cosubtratos as bactérias têm a necessidade de se adaptar à degradação/consumo dos substratos alternativos presentes no meio, como forma de sobrevivência. O ensaio 4 VMB demonstra que as populações bacterianas anaeróbias têm capacidade de degradar a vanilina pois, na ausência de cosubstratos, verificou-se a diminuição

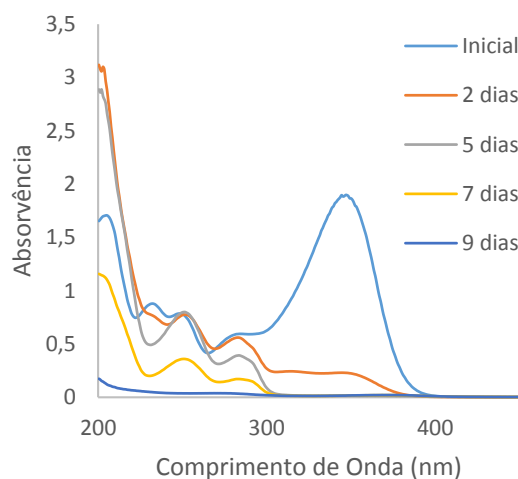
gradual da CQO e do pH. Este facto sugere que, ainda que a vanilina seja um composto fenólico tóxico para alguns microorganismos, as bactérias anaeróbias têm a capacidade de se adaptar à sua presença adotando vias metabólicas alternativas para a sua degradação e utilização como fonte alternativa de carbono conseguindo reproduzir-se e sobreviver (Fang *et al*, 2006; Leven *et al*, 2012; Leven e Schnurer, 2005; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005). Além disso, o facto de serem culturas anaeróbias mistas, em que existe maior diversidade e variabilidade populacional, incrementa a taxa de adaptação e conseqüentemente a taxa de sobrevivência das populações microbianas (Leven *et al*, 2012; Leven e Schnurer, 2005; Monlau *et al*, 2014).

Além da diminuição da CQO ao longo do tempo, verificou-se também a diminuição da absorvência em todos os ensaios. Os gráficos da Figura 18, seguidamente representados, mostram a evolução da absorvência em cada um dos ensaios.

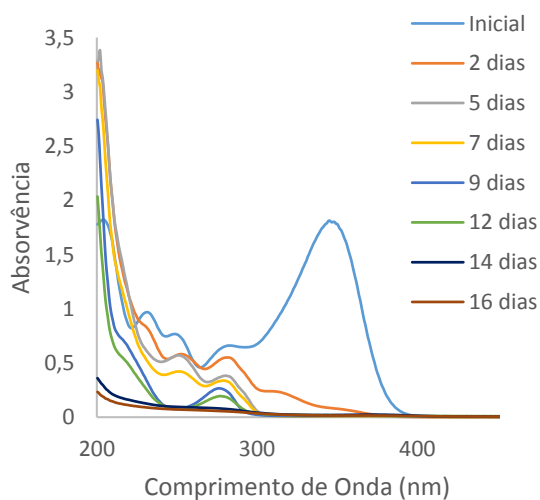
a) 1 VMB



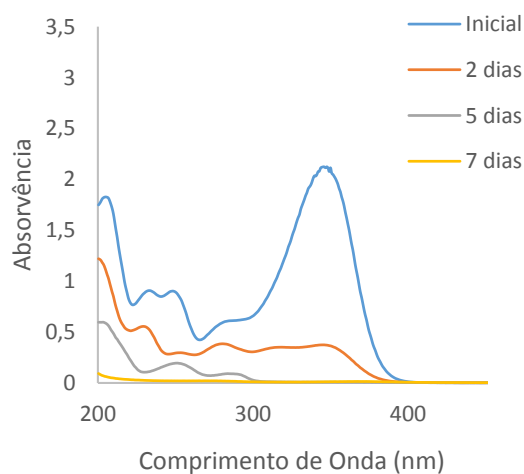
b) 2 VMB



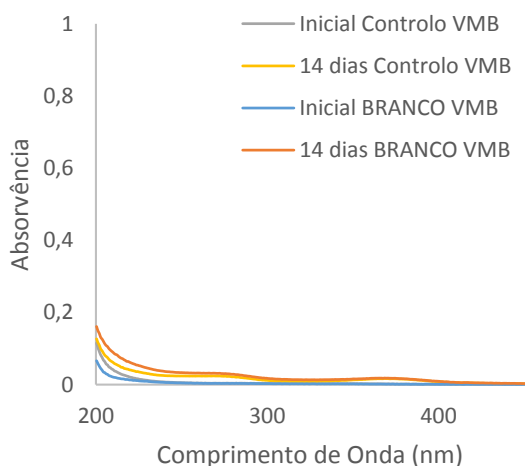
c) 3 VMB



d) 4 VMB



e) CONTROLO e BRANCO



f) 4 VMB e BRANCO

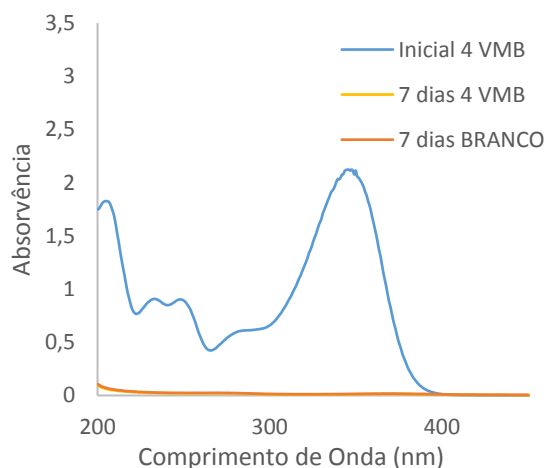


Figura 18 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da vanilina em regime mesófilo: a) 1 VMB b) 2 VMB c) 3 VMB d) 4 VMB e) CONTROLO (glucose e acetato de sódio) e BRANCO f) 4 VMB e BRANCO.

Da análise dos gráficos da Figura 18 pode-se verificar que a absorvência, tal como a CQO, diminui para todos os ensaios, aproximando-se no final dos ensaios de valores próximos de zero, o que traduz a biodegradação da vanilina em todos os ensaios.

Da comparação dos diferentes espectros de absorvência dos ensaios pode-se verificar que a biodegradação da vanilina foi mais rápida para o ensaio 4 VMB, ocorrendo a completa degradação da vanilina em 7 dias, traduzida pela diminuição mais rápida dos valores da absorvência relativamente aos restantes ensaios. A diminuição mais rápida da absorvência pode ser explicada pela ausência de cosubstratos no meio, o que conduz à seleção de populações bacterianas da cultura anaeróbia mista capazes de se adaptar à presença da vanilina através da adoção de vias bioquímicas de degradação deste composto, tornando possível a sua utilização como fonte de carbono.

O ensaio 3 VMB, com um teor de cosubstratos mais elevado, foi o que apresentou uma diminuição mais lenta da absorvência relativamente aos restantes ensaios, pois só ao fim de 16 dias do início do ensaio a absorvência apresenta valores próximos de zero.

Os gráficos da Figura 19 relacionam a evolução, ao longo do tempo (dias), da CQO com a absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm nos diferentes ensaios de biodegradação da vanilina em regime mesófilo. A absorvência a 280 nm foi seguida para observar de forma mais específica a degradação da vanilina. A absorvência a 254 nm é considerada genérica na monitorização da degradação de compostos orgânicos (Karmakar *et al*, 2000).

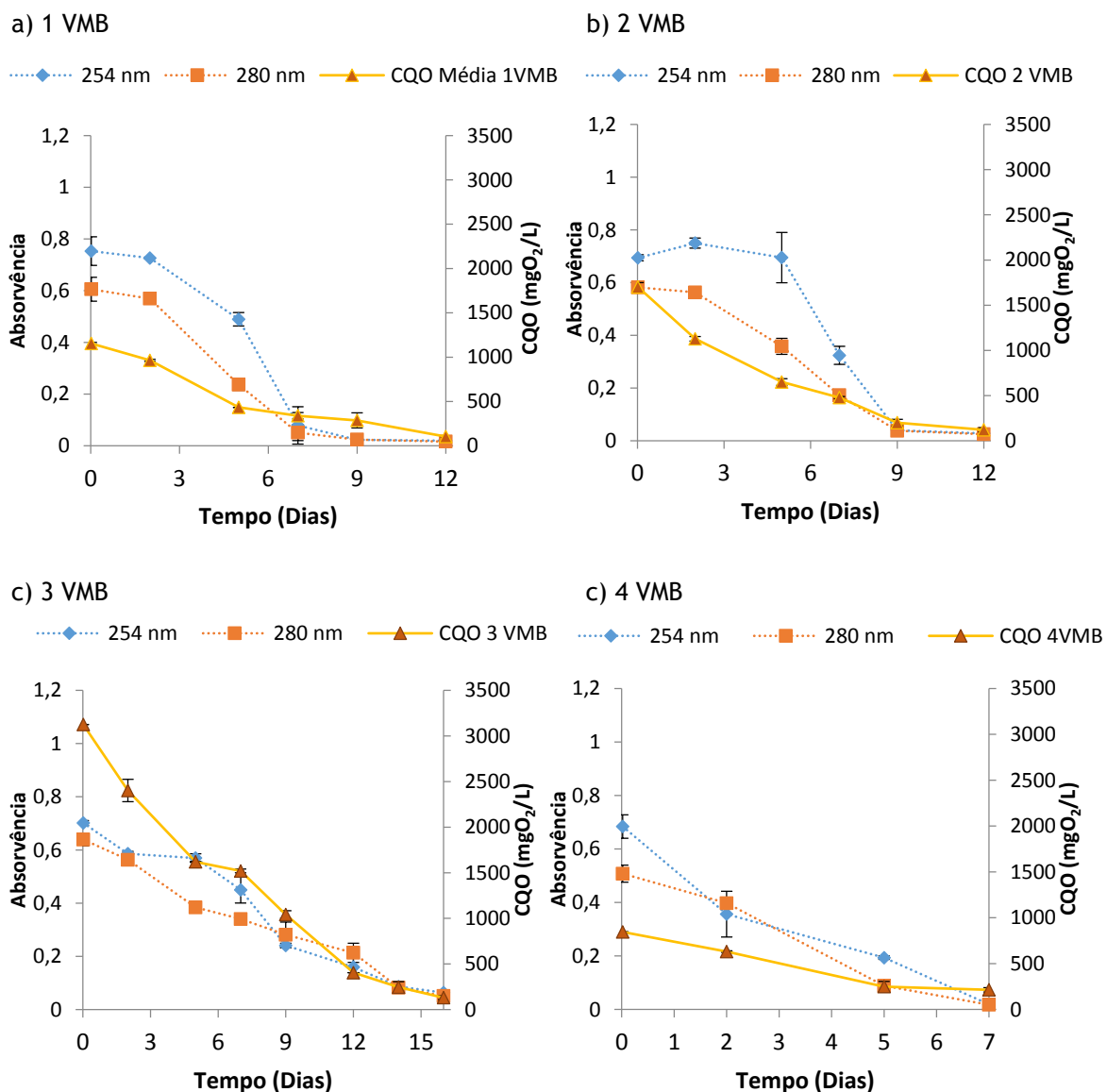


Figura 19 - Evolução da CQO média e absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm ao longo do tempo (dias) nos ensaios de biodegradação anaeróbia da vanilina em regime mesófilo: a) 1 VMB b) 2 VMB c) 3 VMB d) 4 VMB.

Da análise dos gráficos da Figura 19 verifica-se que a diminuição da absorvência acompanha a diminuição da CQO em todos os ensaios, sendo o perfil de evolução da absorvência para o comprimento de onda de 280 nm o que mais se aproxima, no geral, ao perfil de evolução da CQO.

A diminuição da absorvência para estes comprimentos de onda traduz a degradação do anel aromático da vanilina e conseqüentemente a sua biodegradação. Embora a vanilina seja um composto fenólico tóxico para muitas populações microbianas o facto de ser utilizada biomassa anaeróbia mista, com maior diversidade bacteriana, possibilitou a seleção de populações que na ausência ou esgotamento de cosubstratos, adotaram vias metabólicas que possibilitaram a degradação da vanilina e a sua utilização como fonte de carbono, permitindo

assim a adaptação e sobrevivência do ecossistema microbiano. Alguns estudos sobre a degradação de compostos fenólicos indicam que o benzoato constitui um dos intermediários chave da degradação de compostos fenólicos durante a digestão anaeróbia em regime mesófilo. Este é depois convertido em acetato e H_2/CO_2 . As populações bacterianas metanogénicas convertem depois o acetato e H_2/CO_2 em metano (Fang *et al*, 2006; Hoyos - Hernandez *et al*, 2013; Leven *et al*, 2012; Leven e Schnurer, 2005; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005).

No entanto, durante a realização dos ensaios não foi possível quantificar o biogás produzido (cumulativo) a partir da biodegradação da vanilina devido à ocorrência de eventuais fugas causadas por um aperto deficiente das tampas dos frascos onde decorreram os ensaios.

Apesar de não terem sido efetuados testes abióticos à solução de vanilina, em regime mesófilo, observou-se que a esta temperatura a solução era bastante estável, permanecendo sempre clara não se visualizando qualquer alteração da sua cor ou formação de agregados.

4.1.2. Biodegradação da Ortovanilina

4.1.2.1. Caracterização da Biomassa

No início dos ensaios procedeu-se à caracterização da biomassa anaeróbia mista, adaptada à vanilina, determinando a concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Tabela 17).

Tabela 17 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e dos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ensaio	Biomassa (inóculo)	Sólidos	
		SS (g/L)	SSV (g/L)
Banho	Adaptada à vanilina	22,8 ± 0,4 (2)*	16,6 ± 0,3 (2)*

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

4.1.2.2. Ensaio de Biodegradação

O ensaio de bioeliminação (biodegradação) da ortovanilina decorreu durante 52 dias no banho. Seguidamente à recolha e tratamento das amostras de cada ensaio foi realizada a respetiva CQO (Tabela 18). A utilização do termo bioeliminação implica, para além de biodegradação, outros mecanismos de remoção que eventualmente ocorram no meio. Nestes ensaios observou-se a formação de alguns agregados associados à alteração de cor. Estas alterações foram atenuadas na presença de biomassa e cosubstratos.

Tabela 18 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais de CQO

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção	Tempo (Dias)
1 OVMB		1250 ± 0 (2)*	199 ± 13 (2)*	84 ± 1 (2)*	34
2 OVMB		1650 ± 25 (2)*	210 ± 14 (2)*	87 ± 1 (2)*	34
3 OVMB		3327 ± 41 (2)*	199 ± 12 (2)*	94 ± 0 (2)*	34
4 OVMB		787 ± 17 (2)*	139 ± 0 (2)*	82 ± 0 (2)*	52
Solução Controlo (acetato de sódio + glucose)		2561 ± 21 (2)*	243 ± 50 (2)*	91 ± 2 (2)*	27

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

Analisando os dados da Tabela 18 verificou-se que o facto de se ter utilizado biomassa anaeróbia mista adaptada previamente à vanilina incrementou a taxa de remoção de CQO, sendo esta bastante elevada em todos os ensaios, mesmo no ensaio 4 OVMB que decorre na ausência de cosubstratos, o que significa que o facto de as populações microbianas estarem previamente adaptadas a um composto fenólico, como a vanilina, induz à adaptação dos ecossistemas microbianos à presença ortovanilina, o seu isómero posicional. Estudos recentes demonstraram que o nível de inibição de compostos fenólicos é dependente dos níveis de exposição dos ecossistemas microbianos a este tipo de compostos estando fortemente dependente da sua adaptação inicial. (Chen *et al*, 2008; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005)

Os gráficos a) e b) da Figura 20 representam a evolução média da CQO e do pH nos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias).

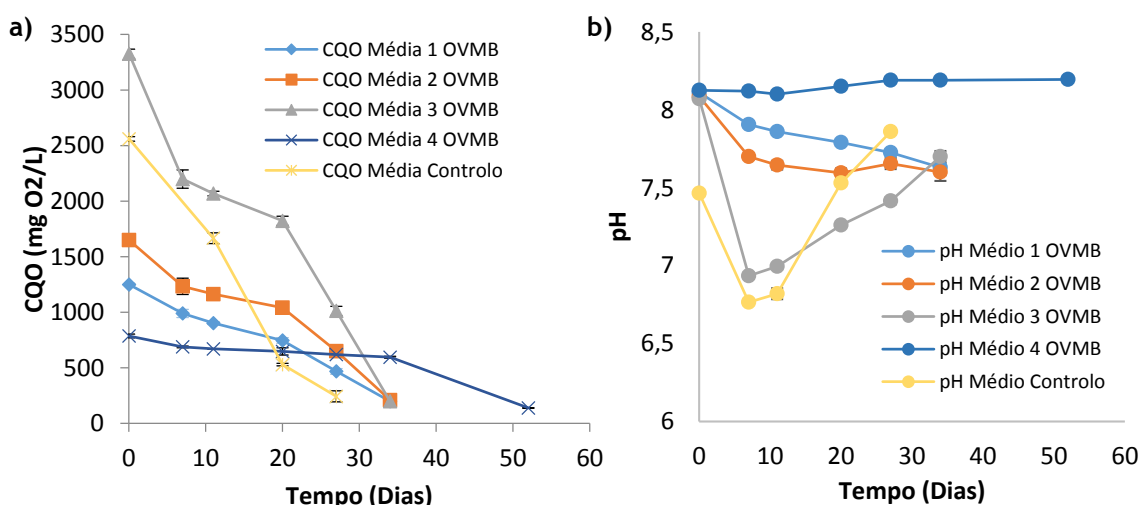


Figura 20 - a) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da ortovanilina em regime mesófilo. b) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios de biodegradação da ortovanilina.

Da análise do gráfico a) da Figura 20 pode-se verificar que ocorre a degradação da ortovanilina pelas populações microbianas, verificando-se a diminuição da CQO em todos os ensaios, sendo o valor de CQO final bastante baixo e próximo nos vários ensaios.

Verificou-se também que a bioeliminação (biodegradação) da ortovanilina é acelerada claramente pela presença de cosubstratos, constatando-se uma diminuição muito mais acentuada dos valores de CQO e de pH no ensaio 3 OVMB relativamente aos ensaios 1 OVMB, 2 OVMB e 4 OVMB (Figura 20b). O facto de as populações microbianas disporem de maior concentração de cosubstratos permite o aumento do número de células o que se traduz na remoção da CQO mais eficiente e numa diminuição mais acentuada do pH.

Comparando os ensaios 1 OVMB, 2 OVMB e 3 OVMB verificou-se ainda que a CQO apresentou a partir do dia 7 após o início dos ensaios, uma diminuição menos acentuada nos três ensaios, o que indica um período de adaptação das populações microbianas à degradação da ortovanilina como substrato alternativo em consequência do esgotamento ou diminuição da disponibilidade de cosubstratos no meio. Só após 20 dias do início dos ensaios se verificou novamente uma diminuição acentuada da CQO nos três ensaios, sendo esta mais evidente no ensaio 3 OVMB.

A ausência de cosubstratos no ensaio 4 OVMB fez aumentar a fase *lag* (fase de latência) das populações microbianas. No entanto, após o período de adaptação inicial das populações microbianas à presença da ortovanilina, ocorre a sua degradação o que se traduz pela diminuição acentuada da CQO após 34 dias do início do ensaio.

Comparativamente com a degradação da vanilina em regime mesófilo, a degradação da ortovanilina em mesófilo é mais lenta, sendo os períodos de adaptação das populações microbianas também maiores. Este facto pode dever-se à estrutura da ortovanilina, que por apresentar o grupo OH numa ponte de hidrogénio intramolecular com o grupo aldeído, faz com que a molécula seja mais estável e resistente à biodegradação (Barik *et al*, 2003).

Além da diminuição da CQO ao longo do tempo, verificou-se igualmente a diminuição da absorvência em todos os ensaios. Os gráficos da Figura 21 mostram a evolução dos espectros UV - Visível da absorvência em cada um dos ensaios da biodegradação da ortovanilina ao longo do tempo (dias).

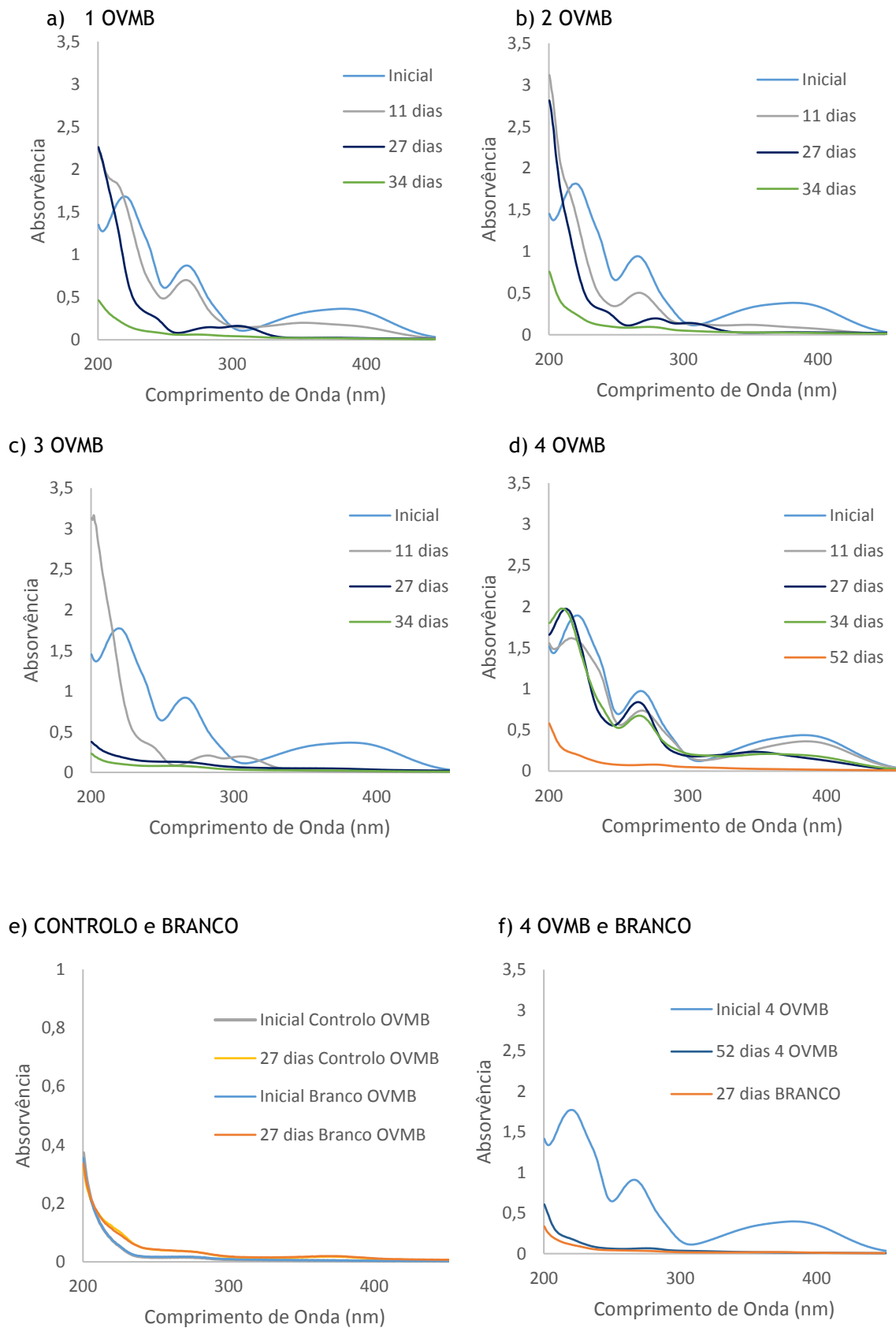
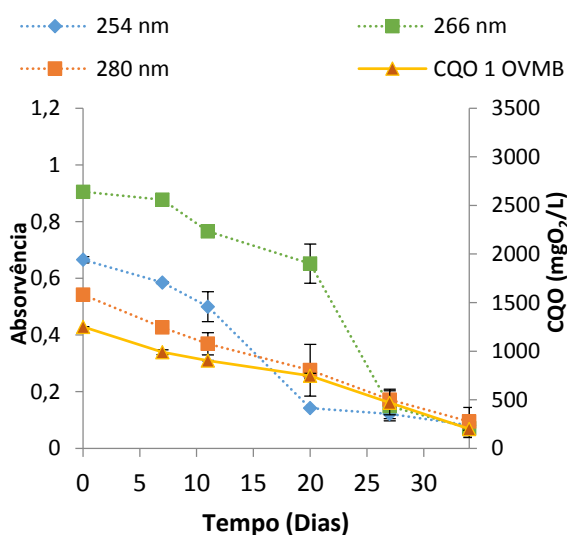


Figura 21 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime mesófilo: a) 1 OVMB b) 2 OVMB c) 3 OVMB d) 4 OVMB e) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO f) 4 OVMB e BRANCO.

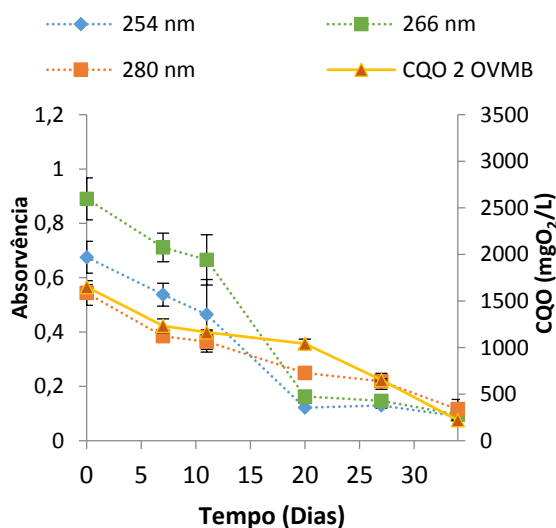
Da análise dos gráficos da Figura 21 pode-se verificar que ocorre a diminuição da absorvência em todos os ensaios, sendo esta diminuição mais acentuada no ensaio 3 OVMB que apresenta uma maior concentração de cosubstratos. Assim, pode inferir-se que a biodegradação da ortovanilina é acentuada pela presença de cosubstratos no meio, tal como se verificou para a taxa de remoção de CQO. Por exemplo, após 27 dias do início dos ensaios a absorvência do ensaio 3 OVMB é já muito baixa, sendo o seu valor próximo de zero. Para o mesmo período de tempo os restantes ensaios apresentam valores superiores de absorvência apresentando uma diminuição mais lenta que traduz uma biodegradação mais lenta da ortovanilina. Esta degradação é ainda mais lenta no ensaio 4 OVMB que decorre na ausência de cosubstratos. Assim, a presença de uma maior concentração de cosubstratos parece induzir à biodegradação mais eficiente e rápida da ortovanilina, pois permite a multiplicação de um maior número de células e consequentemente uma maior taxa de biodegradação.

Os gráficos da Figura 22 relacionam a evolução, ao longo do tempo (dias), da CQO com a absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm nos diferentes ensaios da biodegradação anaeróbia da ortovanilina. A absorvência a 266 nm foi seguida para observar especificamente a degradação da ortovanilina. As absorvências a 280 nm e 254 nm complementam a análise de degradação de compostos aromáticos (Karmakar *et al*, 2000).

a) 1 OVMB



b) 2 OVMB



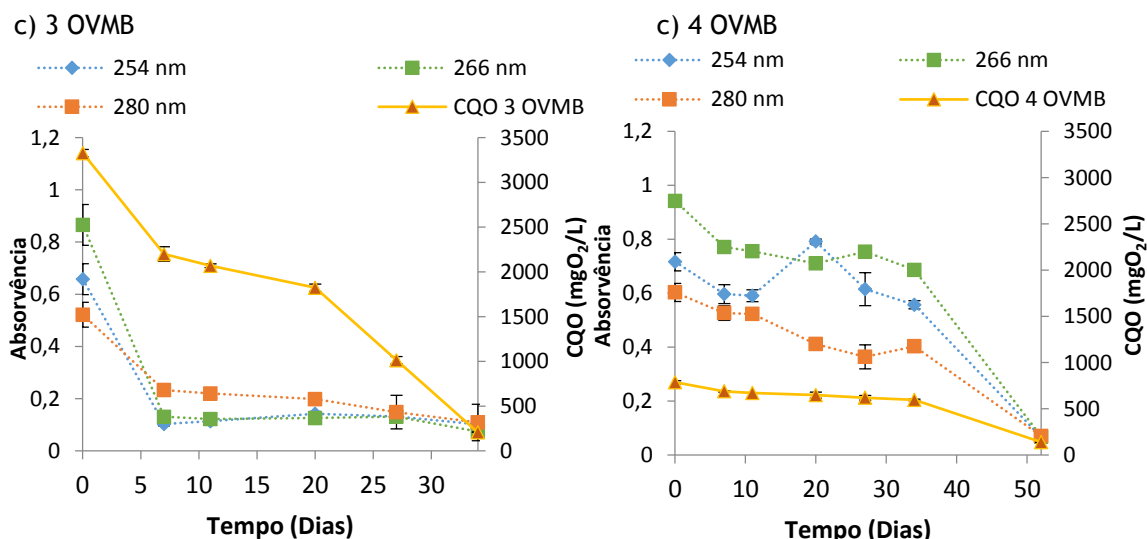


Figura 22 - Evolução da CQO média e absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm ao longo do tempo (dias) nos ensaios de biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime mesófilo: a) 1 OVMB b) 2 OVMB c) 3 OVMB d) 4 OVMB.

Pode verificar-se que a diminuição da absorvência acompanha a diminuição da CQO em todos os ensaios, sendo os perfis de evolução da absorvência para os comprimentos de onda de 266 nm e 280 nm os que mais se assemelham ao perfil de evolução da CQO. A diminuição da absorvência para estes comprimentos sugere a degradação do anel aromático da ortovanilina, e consequentemente a sua biodegradação.

O facto de ser utilizada biomassa anaeróbia mista previamente adaptada à vanilina (este último também um composto fenólico e isómero posicional da ortovanilina), possibilitou a seleção de populações microbianas mais resistentes e adaptadas à presença de compostos fenólicos (aclimatização) diminuindo assim o efeito inibitório da ortovanilina e o incremento da sua taxa de biodegradação. Isto traduz-se numa diminuição da CQO e absorvência num período de tempo mais curto, relativamente a ensaios de biodegradação da ortovanilina com populações anaeróbias mistas não adaptadas a compostos fenólicos (Chen *et al*, 2008; Guilherme, 2012; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005).

Além disso, a biodegradação da ortovanilina é ainda incrementada se ao meio forem adicionados elevados teores de glucose e acetato de sódio como cosubstratos, possibilitando o aumento do número de células microbianas e consequentemente aumento da taxa de biodegradação.

4.1.2.3. Estudo da Solução de Ortovanilina

O gráfico da Figura 23 representa a evolução da absorvência da solução de ortovanilina, em mesófilo, comparativamente ao ensaio biótico efetuado com ortovanilina como substrato único em mesófilo (4 OVMB).

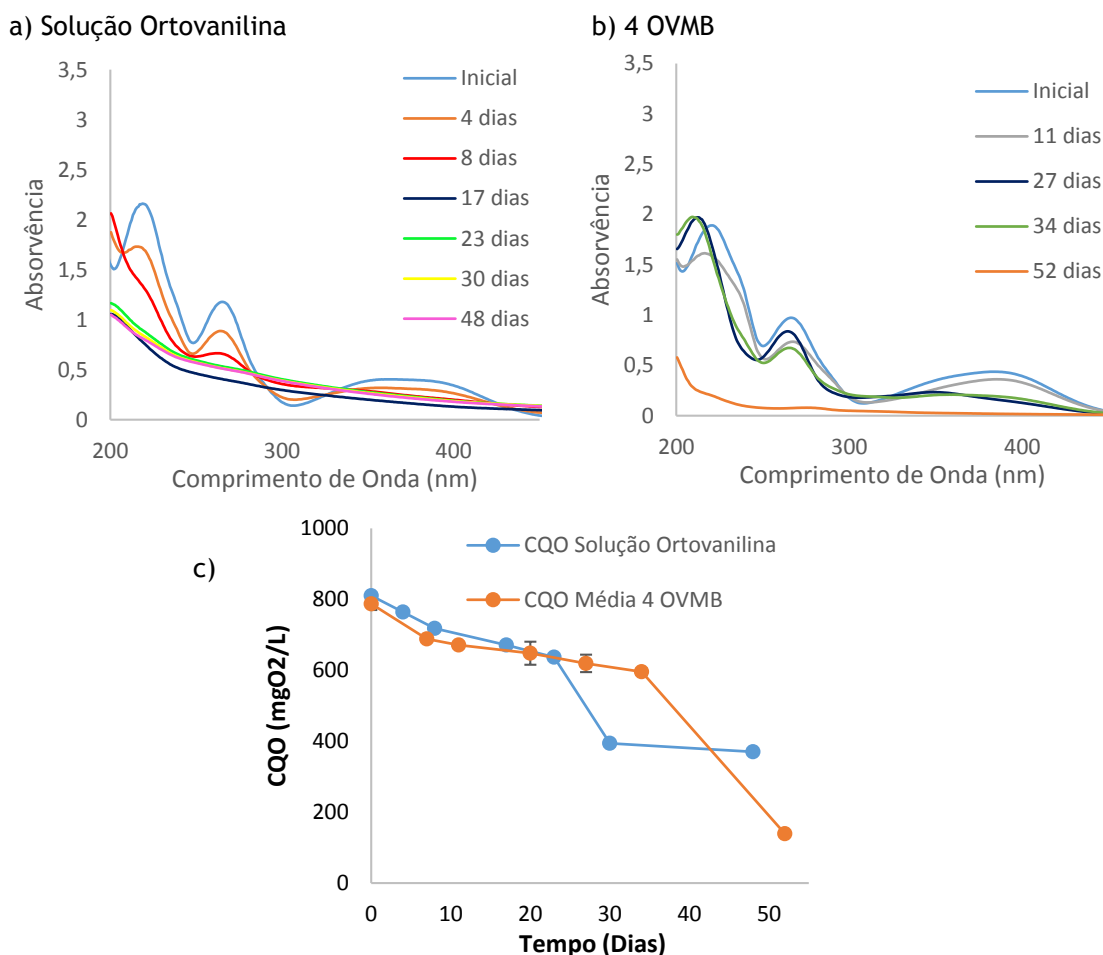


Figura 23 - a) Evolução da absorvência da solução de ortovanilina em mesófilo. b) Ensaio 4 OVMB. c) Evolução da CQO da solução de ortovanilina e do ensaio biótico 4 OVMB.

Em mesófilo observou-se a mudança de cor da solução de ortovanilina de amarelo para castanho, assim como a formação de agregados na solução. No entanto, estas alterações eram atenuadas na presença de biomassa e cosubstratos, sendo pouco significativas nos ensaios bióticos. A formação de agregados e a sua sedimentação e centrifugação pode ter conduzido à diminuição da absorvência e CQO da solução de ortovanilina (Figura 23 c). A evolução da CQO também sugere a ocorrência da alteração da estrutura molecular na presença de biomassa, seguida de biodegradação, sendo os valores de CQO média no ensaio 4 OVMB de 139 mg O₂/L no final de 52 dias. Além disso, quando a evolução dos espectros da absorvência da solução de ortovanilina é comparada com a evolução dos espectros do ensaio biótico 4 OVMB observa-se um perfil de evolução ligeiramente diferente nos dois ensaios, sendo a absorvência obtida neste último ensaio mais baixa, o que sugere a biodegradação da ortovanilina.

4.2. Biodegradação Anaeróbia em Regime Termófilo

4.2.1. Biodegradação da Vanilina

4.2.1.1. Caracterização da Biomassa

No início dos ensaios procedeu-se à caracterização da biomassa anaeróbia mista, adaptada à glucose, determinando a concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Tabela 19).

Tabela 19 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ensaio	Biomassa (inóculo)	Sólidos	
		SS (g/L)	SSV (g/L)
Banho + Agitador Orbital	Adaptada à glucose	29,9 ± 0,5 (2)*	18,9 ± 0,1 (2)*

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

4.2.1.2. Ensaio de Biodegradação

O ensaio de biodegradação da vanilina em termófilo decorreu simultaneamente no banho, a 50 rpm, e no agitador orbital a 80 rpm nas primeiras 48 horas, tendo-se a partir desta altura alterado a agitação para 70 rpm. O ensaio no banho teve a duração de 37 dias e o do agitador orbital 44 dias. Seguidamente à recolha e tratamento das amostras de cada ensaio foi realizada a respetiva CQO encontrando-se os resultados indicados na Tabela 20.

Tabela 20 - Valores Médios e Desvio Padrão Iniciais e Finais da CQO

A) Banho

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	%Remoção CQO	Tempo (Dias)
1	VTB	1137 ± 13 (2)*	391 ± 12 (2)*	66 ± 1	27
2	VTB	1753 ± 74 (2)*	455 ± 29 (2)*	74 ± 1	37
3	VTB	3226 ± 21 (2)*	809 ± 66 (2)*	75 ± 2	37
4	VTB	741 ± 0 (2)*	272 ± 9 (2)*	63 ± 1	27
	Solução Controlo (acetato de sódio e glucose)	2546 (1)*	376 (1)*	85 ± 1	37

* Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

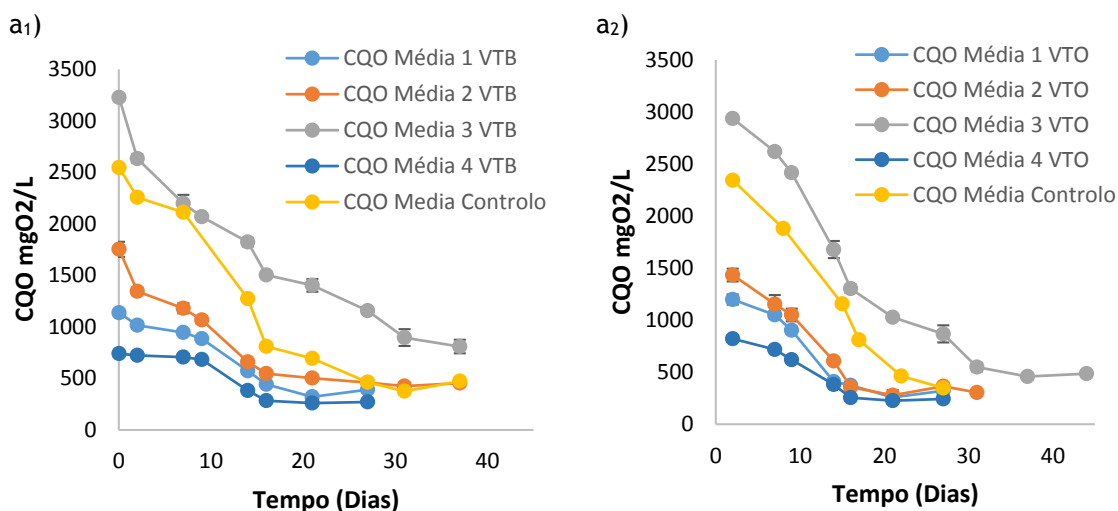
B) Agitador Orbital

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção CQO	Tempo (Dias)
1 VTO		1198 ± 50 (2)*	321 ± 13 (2)*	73 ± 2	27
2 VTO		1433 ± 62 (2)*	304 ± 13 (2)*	79 ± 2	31
3 VTO		2937 ± 21 (2)*	486 ± 0 (2)*	83 ± 0	44
4 VTO		822 ± 16 (2)*	244 ± 16 (2)*	70 ± 1	27
Solução Controlo (acetato de sódio e glucose)		2344 (1)*	347 (1)*	85 ± 0	27

* Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

Da análise de ambas as Tabelas 20 A e B pode constatar-se que, embora tenha havido alguma variação nos dois ensaios, os resultados são bastante similares. Pode-se verificar que em regime termófilo a vanilina também é degradada pelas populações anaeróbias microbianas, ainda que as taxas de remoção da CQO sejam mais baixas relativamente à biodegradação em mesófilo. Mesmo no ensaio 4 VTB e 4 VTO, que decorrem na ausência de cosubstratos, as bactérias demonstram capacidade de adaptação à presença da vanilina, utilizando-a como fonte de carbono, traduzida numa taxa de remoção da CQO de 63% e 70% respetivamente ao fim de 27 dias.

A evolução média da CQO, ao longo do tempo (dias), nos ensaios de biodegradação da vanilina em termófilo está indicada na Figura 24.



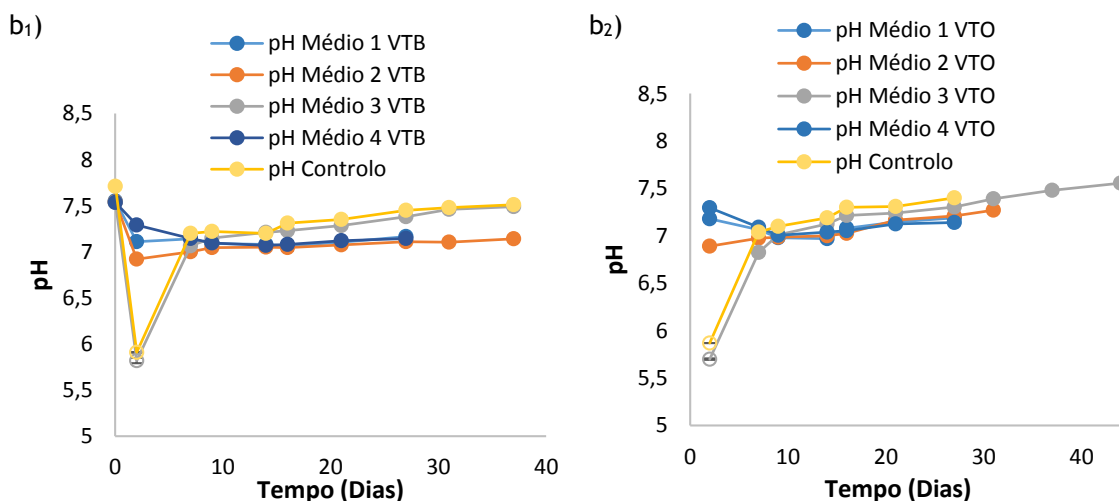


Figura 24 - a₁) e a₂) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da vanilina em regime termófilo no banho e agitador orbital respetivamente. b₁) e b₂) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios de biodegradação da vanilina no banho e agitador orbital respetivamente.

Da análise dos gráficos a₁) da Figura 24 pode-se verificar que a CQO diminui até ao segundo dia após o início do ensaio de uma forma mais acentuada para os ensaios 1 VTB, 2 VTB, 3 VTB e controlo, sendo esta diminuição mais significativa para o ensaio 3 VTB e controlo devido à presença de um maior teor de cosubstratos, o que possibilita um maior consumo dos mesmos e assim uma maior diminuição do valor de CQO (Ferreira e Sousa, 1998). A diminuição mais acentuada da CQO nestes ensaios conduziu também a uma diminuição mais brusca do pH do meio (Figura 24 b₁) relativamente aos restantes ensaios, pelo que foi adicionado hidróxido de cálcio, hidrogenofosfato de sódio e dihidrogenofosfato de sódio aos ensaios 3 VTB e controlo, de forma a neutralizar a acidez e garantir que as populações microbianas não eram inibidas. A partir do segundo dia do ensaio a diminuição da CQO, ainda que evidente nos ensaios 1 VTB, 2 VTB e 3 VTB é menos acentuada o que pode indicar a adaptação das populações bacterianas à presença da vanilina e à seleção das estirpes microbianas capazes de adotar vias metabólicas para a utilização da vanilina como substrato alternativo (aclimatização), em consequência do esgotamento ou diminuição do teor de cosubstratos, o que conduz à diminuição progressiva da CQO (Chen *et al*, 2008; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005).

No ensaio 4 VTB verifica-se uma diminuição inicial pouco significativa da CQO do ensaio. Este facto deve-se à ausência de cosubstratos o que induz ao aumento da fase *lag* das populações bacterianas e à adoção de vias metabólicas de degradação da vanilina, através da expressão de genes que ao serem transcritos conduzem à produção de enzimas específicas para a degradação destes compostos de baixo peso molecular (Ferreira e Sousa, 1998; Lima e Mota, 2003). A adaptação das populações microbianas conduz entretanto à degradação da vanilina

verificando-se a diminuição da CQO neste ensaio num período de tempo mais curto relativamente aos restantes ensaios.

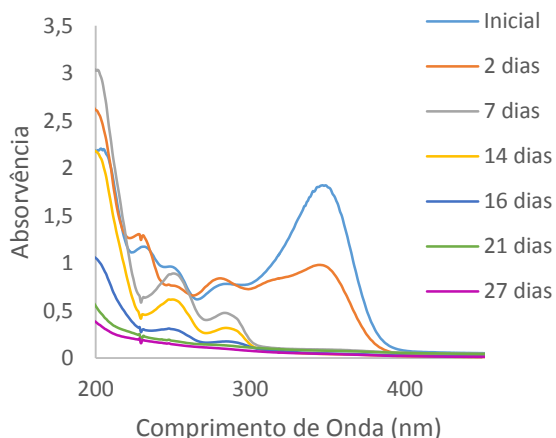
Relativamente aos ensaios efetuados no agitador orbital, embora não tenham sido recolhidas amostras para o tempo de 0,02 dias (inicial) pode verificar-se que a diminuição mais significativa da CQO (Figura 24 a₂) ocorreu para o ensaio 3 VTO e controlo, que apresentavam uma maior carga orgânica inicial, seguindo-se os ensaios 2 VTO e 1 VTO.

Também nos ensaios 3 VTO e controlo se verificou, tal como no banho, uma diminuição mais acentuada do pH (Figura 24 b₂), devido ao consumo de um maior teor de cosubstratos, pelo que foi adicionado hidróxido de cálcio, hidrogenofosfato de sódio e dihidrogeniofosfato de sódio ao meio para garantir a recuperação do equilíbrio das populações microbianas.

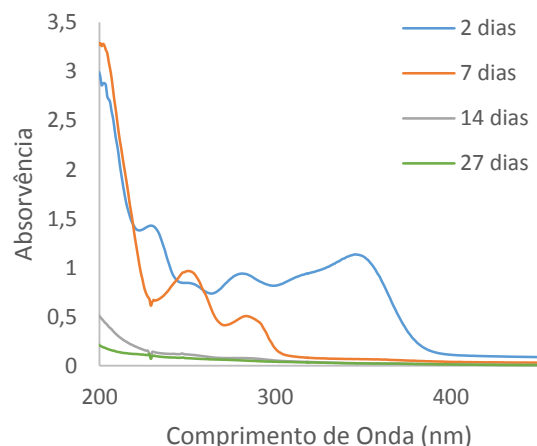
Verificou-se ainda uma diminuição da CQO mais acentuada no ensaio 4 VTO do que a obtida para o ensaio 4 VTB (Figura 24 a₁). As diferenças nos resultados destes ensaios podem atribuir-se às diferenças de agitação nos dois sistemas.

Além da diminuição da CQO ao longo do tempo, verificou-se também a diminuição da absorvência em todos os ensaios (Figura 25).

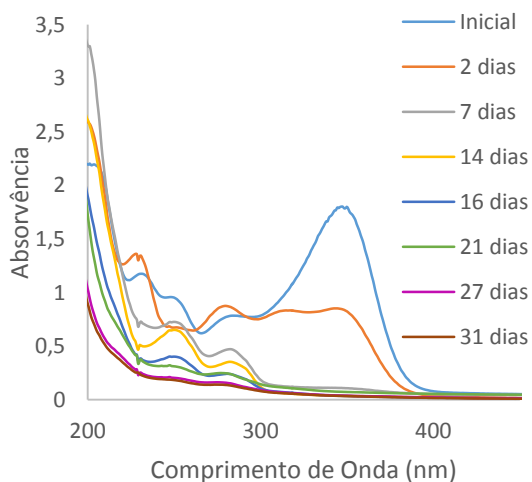
a₁) 1 VTB



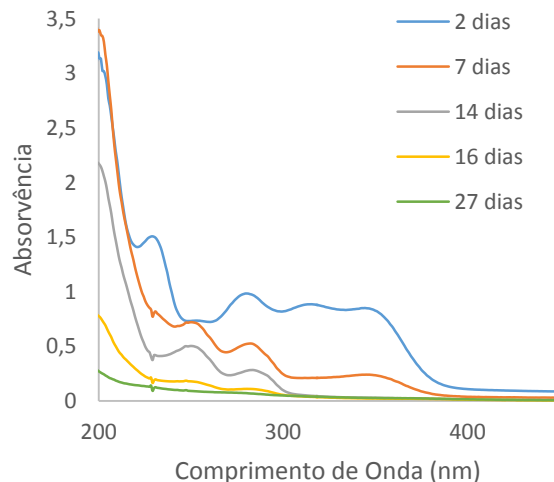
a₂) 1 VTO



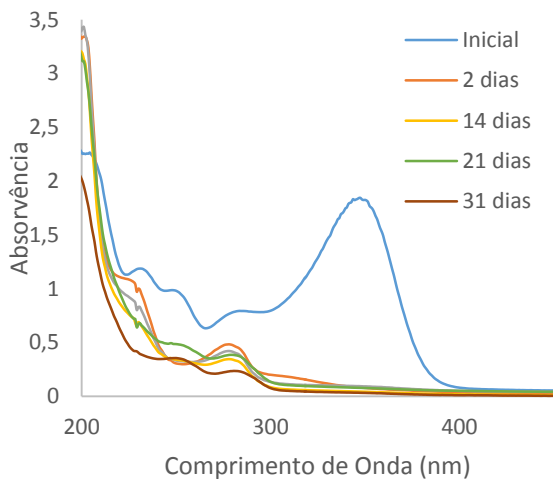
b₁) 2 VTB



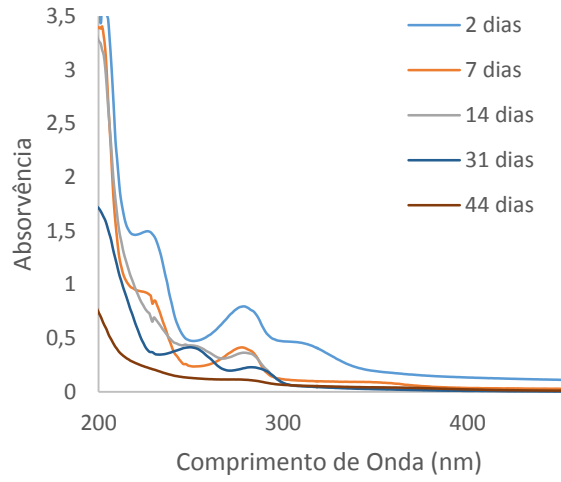
b₂) 2 VTO



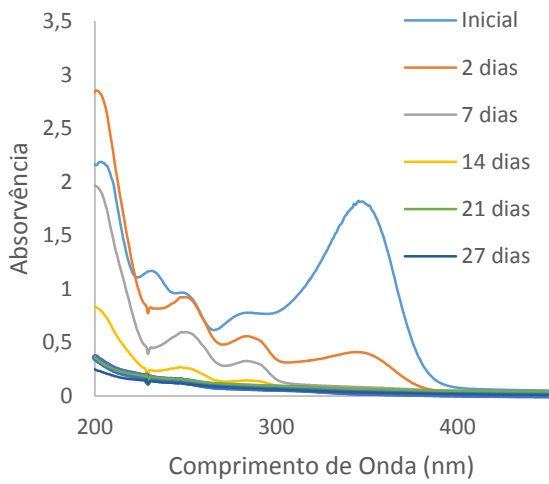
c₁) 3 VTB



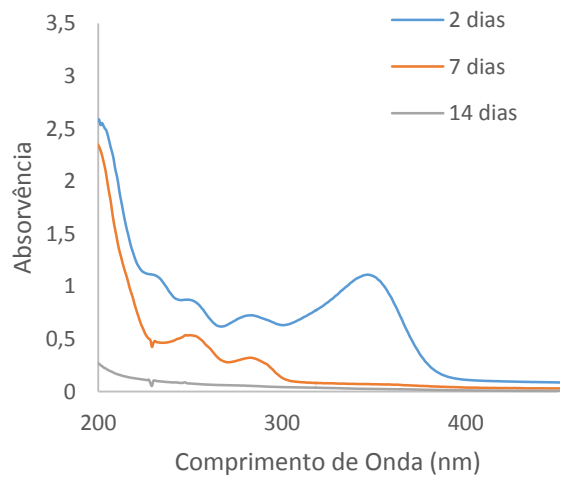
c₂) 3 VTO



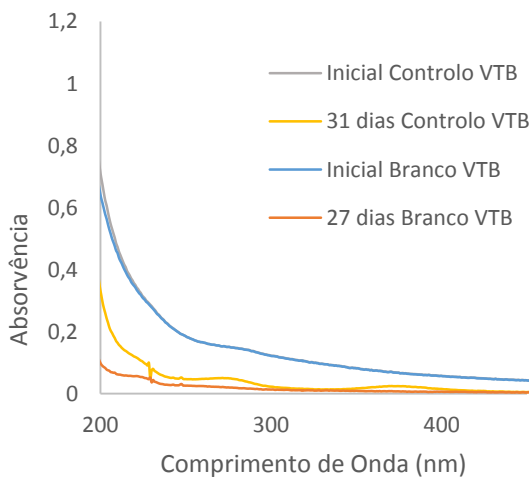
d₁) 4 VTB



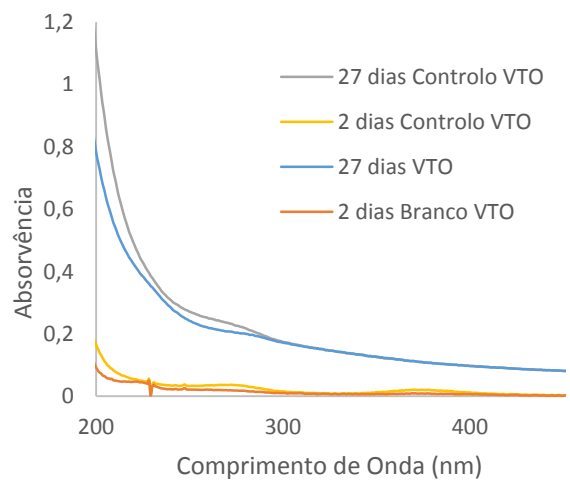
d₂) 4 VTO



e₁) CONTROLO e BRANCO (banho)



e₂) CONTROLO e BRANCO (agitador orbital)



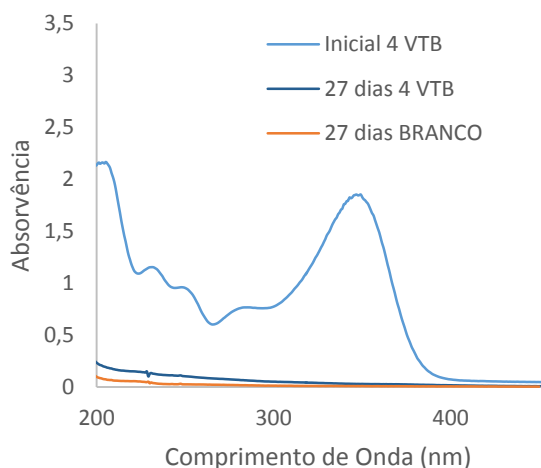
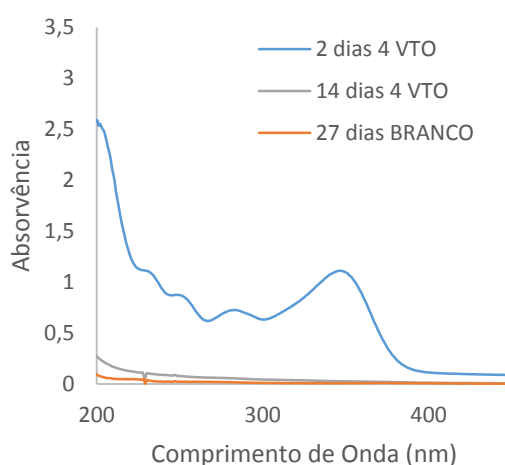
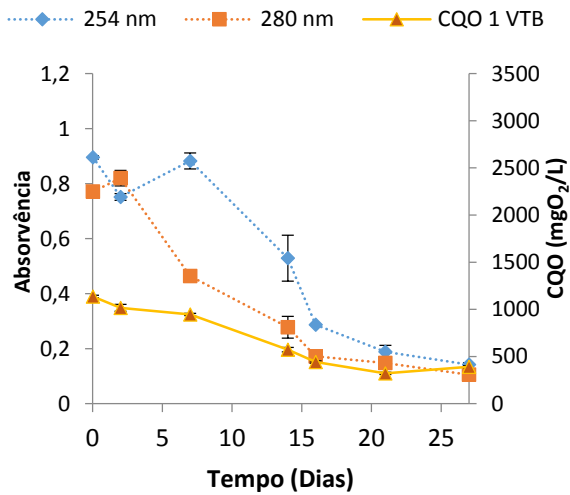
f₁) 4 VTB e BRANCOf₂) 4 VTO e BRANCO

Figura 25 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os diferentes ensaios da biodegradação anaeróbica da vanilina em regime termófilo no banho: a₁) 1 VTB; b₁) 2 VTB; c₁) 3 VTB; d₁) 4 VTB; e₁) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; f₁) 4 VTB e BRANCO e no agitador orbital: a₂) 1 VTO; b₂) 2 VTO; c₂) 3 VTO; d₂) 4 VTO; e₂) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; f₂) 4 VTO e BRANCO.

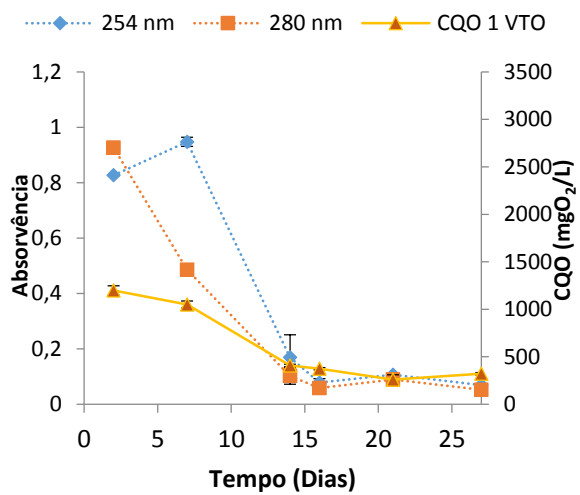
A análise dos gráficos da evolução da absorvência confirma a biodegradação da vanilina em termófilo para todos os ensaios traduzida pela diminuição da absorvência. Pode também constatar-se que a biodegradação é mais rápida para os ensaios 4 VTB e 4 VTO, com ausência de co-substratos, relativamente aos restantes ensaios, uma vez que é nestes ensaios que ocorre a diminuição dos valores de absorvência num período de tempo mais curto (21 dias e 14 dias respetivamente) comparativamente aos restantes ensaios. Verifica-se ainda que o ensaio 3 VTB e 3 VTO são os que apresentam uma diminuição mais lenta da vanilina, logo seguida dos ensaios 2 VTB, 2 VTO, 1 VTB e 1 VTO, com baixa concentração de cosubstratos, inferindo-se que a biodegradação mais rápida da vanilina está associada à ausência ou baixa concentração de cosubstratos. Este facto faz com que as populações bacterianas se tenham de adaptar mais rapidamente aos compostos alternativos presentes no meio (vanilina) de forma a conseguirem sobreviver e reproduzir-se, adotando vias metabólicas para a sua degradação e utilização como fonte de carbono. A presença de cosubstratos que são metabolizados preferencialmente pelas populações microbianas parece assim atrasar a biodegradação completa da vanilina (Ferreira e Sousa, 1998).

A relação entre a evolução, ao longo do tempo (dias), da CQO com a absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm nos diferentes ensaios está indicada na Figura 26.

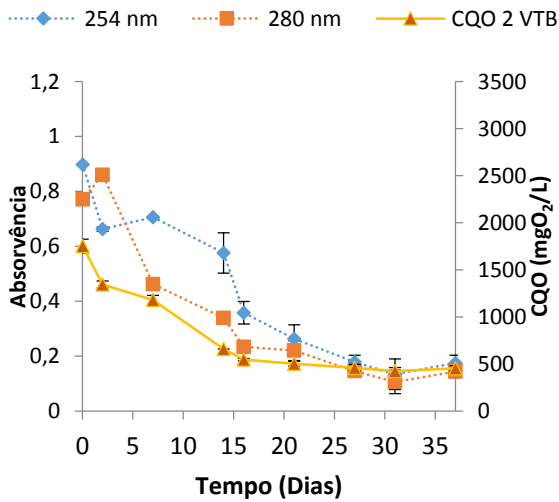
a₁) 1 VTB



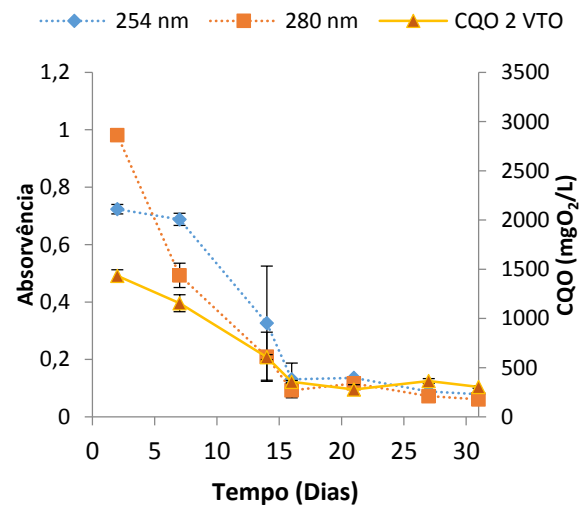
a₂) 1 VTO



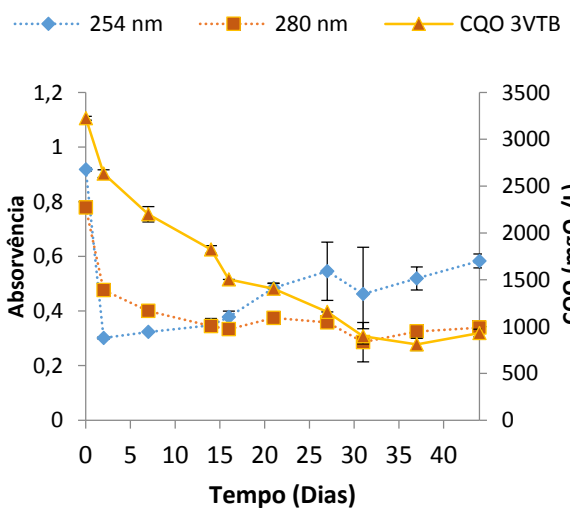
b₁) 2 VTB



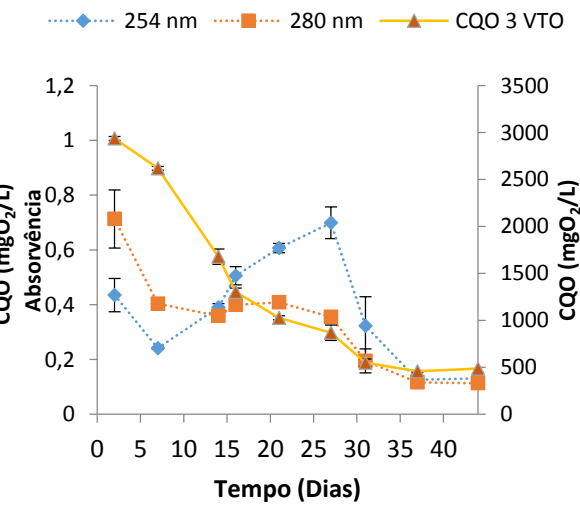
b₂) 2 VTO



c₁) 3 VTB



c₂) 3 VTO



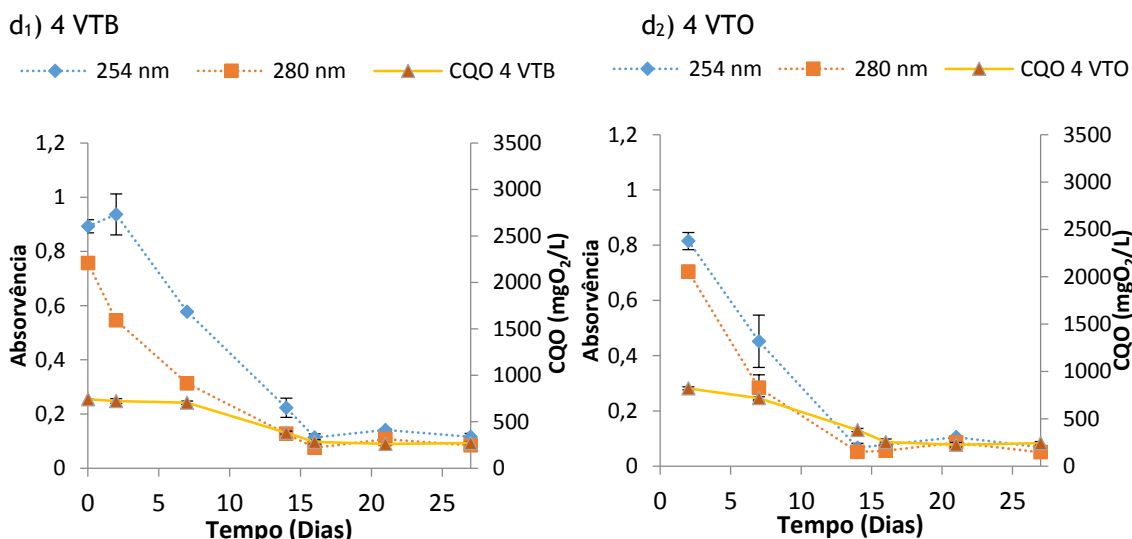


Figura 26 - Evolução da CQO e da absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm e 280 nm, ao longo do tempo, para os ensaios de biodegradação da vanilina em termófilo no banho: a₁) 1 VTB b₁) 2 VTB c₁) 3 VTB d₁) 4 VTB e no agitador orbital: a₂) 1 VTB b₂) 2 VTB c₂) 3 VTB d₂) 4 VTB.

As absorvências o comprimento de onda de 280 nm continua a ser o que melhor acompanha, na generalidade, a evolução da CQO na generalidade dos ensaios verificando-se igualmente a diminuição da absorvência mais acentuada nos ensaios 4 VTB e 4 VTO. Pode assim inferir-se que as populações anaeróbias mistas apresentam capacidade de adaptação à presença da vanilina, utilizando-a como substrato alternativo quando ocorre o esgotamento ou ausência de cosubstratos no meio traduzido pela diminuição da CQO e da absorvência.

Esta capacidade de adaptação também pode ter sido favorecida pelo facto de as populações bacterianas utilizadas serem mistas, o que aumenta a diversidade bacteriana e consequentemente incrementa a taxa de adaptação a condições de stress ambiental, como a presença de compostos fenólicos no meio como a vanilina (Leven e Schnurer, 2005; Leven et al, 2012).

Comparando os ensaios de biodegradação da vanilina nos regimes mesófilo e termófilo, verifica-se que a biodegradação deste composto é muito mais rápida em mesófilo relativamente ao regime termófilo. Estudos recentes utilizando compostos fenólicos como a vanilina também demonstraram uma maior eficiência da biodegradação em regime mesófilo relativamente ao regime termófilo. Esta diferença na velocidade e eficiência da biodegradação da vanilina, e outros compostos fenólicos, pode ser explicada pela diferença na diversidade microbiana de ambos os ecossistemas e/ou a presença de enzimas sensíveis à temperatura (enzimas termolábeis) limitando assim a biodegradação dos compostos fenólicos em termófilo (Fang et al, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven et al, 2012; Monlau et al, 2014).

Porém, apesar de os valores de CQO e os espectros de absorvência demonstrarem a biodegradação da vanilina verificou-se a ausência de produção de biogás. Tal pode dever-se ao facto de a quantidade produzida ser de tal forma baixa que não foi possível a sua deteção.

4.2.1.3. Ensaios Abióticos

A Figura 27 representa a evolução da absorvência e da CQO do ensaio abiótico realizado com a solução de vanilina autoclavada à qual foi adicionada biomassa igualmente autoclavada.

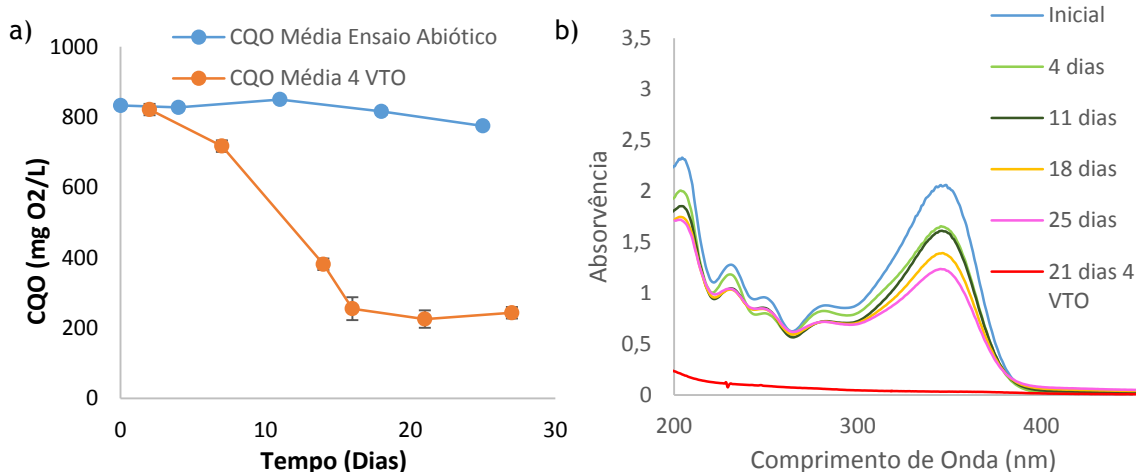


Figura 27 - a) Evolução da CQO para o ensaio abiótico da vanilina comparativamente com a CQO média do ensaio 4 VTO em regime termófilo. b) Absorvência do ensaio abiótico com vanilina e biomassa autoclavadas comparativamente ao espectro obtido no final do ensaio 4 VTO.

Da análise da Figura 27 a) pode-se verificar que a CQO média do ensaio abiótico sofre pouca variação, sugerindo uma maior estabilidade da vanilina relativamente à ortovanilina em termófilo, não se observando alterações ao nível da cor da solução ou formação de quaisquer agregados ao longo do ensaio. Verifica-se ainda que embora ocorra uma diminuição ligeira da absorvência da solução de vanilina, esta diminuição é muito mais significativa para o ensaio biótico 4 VTO sugerindo assim a sua efetiva biodegradação (Figura 27 b).

4.2.2. Biodegradação da Ortovanilina

4.2.2.1. Caracterização da Biomassa

Para a realização dos ensaios de bioeliminação (biodegradação) anaeróbia no banho e agitador orbital foi utilizada biomassa anaeróbia mista adaptada à glucose e à vanilina respetivamente, procedendo-se no início dos ensaios à sua caracterização determinando a concentração de sólidos suspensos (SS) e de sólidos suspensos voláteis (SSV) (Tabela 21). Os ensaios no banho e no agitador orbital decorreram com uma agitação de 50 rpm e 70 rpm respetivamente.

Tabela 21 - Concentração Média e Desvio Padrão dos Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ensaio	Biomassa (inóculo)	Sólidos	
		SS (g/L)	SSV (g/L)
Banho	Adaptada à glucose	24,1 ± 0,5 (2)*	18,9 ± 0,1 (2)*
Agitador Orbital	Adaptada à vanilina	23,4 ± 0,5 (2)*	16,2 ± 0,4 (2)*

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

4.2.2.2. Ensaio de Biodegradação

Os ensaios de bioeliminação (biodegradação) da ortovanilina em termófilo decorreram no banho e no agitador orbital durante 138 e 104 dias respetivamente. No banho a agitação foi de 50 rpm sendo a do agitador orbital 70 rpm. Posteriormente à recolha e tratamento das amostras de cada ensaio foi realizada a respetiva CQO, cujos valores médios iniciais e finais, assim como os respetivos desvio padrão, se encontram na Tabela 22.

Tabela 22 - Valores Médios e Desvios Padrão Iniciais e Finais de CQO

A) Banho

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção CQO	Tempo (Dias)
4 OVTB		782 ± 25 (2)*	267 ± 16 (2)*	66 ± 2 (2)*	138
Solução Controlo (acetato de sódio e glucose)		2547 (1)*	278 (1)*	90 (1)*	37

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

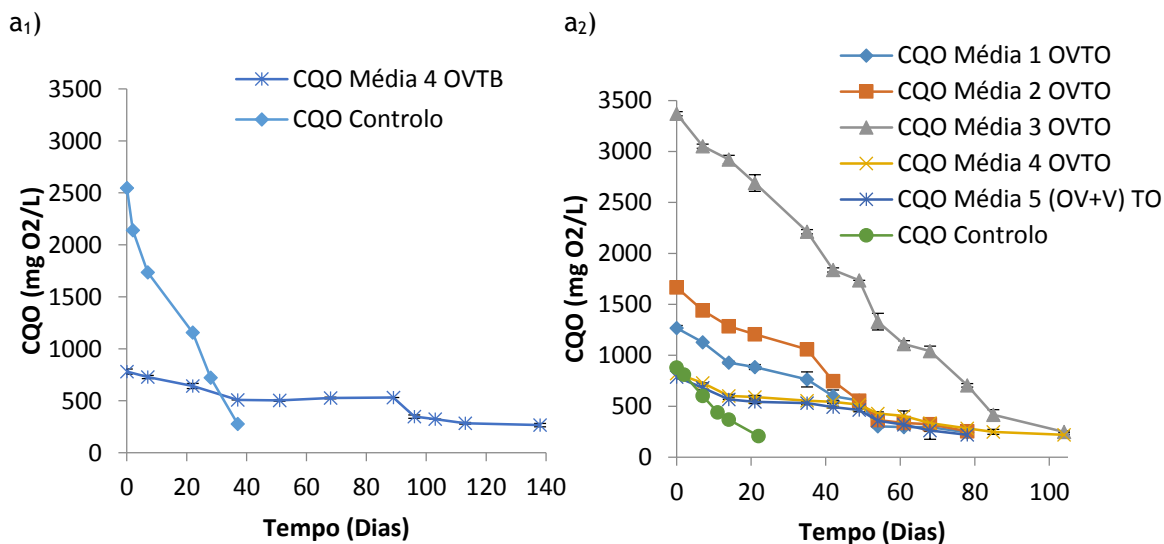
B) Agitador Orbital

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção CQO	Tempo (Dias)
1 OVTO		1268 ± 25 (2)*	244 ± 16 (2)*	81 ± 1 (2)*	78
2 OVTO		1667 ± 0 (2)*	255 ± 0 (2)*	85 ± 1 (2)*	78
3 OVTO		3371 ± 21 (2)*	249 ± 9 (2)*	93 ± 0 (2)*	104
4 OVTO		822 ± 16 (2)*	220 ± 0 (2)*	73 ± 1 (2)*	104
5 (OV+V) TO		787 ± 16 (2)*	220 ± 0 (2)*	72 ± 0 (2)*	78
Solução Controlo (vanilina)		880 (1)*	208 (1)*	76 (1)*	22

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

Os resultados obtidos sugerem que o facto de se utilizar como inóculo biomassa previamente adaptada à vanilina aumenta a taxa de remoção da CQO em todos os ensaios da ortovanilina em termófilo. Por exemplo, o ensaio 4 OVTB, com ausência de cosubstratos, apresenta uma taxa de remoção de CQO de 73% (Tabela 22B) sendo mais elevada do que a obtida para o mesmo ensaio realizado no banho (4 OVTO), para o qual se obteve uma taxa de remoção de 66% (Tabela 22A) (utilizando-se neste último biomassa adaptada à glucose). Também a presença de cosubstratos aumenta a biodegradação da ortovanilina, pois o ensaio 3 OVTO sendo o que apresenta maior teor de cosubstratos (glucose + acetato de sódio), é o que apresenta uma taxa de remoção de CQO superior, sendo seguido dos ensaios 2 OVTO e 1 OVTO, sendo este último o que apresenta menor teor de cosubstratos (glucose + acetato de sódio). A bioeliminação (biodegradação) ocorre num elevado período de tempo, o que indica que apesar de ter sido utilizada biomassa anaeróbia mista, com elevada diversidade bacteriana, as populações demonstram maior dificuldade de adaptação e degradação da ortovanilina na ausência de cosubstratos. Este facto pode estar associado à estrutura da ortovanilina que, ao apresentar o grupo OH na posição *orto* do anel aromático numa ligação de hidrogénio intramolecular com grupo aldeído, dificulta a sua degradação (Barik *et al*, 2003). Além disso, o facto de as populações anaeróbias não se encontrarem aclimatizadas parece agravar a dificuldade de biodegradação da ortovanilina no ensaio que decorreu no banho (4 OVTO).

A evolução média da CQO e do pH obtida nos diferentes ensaios está apresentada na Figura 28.



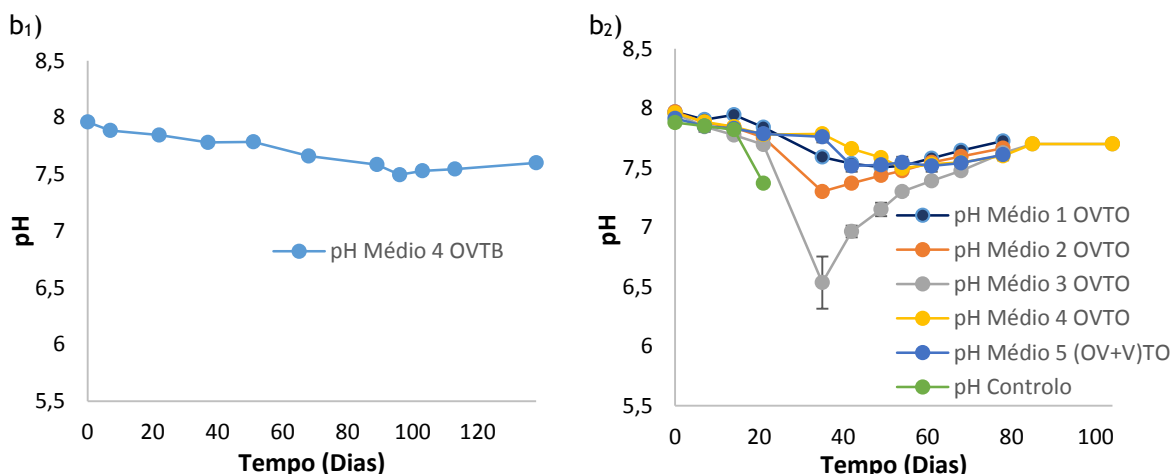


Figura 28 - a₁) e a₂) Análise comparativa da evolução da CQO média dos diferentes ensaios ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação da ortovanilina em regime termófilo no banho e agitador orbital respetivamente. b₁) e b₂) Evolução comparativa do pH para os diferentes ensaios no banho e agitador orbital respetivamente.

No ensaio efetuado no banho (Figura 28 a₁) a CQO apresenta uma diminuição pouco significativa até aos 89 dias, o que traduz a dificuldade das populações microbianas em se adaptarem à presença da ortovanilina e a degradarem utilizando-a como substrato. No entanto, a partir deste dia verificou-se uma diminuição mais acentuada da CQO associada à biodegradação da ortovanilina. A presença de cosubstratos facilmente metabolizáveis (acetato de sódio e glucose) parece acelerar claramente a degradação da ortovanilina traduzida pela diminuição da CQO ao longo do tempo (Figura 28 a₂). A presença de cosubstratos permite o crescimento das populações bacterianas o que conduz a uma taxa de remoção da CQO mais eficiente (Ferreira e Sousa, 1998; Parshina *et al*, 2000; Veeresh G.S.*et al*, 2005). Assim, o ensaio 3 OVTO, sendo o que apresenta maior teor de cosubstratos, é de todos os ensaios realizados o que apresenta uma diminuição da CQO mais acentuada, sendo seguido dos ensaios 2 OVTO e 1 OVTO que apresentam concentrações intermédia e baixa de cosubstratos respetivamente. Seguidamente, na Figura 29 a) e b), está representada a evolução comparativa da CQO dos ensaios 4 OVTO com 4 OVTB 5 e (OV+V) TO com 4 OVTB respetivamente.

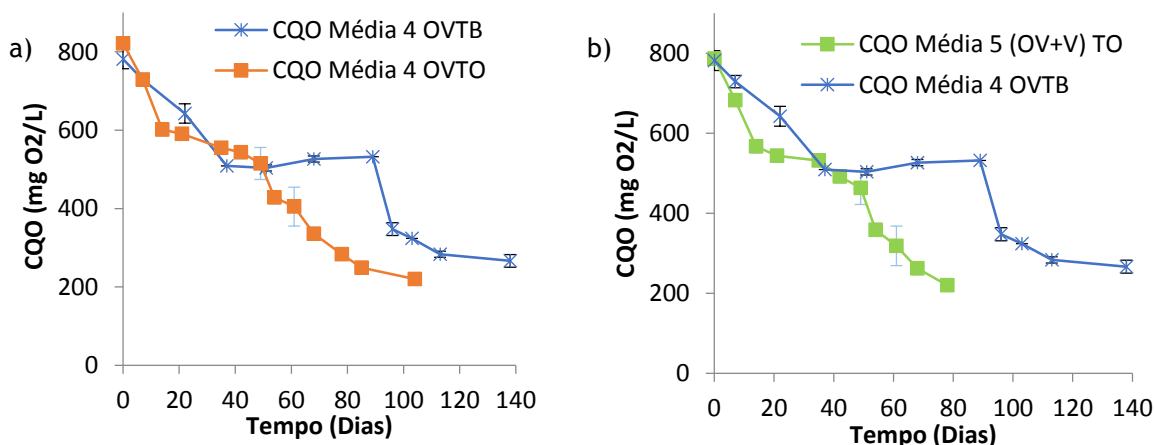
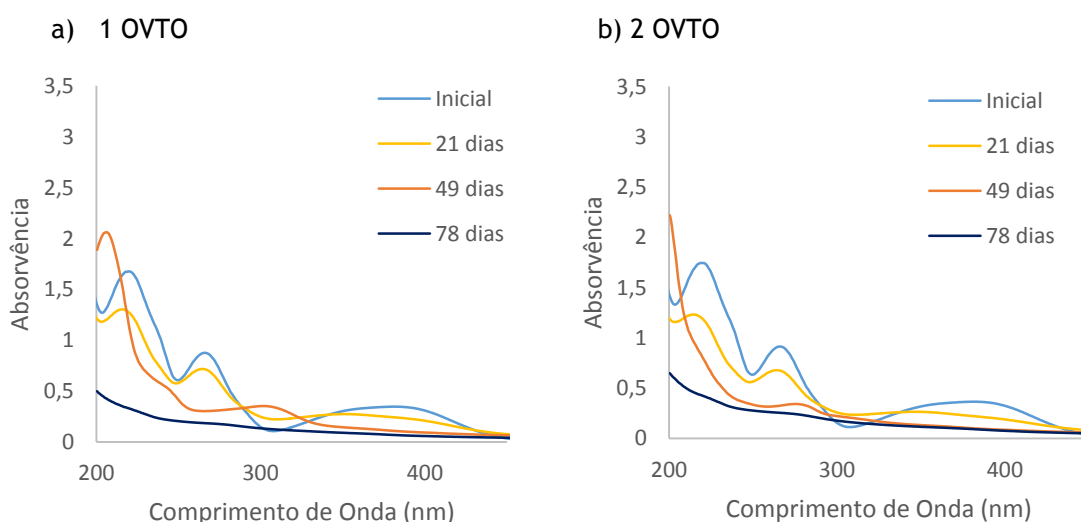


Figura 29 - Evolução comparativa da CQO média dos ensaios da biodegradação da ortovanilina em termófilo: a) 4 OVTB e 4 OVTO. b) 5 (OV+V) TO e 4 OVTB.

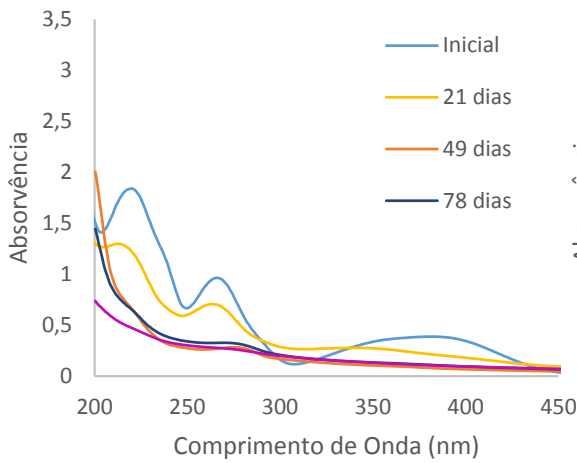
Relativamente ao ensaio 4 OVTO a diminuição da CQO é mais acentuada do que a obtida para o ensaio similar efetuado no banho, devido ao facto de a biomassa utilizada já ter estado previamente em contacto com outro composto fenólico (vanilina), pelo que as populações bacterianas desenvolvidas já apresentam mecanismos bioquímicos (enzimas específicas) de degradação de compostos fenólicos, conduzindo assim a uma biodegradação mais rápida da ortovanilina (Figura 29 a). Esta diminuição mais significativa da CQO no ensaio 4 OVTO relativamente ao ensaio 4 OVTB e num período de tempo mais curto (104 dias relativamente aos 138 dias do ensaio 4 OVTB) demonstra a importância da aclimatização prévia das populações microbianas para a biodegradação dos compostos fenólicos como a ortovanilina (Chen et al, 2008; Monlau *et al*, 2014; Veeresh et al, 2005).

No ensaio 5 (OV+V) TO a presença de vanilina alimenta inicialmente as populações bacterianas, funcionando como cosubstrato, ocorrendo este ensaio em igual período de tempo aos ensaios 1 OVTO e 2 OVTO, que também contêm cosubstratos (Figura 28 a₂ e 29 b). A adaptação prévia das populações microbianas à vanilina permite a sua multiplicação celular e consequentemente o aumento da diversidade populacional. O aumento do número de células conduz à diminuição acentuada da CQO e degradação da ortovanilina, num período de tempo mais curto relativamente ao ensaio 4 OVTB, associado ao facto de as populações microbianas já se encontrarem adaptadas previamente à vanilina (Figura 29 b).

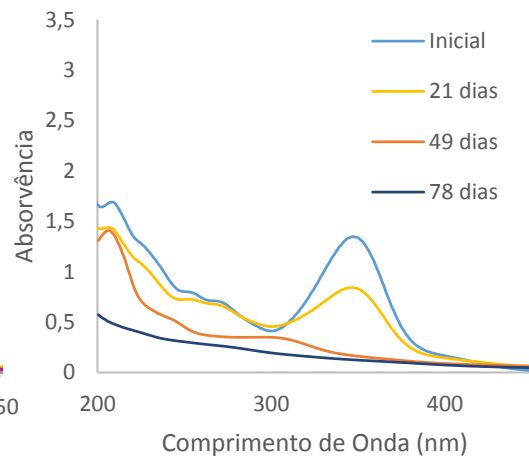
Os gráficos da Figura 30 mostram a evolução da absorvência ao longo do tempo (dias), para os diferentes ensaios da biodegradação da ortovanilina em regime termófilo.



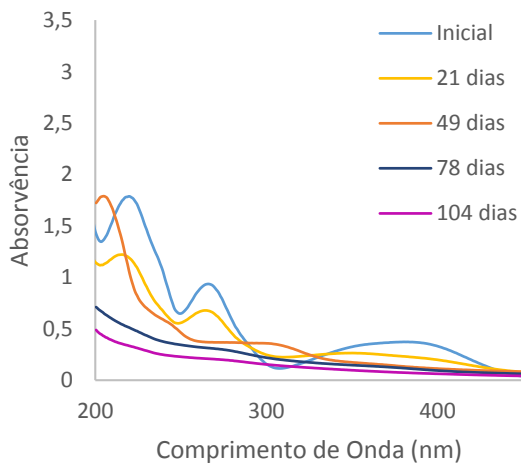
c) 3 OVTO



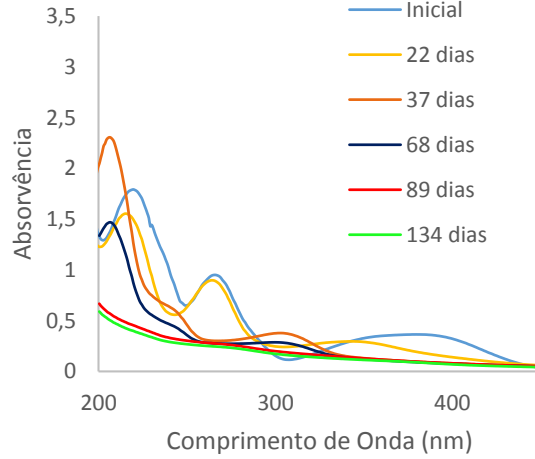
d) 5 (OV+V) TO



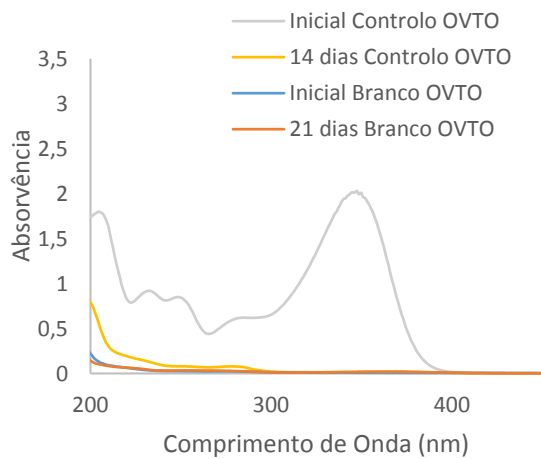
e) 4 OVTO



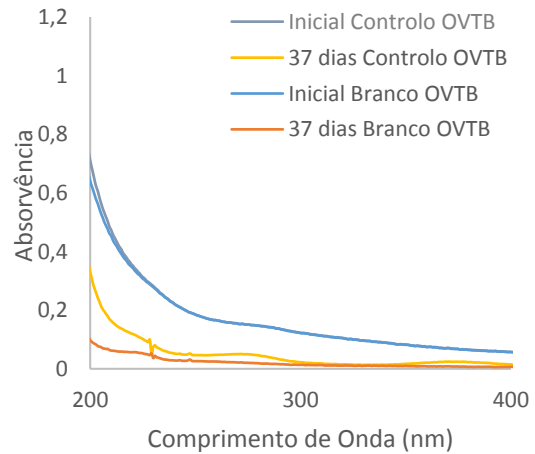
f) 4 OVTB



g) CONTROLO e BRANCO



h) CONTROLO e BRANCO



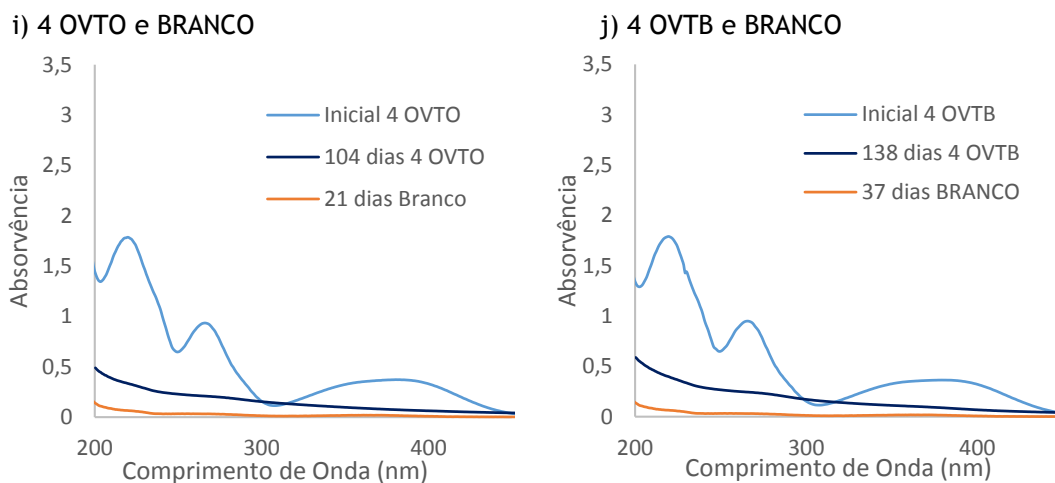
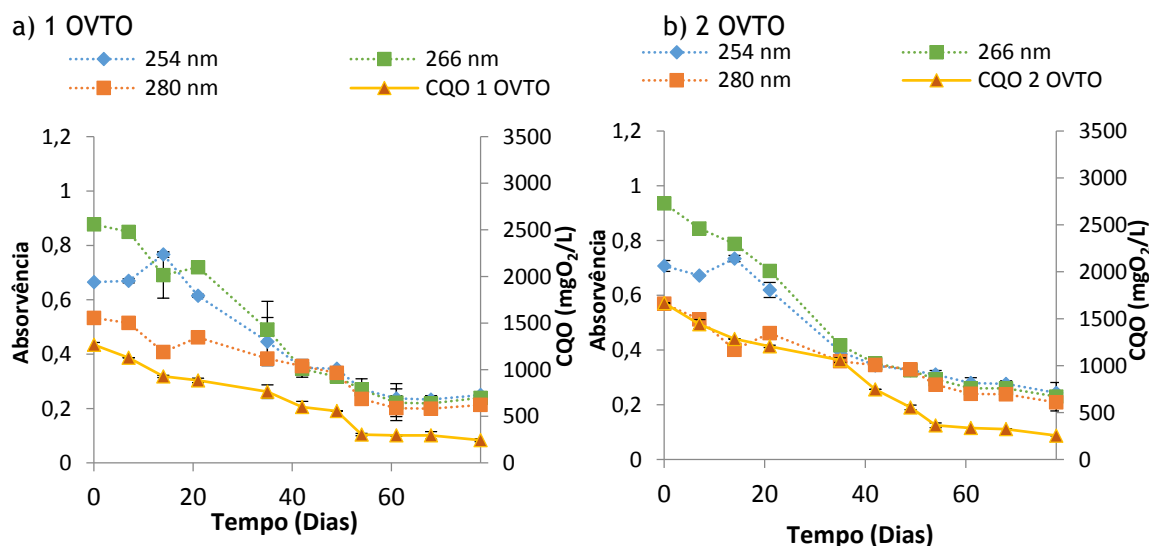


Figura 30 - Exemplos da evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os ensaios da biodegradação anaeróbia da ortovanilina em regime termófilo no agitador orbital: a) 1 OVTO; b) 2 OVTO; c) 3 OVTO; d) 5 (OV+V) TO; e) 4 OVTO; g) CONTROLO (Vanilina) e BRANCO; i) 4 OVTO e BRANCO; e banho: f) OVTB; h) CONTROLO (acetato de sódio e glucose) e BRANCO; j) 4 OVTB e BRANCO.

A degradação da ortovanilina em termófilo parece ocorrer mesmo na ausência de cosubstratos (4 OVTO e 4 OVTB), traduzindo-se numa diminuição da absorvência, sendo esta no final bastante baixa. Este facto pode estar associado à utilização de populações adaptadas e aclimatizadas a compostos fenólicos relacionados com a ortovanilina (a vanilina) conduzindo a uma biodegradação mais rápida e eficiente da ortovanilina. A análise dos espectros indica ainda que a presença dos cosubstratos glucose e acetato de sódio, em maior concentração, favorecem a biodegradação da ortovanilina (1 OVTO, 2 OVTO e 3 OVTO). Verifica-se também que quando se adiciona vanilina ao meio 5 (OV+V) TO, esta atua como cosubstrato, conduzindo à degradação mais rápida da ortovanilina pelas populações microbianas, diminuindo mais rapidamente a absorvência (Figura 30 d). A relação da CQO com a absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm encontra-se indicada na Figura 31.



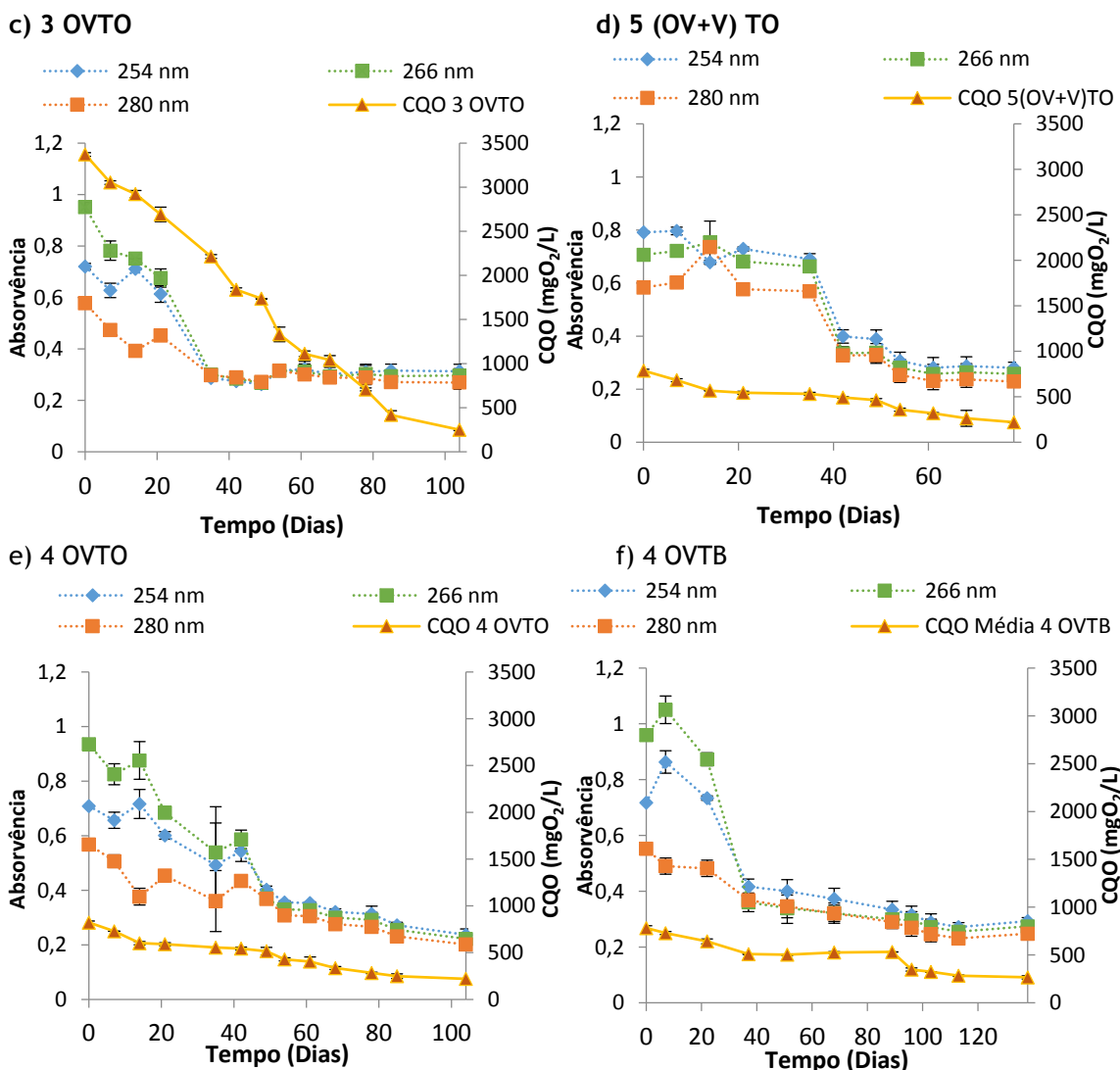


Figura 31 - Evolução da CQO média e da absorvência para os comprimentos de onda de 254 nm, 266 nm e 280 nm para os ensaios da ortovanilina em termófilo.

Analisando os gráficos da Figura 31 verifica-se que a diminuição da CQO e da absorvência na ausência de cosubstratos é lenta sugerindo uma maior dificuldade na biodegradação da ortovanilina associada à dificuldade de quebra do anel aromático.

Comparando os ensaios de biodegradação da ortovanilina nos regimes mesófilo e termófilo, os resultados indicam que a biodegradação deste composto é, tal como a vanilina, muito mais rápida em mesófilo. De acordo com o referido para a vanilina esta diferença na velocidade e eficiência da biodegradação da ortovanilina, pode ser explicada pela diferença na diversidade microbiana do ecossistema e a presença de enzimas sensíveis à temperatura (enzimas termolábeis) (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005) limitando assim a biodegradação deste composto fenólico em termófilo.

4.2.2.3. Ensaios Abióticos

A alteração significativa da solução de ortovanilina a temperaturas mais elevadas foi analisada seguindo-se o comportamento da solução, ao longo do tempo (dias), e de ensaios abióticos efetuados com solução de ortovanilina e biomassa após autoclavagem.

A Figura 32 representa a evolução da CQO e da absorvência da solução de ortovanilina e dos ensaios abióticos realizados em termófilo.

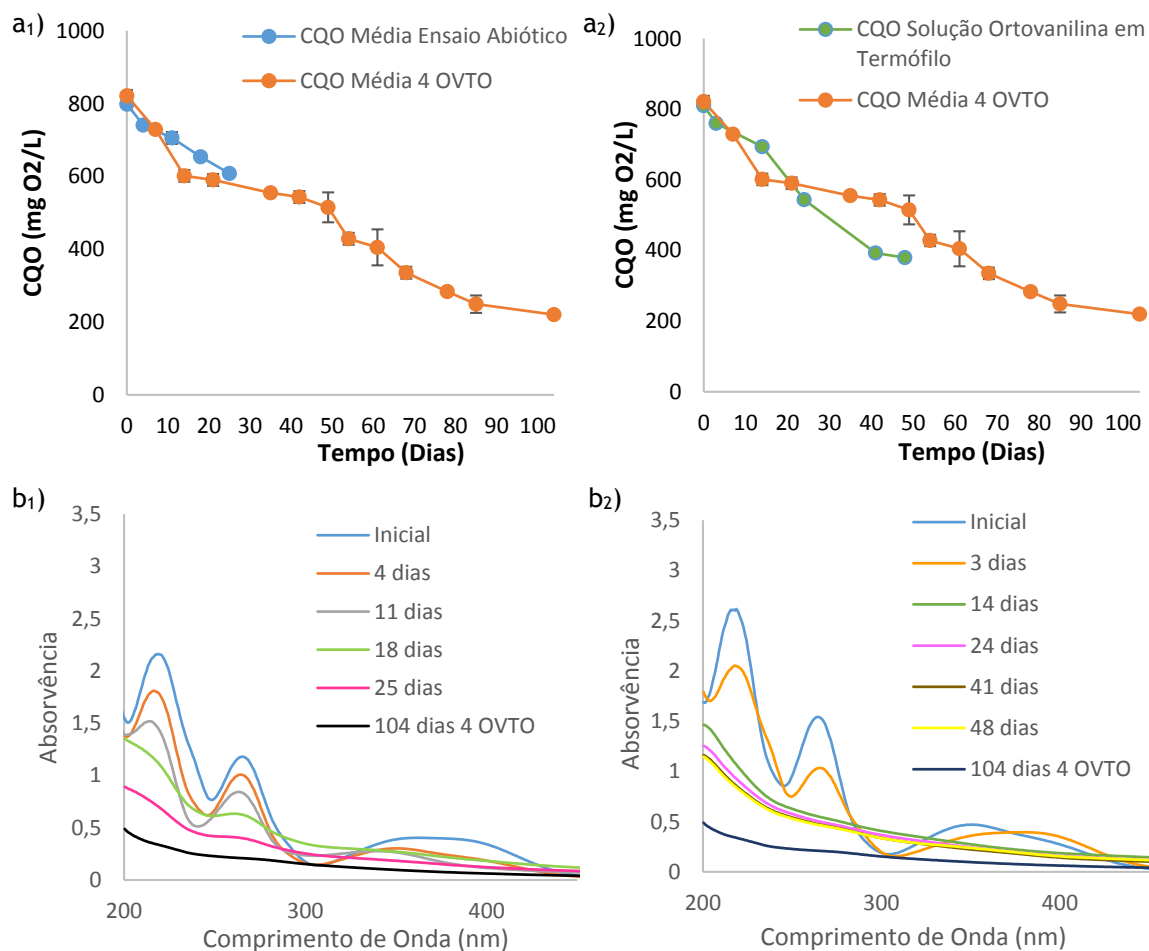


Figura 32 - a₁) Evolução da CQO média do ensaio abiótico da ortovanilina e do ensaio 4 OVTO. a₂) Evolução da CQO do ensaio com a solução de ortovanilina e sua comparação com o ensaio 4 OVTO. b₁) Evolução da absorvência do ensaio abiótico da ortovanilina e da última amostra do ensaio biótico 4 OVTO. b₂) Evolução da absorvência para a solução de ortovanilina comparativamente com a última amostra do ensaio biótico 4 OVTO.

Também na solução de ortovanilina, em termófilo, foi observada a formação de agregados, assim como a alteração da sua cor de amarela para castanho, sendo estas alterações atenuadas na presença de biomassa e cosubstratos. Este facto pode ter conduzido à diminuição da CQO e da absorvência dos ensaios abióticos, assim como no ensaio da solução de ortovanilina. Também o perfil de evolução dos espectros do ensaio abiótico e da solução de ortovanilina, ao longo do tempo, é diferente do observado para os ensaios bióticos. Além disso, a absorvência da última amostra do ensaio 4 OVTO é muito menor relativamente aos ensaios abióticos e com a solução de ortovanilina, sendo o valor de CQO média final do ensaio 4 OVTO bastante baixo (220 mg O₂/L) (Figura 32), o que sugere a biodegradação da ortovanilina em termófilo.

4.2.3. Biodegradação do 4-clorofenol

4.2.3.1. Caracterização da Biomassa

A caracterização da biomassa anaeróbia mista, previamente adaptada à vanilina, está indicada na Tabela 23.

Tabela 23 - Concentração Média e Desvio Padrão de Sólidos Suspensos (SS) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Ensaio	Biomassa (inóculo)	Sólidos	
		SS (g/L)	SSV (g/L)
Agitador Orbital	Adaptada à vanilina	28,3 ± 0,9 (2)*	17,8 ± 0,4 (2)*

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

4.2.3.2. Biodegradação do 4-clorofenol

O ensaio de biodegradação do 4-clorofenol (ou paraclorofenol) em termófilo no agitador orbital decorreu durante 21 dias com a agitação de 70 rpm. Posteriormente à recolha e tratamento das amostras de cada ensaio foi realizada a respetiva CQO, cujos valores iniciais e finais, assim como o respetivo desvio padrão, se encontram na Tabela 24.

Tabela 24 - Valores Médios e Desvios Padrão Iniciais e Finais de CQO

Ensaio	Parâmetros	CQO Inicial (mg CQO/L)	CQO Final (mg CQO/L)	% Remoção Máxima de CQO	Tempo (Dias)
CFT		238 ± 8 (2)*	167,5 ± 25 (2)*	30 ± 2	14
Solução Controlo (Vanilina)		880 (1)*	208 (1)*	76	22

*Entre parêntesis está indicado o n.º de análises efetuadas para cada concentração.

A baixa taxa de remoção de CQO ($30\% \pm 2$) deve-se ao facto de ter sido utilizado uma baixa concentração deste composto (100 mg/L) o que dificulta a análise dos resultados obtidos.

Na Figura 33 encontram-se representados os gráficos da evolução média da CQO e do pH dos ensaios.

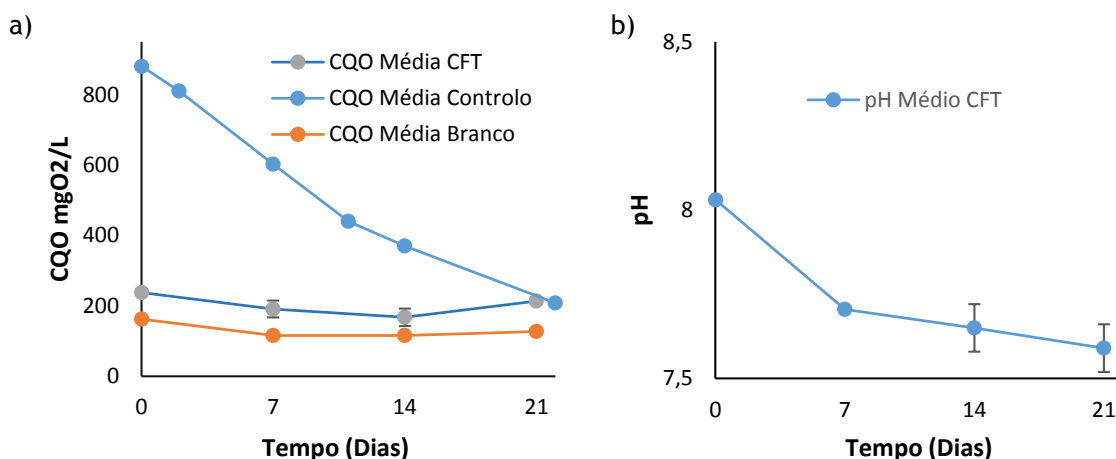
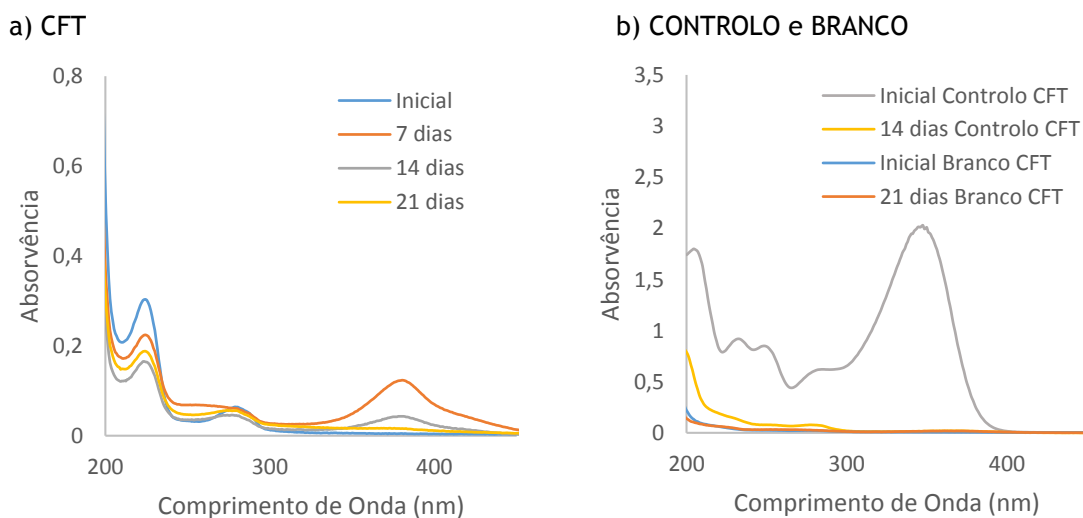


Figura 33 - a) Evolução da CQO média ao longo do tempo (dias) do ensaio da biodegradação do 4-clorofenol em termófilo no agitador orbital. b) Evolução média do pH dos ensaios.

Pode observar-se que a diminuição da CQO e do pH ao longo do tempo é pouco significativa (Figura 33), podendo admitir-se uma baixa biodegradação devido a um possível efeito inibitório nas populações microbianas e consequentemente morte celular (Nordin, 2004; Puyol *et al*, 2012). No entanto, analisando os resultados dos ensaios abióticos e a evolução dos espectros relativos aos ensaios com o 4-clorofenol na presença de biomassa ativa sugerem alguma degradação (Figura 34).



c) CFT, BRANCO e CONTROLO

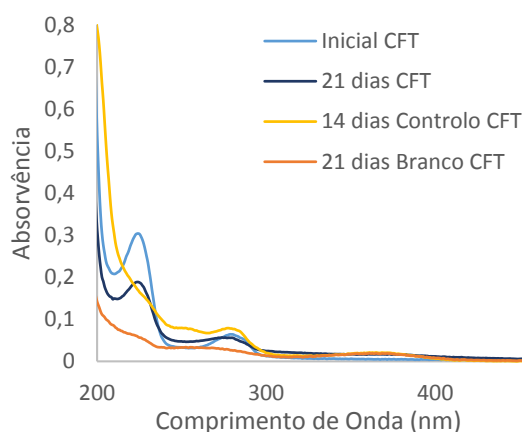


Figura 34 - Evolução da absorvência ao longo do tempo (dias) para os ensaios da biodegradação anaeróbia do 4-clorofenol em regime termófilo no agitador orbital: a) CFT. b) CONTROLO e BRANCO. c) CFT, BRANCO e CONTROLO.

Analisando os espectros da Figura 34 estes sugerem que o 4-clorofenol sofreu alguma biodegradação, uma vez que a sua absorvência diminuiu ao longo do tempo, apresentando no final uma absorvência próxima do controlo (Figura 34 c).

Na figura 35 encontra-se representado o gráfico que relaciona a evolução média da CQO e absorvência para os comprimentos de onda de 223 nm, 254 nm, 280 nm e 380 nm ao longo do tempo (dias).

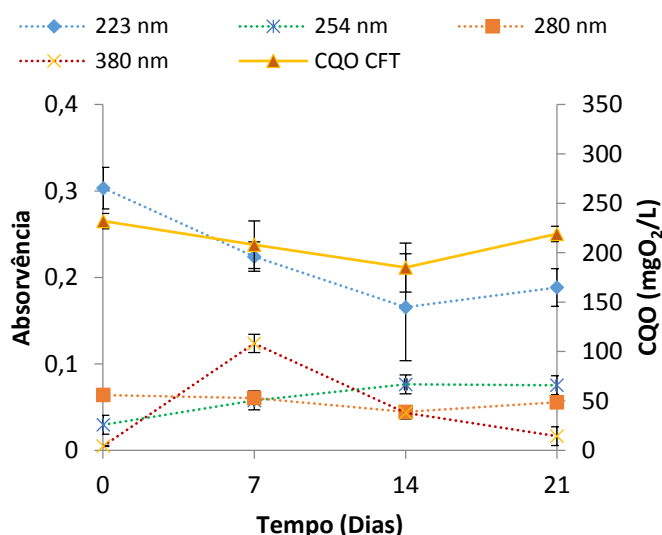


Figura 35 - Evolução média da CQO e absorvência para os comprimentos de onda de 223 nm, 254nm, 280 nm e 380 nm ao longo do tempo (dias) no ensaio de biodegradação do 4-clorofenol em regime termófilo no agitador orbital.

Da análise do gráfico da Figura 35 pode observar-se que o comprimento de onda que melhor acompanha a evolução da CQO é o de 223 nm. A diminuição da absorvência para o comprimento de onda de 380 nm, específico do 4-clorofenol, sugere a sua biodegradação. No entanto, para confirmar esta hipótese seria necessário a realização de mais ensaios.

As absorvências para os comprimentos de onda 254 nm e 280 nm foram monitorizadas para complementar a análise da degradação de compostos orgânicos (Karmakar *et al*, 2000).

4.2.3.3. Ensaios Abióticos

O ensaio abiótico realizado com o 4 - clorofenol (500 mg/L), demonstrou que a CQO e a absorvência deste composto sofreu alterações pouco significativas em termófilo (Figura 36). Assim, a maior diminuição da absorvência observada nos ensaios bióticos sugerem a sua biodegradação.

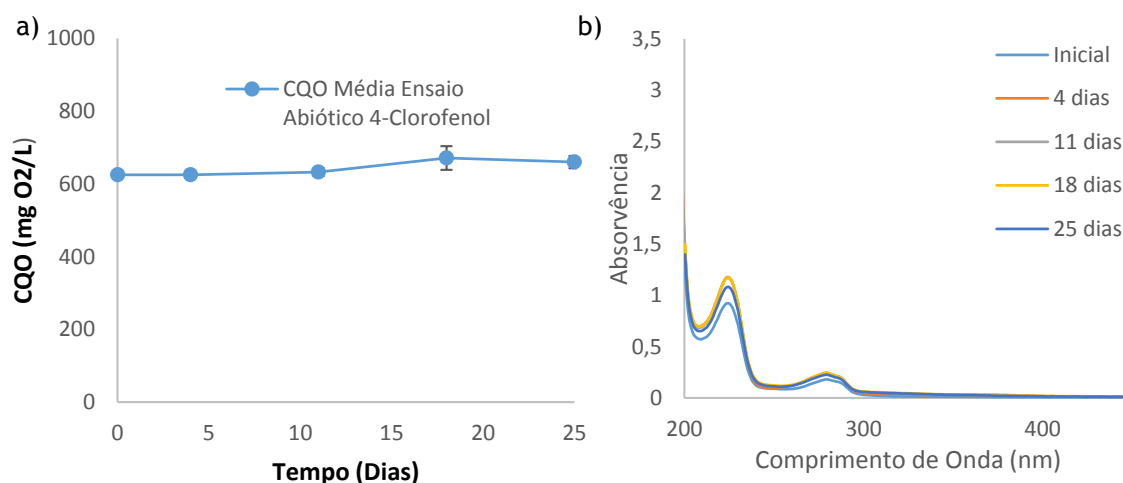


Figura 36 - a) Evolução da CQO média do ensaio abiótico. b) Evolução do espectro do 4 - clorofenol (500 mg/L) obtido no ensaio abiótico.

4.2.4. Estudo Preliminar da Cinética de Degradação da Vanilina e Ortovanilina

No presente capítulo é efectuada uma análise preliminar da cinética de degradação dos aldeídos fenólicos vanilina e ortovanilina em regime anaeróbio. Apesar de na literatura serem propostos modelos mais complexos, no presente trabalho adoptou-se um modelo simples e generalista em que a cinética de consumo de substrato (S) se aproxima de um modelo de pseudo primeira ordem, em que:

$$\frac{dS}{dT} = -kS \Leftrightarrow \frac{dS}{S} = -k dT \Leftrightarrow \int_{S_0}^S \frac{1}{S} dS = -k \int_{t_0}^t dT$$

Desenvolvendo a expressão anterior obtém-se:

$$S = S_0 e^{(-kt)}$$

Sendo:

S - Concentração substrato residual

S₀ - Concentração inicial de substrato

k - Parâmetro cinético de pseudo-primeira ordem

t - Tempo

Por observação da evolução dos valores médios da CQO e das Absorvências a 254 e 280 nm ao longo do tempo, verificou-se que ambos os parâmetros permitem medir a concentração residual de matéria orgânica. Assim, procurou-se compreender se o comportamento em termos cinéticos de ambos os parâmetros era similar. Selecionou-se o tratamento de resultados para o comprimento de onda de 280 nm, por ser mais específico para ambos os compostos. Nas Figuras 37 a 42 estão indicados os resultados da modelação em regime mesófilo (M) e termófilo (T).

Os valores dos parâmetros cinéticos (k) para a evolução da CQO, em regime mesófilo (k_m) e termófilo (k_t), assim como para a evolução das Absorvências (Abs), em regime mesófilo (ka_m) e termófilo (ka_t), para os diferentes ensaios (Tabelas 25 e 26) foram determinados através do método dos mínimos quadrados, por ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais.

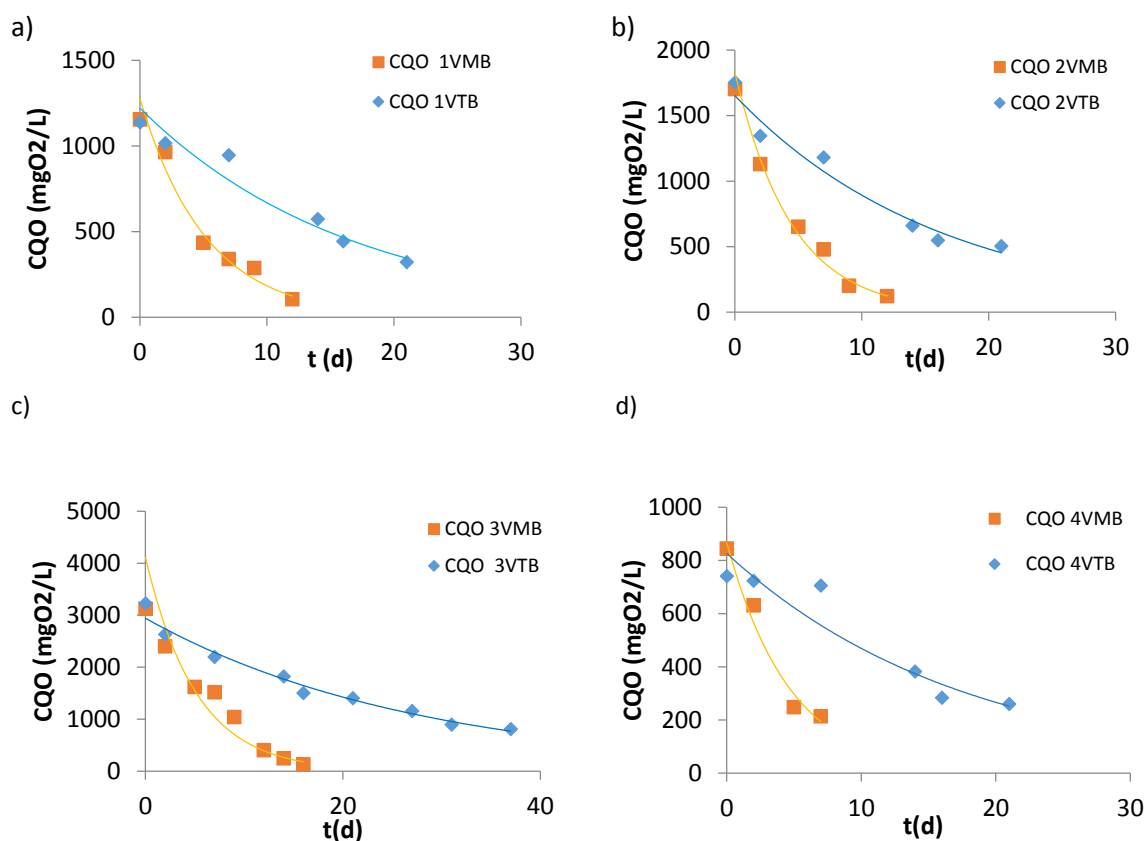


Figura 37 - Modelação da influência do teor de co-substratos na biodegradação da vanilina (CQO) em mesófilo e termófilo nos ensaios: a) 1VMB e 1VTB. b) 2VMB e 2VTB. c) 3VMB e 3VTB. d) 4VMB e 4VTB.

Os resultados obtidos para a degradação da vanilina indicam, inequivocamente, uma diminuição mais rápida da CQO e das absorvências a 280 nm em regime mesófilo (Figura 37). Por análise dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos para a CQO e Abs (Tabela 25) pode afirmar-se, que em geral, o modelo se ajusta aos pontos experimentais de forma bastante aceitável. O valor de R^2 mais baixo obtido no ensaio 3VTB atribui-se ao efeito do pH de acordo com o referido no subcapítulo 4.2.1. Relativamente à evolução das absorvências (Figura 38) verifica-se, pelos valores de k_m e k_a , que a adição de co-substratos diminui a velocidade da reação (Tabela 25).

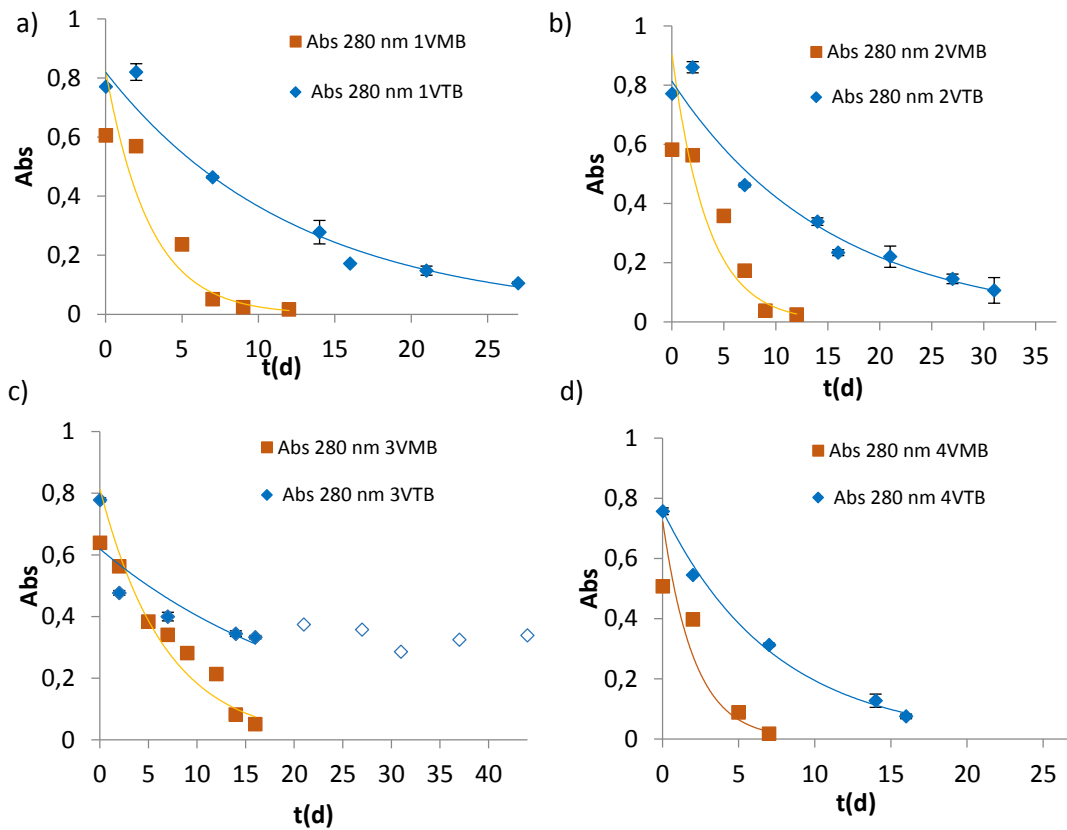


Figura 38 - Modelação da influência do teor de co-substratos na biodegradação da vanilina (Abs 280 nm) em mesófilo e termófilo nos ensaios: a) 1VMB e 1VTB. b) 2VMB e 2VTB. c) 3VMB e 3VTB. d) 4VMB e 4VTB.

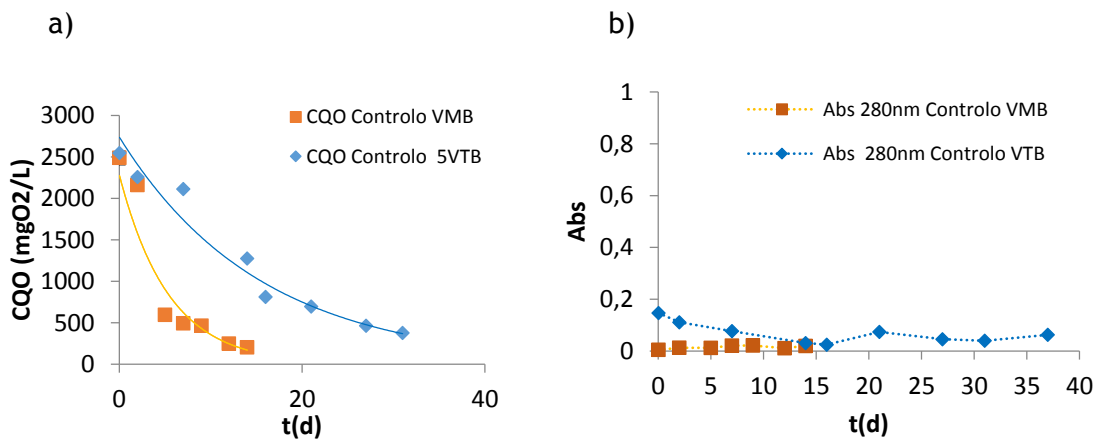


Figura 39 - a) Modelação da CQO do controlo (acetato de sódio + glucose) e b) evolução das absorvências (Abs 280nm) dos ensaios com vanilina em mesófilo e termófilo.

O efeito da adição de co-substratos não se observa de forma tão acentuada nos parâmetros da CQO (k_m e k_t), provavelmente pelo facto deste ser um parâmetro de quantificação global.

Tabela 25 - Parâmetros Cinéticos Obtidos na Análise Cinética da Biodegradação da Vanilina

Ensaio	Parâmetros de CQO				Parâmetros de Absorvência			
	Mesófilo		Termófilo		Mesófilo		Termófilo	
	R ²	k _m (d ⁻¹)	R ²	k _t (d ⁻¹)	R ²	ka _m (d ⁻¹)	R ²	ka _t (d ⁻¹)
1	0,97	0,194	0,96	0,060	0,94	0,348	0,97	0,081
2	0,98	0,225	0,97	0,062	0,90	0,239	0,98	0,066
3	0,95	0,196	0,98	0,036	0,90	0,149	0,77	0,043
4	0,96	0,214	0,92	0,057	0,94	0,486	0,99	0,136
Controlo	0,94	0,186	0,97	0,065	-	-	-	-

Os resultados mostram que os microrganismos anaeróbios metabolizam rapidamente a vanilina, mesmo não estando adaptados a esta fonte de carbono, pois neste estudo foi utilizada biomassa adaptada a glucose. Além disso o controlo (com fonte de carbono: acetato de sódio e glucose) apresenta parâmetros cinéticos de valores relativamente próximos aos obtidos nos ensaios com vanilina (Figura 39 e Tabela 25).

Para a bioeliminação da ortovanilina a modelação utilizando uma cinética de pseudo-primeira ordem não apresentou resultados tão aceitáveis (Figuras 40 e 41), tendo por base a análise dos coeficientes de determinação (Tabela 26). Saliente-se que nestes ensaios foi utilizada biomassa adaptada à vanilina, esperando-se por isso obter uma velocidade de degradação relativamente mais rápida.

Na presença de ortovanilina os coeficientes de determinação mais baixos foram obtidos para a evolução da CQO em ambos os regimes, sendo no entanto, ainda mais baixos em mesófilo. De facto a evolução da CQO indica um período inicial de diminuição relativamente lento, provavelmente por adaptação das populações microbiológicas ao novo substrato, seguindo-se uma diminuição mais acentuada numa fase posterior, o que justifica um afastamento do modelo de pseudo-primeira ordem. De forma similar, as absorvências a 280nm não apresentam valores de R² tão bons como os obtidos para os ensaios com vanilina, acompanhando em geral a evolução da CQO com o tempo de reação.

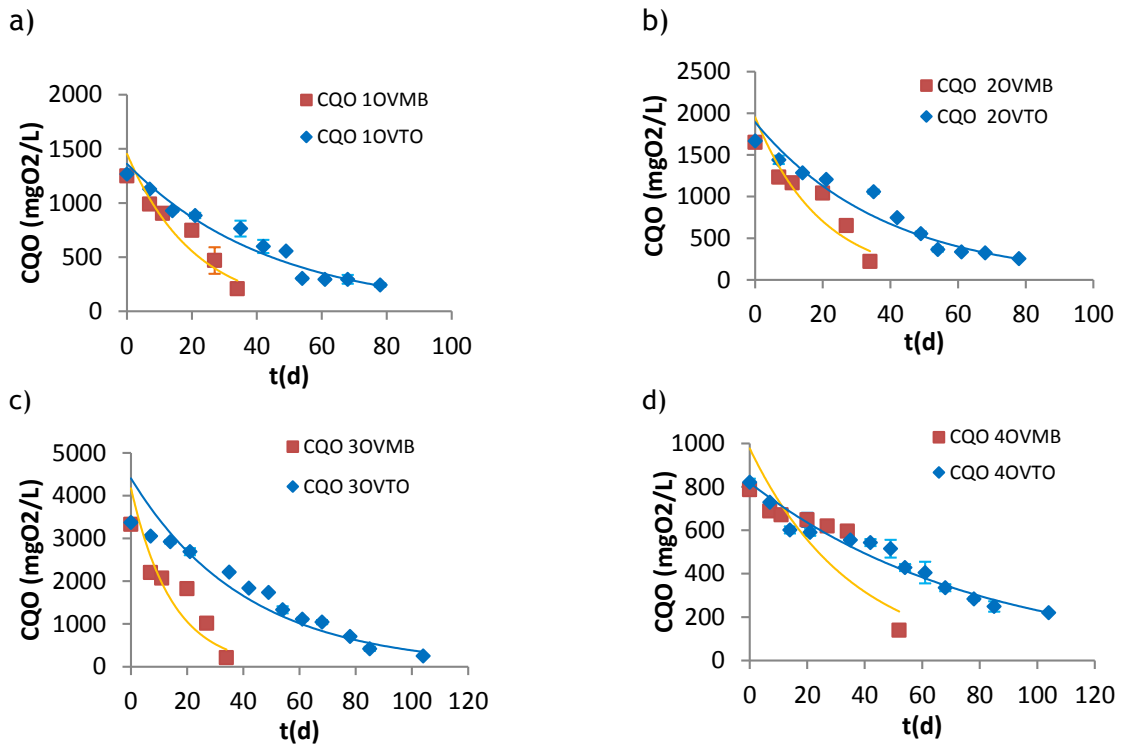


Figura 40 - Modelação da bioeliminação da ortovalina (CQO) em mesófilo e termófilo: a) 10VMB e 10VTO. b) 20VMB e 20VTO. c) 30VMB e 30VTO. e d) 40VMB e 40VTO.

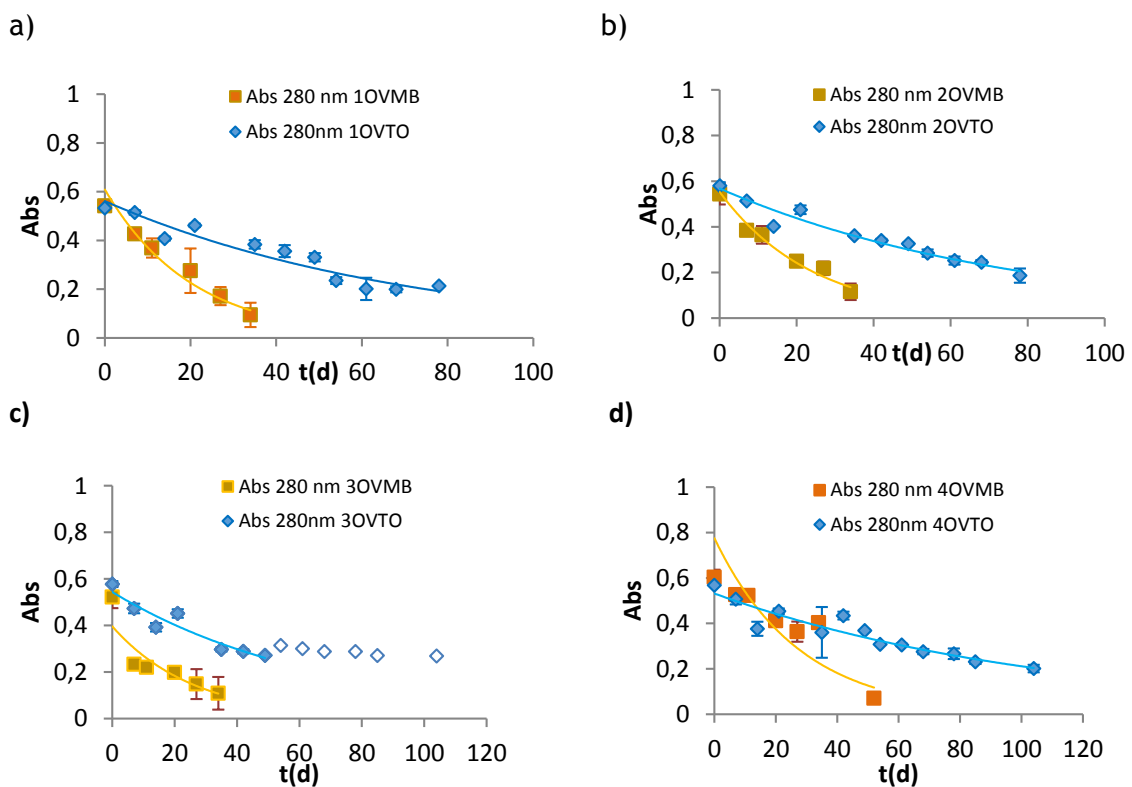


Figura 41 - Modelação da bioeliminação da ortovalina (Abs) em mesófilo e termófilo: a) 10VMB e 10VTO. b) 20VMB e 20VTO. c) 30VMB e 30VTO. d) 40VMB e 40VTO.

Relativamente à evolução das absorvências verifica-se, pelos valores de k_{am} e k_{at} , que a adição de co-substratos favorece a velocidade de remoção da ortovanilina (Tabela 26), conclusão que não pode ser admitida no estudo da vanilina.

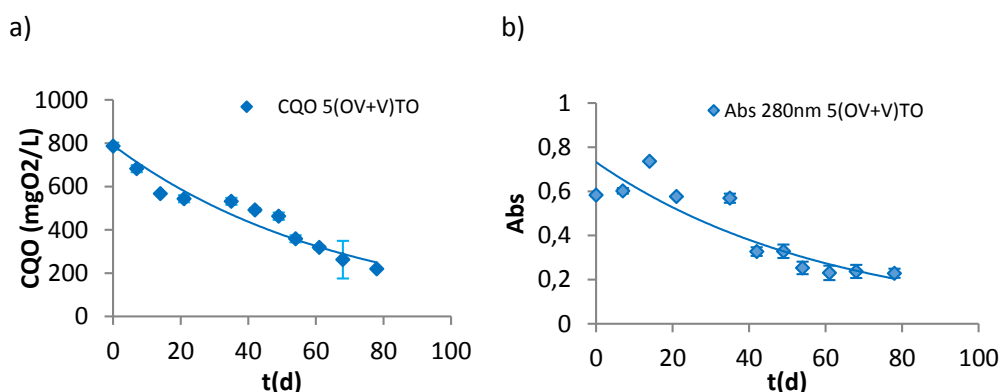


Figura 42 - a) Modelação da CQO do ensaio termófilo com mistura (50% v/v) de vanilina e ortovanilina (5(OV+V)TO). b) Modelação da absorvência para o ensaio 5(OV+V)TO.

Tabela 26 - Parâmetros Cinéticos Obtidos na Análise Cinética da Bioeliminação da Ortovanilina

Ensaio	Parâmetros de CQO				Parâmetros de Absorvência			
	Mesófilo		Termófilo		Mesófilo		Termófilo	
	R ²	k _m (d ⁻¹)	R ²	k _t (d ⁻¹)	R ²	k _{am} (d ⁻¹)	R ²	k _{at} (d ⁻¹)
1	0,89	0,048	0,94	0,023	0,96	0,049	0,90	0,014
2	0,82	0,051	0,95	0,026	0,95	0,041	0,95	0,013
3	0,79	0,069	0,95	0,024	0,87	0,038	0,88	0,015
4	0,70	0,028	0,96	0,013	0,77	0,036	0,87	0,009
5	-	-	0,93	0,015	-	-	0,85	0,016

De acordo com o obtido nos ensaios com vanilina a velocidade de remoção da ortovanilina tende a ser mais baixa em regime termófilo, embora em alguns ensaios a diferença nos valores dos parâmetros cinéticos não seja tão significativa. Em geral, a velocidade de remoção da ortovanilina é uma ordem de grandeza mais baixa do que a obtida para a vanilina, indicando claramente que a alteração do grupo substituinte OH no anel aromático da posição *para* para a posição *orto* torna o aldeído fenólico mais difícil de degradar. Este efeito também se fez sentir na degradação da mistura de vanilina e ortovanilina (Figura 42 e Tabela 26).

Apesar de ser uma modelação preliminar, observa-se claramente que é possível seguir a bioremoção de compostos aromáticos por análise da absorvência a um comprimento de onda específico.

Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras

A contribuição da biotecnologia ambiental é fundamental para o aprofundamento dos conhecimentos dos ecossistemas de tratamento biológico de efluentes e para o aumento da capacidade de controlo e monitorização da operação dos sistemas de tratamento. Neste sentido, foram realizados ensaios de biodegradação anaeróbia, em descontínuo, utilizando populações anaeróbias mistas, na presença e ausência de cosubstratos (acetato de sódio e glucose) e como substratos os compostos fenólicos vanilina, ortovanilina e 4-clorofenol.

Para os ensaios realizados com a vanilina os resultados sugerem que ambas as populações anaeróbias bacterianas mesófilas e termófilas têm capacidade de biodegradação deste composto, uma vez que se verificou a diminuição da CQO e da absorvência para todos os ensaios. Mesmo nos ensaios efetuados com ausência de cosubstratos (acetato de sódio e glucose) os resultados indicam que as populações microbianas têm capacidade de se adaptar facilmente à presença da vanilina adotando vias metabólicas que permitem a sua utilização como fonte de carbono, conseguindo desta forma reproduzir-se e sobreviver.

A presença de uma maior concentração de cosubstratos, facilmente biodegradáveis, faz com que as populações microbianas os utilizem preferencialmente em detrimento da vanilina, o que se traduz por uma diminuição da CQO e da absorvência mais lentas, pois só após algum esgotamento de cosubstratos no meio se verifica uma fase de adaptação (aclimatização) das populações microbianas e a biodegradação da vanilina como substrato alternativo.

Por outro lado, nos ensaios realizados com a ortovanilina, em regime mesófilo e termófilo, os resultados sugerem que a biodegradação é acelerada claramente pela presença de cosubstratos (acetato de sódio e glucose), verificando-se uma diminuição mais acentuada na CQO e absorvência para os ensaios com um maior teor destes cosubstratos. A presença de cosubstratos em maior concentração permite a multiplicação celular o que se reflete numa remoção de CQO muito mais eficiente e uma diminuição mais rápida da absorvência (Ferreira e Sousa, 1998; Parshina *et al*, 2000; Veeresh G.S.*et al*, 2005). Também a utilização de populações anaeróbias previamente aclimatizadas a compostos fenólicos (vanilina), parecem incrementar a biodegradação da ortovanilina, traduzido por uma taxa de remoção de CQO mais eficiente e uma diminuição mais rápida da absorvência relativamente aos ensaios realizados com populações anaeróbias não adaptadas à vanilina.

Comparativamente com a vanilina, a biodegradação da ortovanilina em regime mesófilo, assim como em regime termófilo, é mais lenta. Este facto pode dever-se à estrutura da ortovanilina que por ter um grupo OH numa ponte de hidrogénio intramolecular com o grupo aldeído, faz com que a molécula seja mais estável e dificultando a sua biodegradação (Barik *et al*, 2003).

A capacidade de adaptação das populações microbianas à presença dos compostos fenólicos, tóxicos para muitos microorganismos, também pode ter sido incrementada pelo facto de terem sido utilizadas populações anaeróbias mistas, o que aumenta a diversidade bacteriana e consequentemente a taxa de adaptação a condições de stress ambiental como por exemplo, a presença destes compostos.

A biodegradação é muito mais rápida em mesófilo comparativamente com o regime termófilo. Este facto pode dever-se não só à diferente diversidade microbiana de ambos os ecossistemas, mas também à presença de enzimas termolábeis sensíveis à temperatura (Fang *et al*, 2006; Leven e Schnurer, 2005; Leven *et al*, 2012; Monlau *et al*, 2014; Veeresh *et al*, 2005), limitando assim a biodegradação dos compostos fenólicos em termófilo.

Relativamente ao 4-clorofenol, os resultados dos ensaios abióticos e a evolução dos espectros relativos aos ensaios de biodegradação anaeróbia na presença de biomassa ativa sugerem alguma biodegradação. No entanto, para confirmar esta hipótese seria necessário a realização de mais ensaios.

Os resultados comparativos da evolução da CQO e da absorvência a um comprimento de onda específico na região do ultravioleta indicando a presença de compostos aromáticos (isto é, 254 nm ou 280 nm), mostram que é possível seguir a bioeliminação destes por um método relativamente simples e expedito, evitando-se assim, a produção de resíduos poluentes como os inerentes ao teste da CQO, bem como o consumo de reagentes.

Os ensaios abióticos corroboram existir biodegradação da vanilina e sugerem que na ortovanilina ocorrem mecanismos físico-químicos (exemplo: agregação) que afetam a velocidade de degradação.

A modelação preliminar de resultados obtidos utilizando uma equação cinética de pseudo-primeira ordem pode considerar-se aceitável para o estudo da biodegradação da vanilina em ambos os parâmetros de monitorização (CQO e absorvência). Relativamente à ortovanilina será necessário testar outros modelos, visto este não traduzir de forma aceitável a evolução dos resultados experimentais.

Assim, a digestão anaeróbia pode constituir um método de tratamento biotecnológico alternativo e/ou complementar quer aos métodos aeróbios quer aos métodos físico-químicos clássicos de tratamento de efluentes agroindustriais, uma vez que os resultados obtidos sugerem a capacidade de biodegradação dos compostos fenólicos vanilina e ortovanilina. A sua aplicação contribuirá ainda mais para aumentar a capacidade humana em despoluir eficazmente o ambiente, sem o que, com o aumento da população mundial e do setor agroindustrial, os problemas ambientais só poderão agravar-se.

Como trabalho futuro propõe-se o estudo da degradação da ortovanilina e de outros xenobióticos em conjunto (dois a três substratos), por via mesófila, na presença de outra população, nomeadamente de bactérias sulfato-redutoras e desnitrificantes. A degradação

biológica de compostos xenobióticos deverá também ser aprofundada, em particular de compostos rejeitados sistematicamente para os ecossistemas, como os compostos organoclorados.

O estudo da absorvência como medida de monitorização da carga poluente deverá ser continuada a par de parâmetros convencionais (CQO, Carbono Orgânico Total ou HPLC) tendo em vista a sua utilização futura na monitorização e estudos cinéticos, fundamentais ao dimensionamento de bioreatores.

Bibliografia

- Barakat A., Monlau F., Steyer J.P., Carrere H. (2012) “*Effect of lignin derivated and furan compounds found in lignocellulosic hydrolyzates on biomethane production*”. *Bioresource Biotechnology*. 104:90-99.
- Barik A., Priyadarsinni K.I., Mohan H. (2003) “*Redox reactions of 2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (o-vanillin) in aqueous solution*”. *Radiation Physics and Chemistry*. 70:687-696.
- Campos Luis S. (1998) “*Entender a Bioquímica*”. Escolar Editora. Capítulo 4 - Glúcidos : pp 260.
- Carvalho W., Canilha L., Feng A., Milagres A.M.F. (2009) “*Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira*”. *Química Nova* 32, 8:2191-2195
- Chandra R., Takeuchi H., Hasewaga T. (2012) “*Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production*”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16:1462-1476.
- Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S. (2008) “*Inhibition of anaerobic digestion process: a review*”. *Bioresource Technology*. 99:4044-4064.
- Clesceri, L.S., Greenberg A., Eaton A. D. (2012) “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”. APHA. 22nd Edition.
- Collard F. X. e Blin J. (2014) “*A review on pyrolysis of biomass constituents: mechanism and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicellulose and lignin*”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 38:594-608.
- Crespi M. e Huertas J.A. (1984) “*Determinacion simplificada de la demanda química de oxigeno por el método del dicromato*”. *Tecnologia del Agua*. 13:35-40.
- Fang H.H.P., Liang D.W., Zhang T., Liu Y. (2006) “*Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition*”. *Water Research*. 40:427-434.
- Ferreira W. e Sousa J.C. (1998) “*Microbiologia*”. Edições Lidel. Volume I. Capítulo 2:16,91
- Guilherme V. (2012) “*Biodegradação anaeróbia do bagaço da azeitona*”. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Hoyos - Hernandez C., Hoffman M., Guenne A., Mazeas L. (2013) “*Elucidation of the thermophilic phenol biodegradation pathway via benzoate during the anaerobic digestion of municipal solid waste.*” *Chemosphere*. 97:115-119.
- Huang Q., Cao M., Ai Z., Zhang I. (2014) “*Reactive Oxygen Species dependent degradation pathway of 4-chlorophenol with Fe-Fe₂O₃ core shell nanowires*”. *Applied Catalysis B: Environmental*. 162:319-326

- Karmakar B., Vohra R.M., Nandanwar H., Sharma P., Gupta K.G., Sobti; R.C. (2000) “*Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaicol and vanillin by a newly isolated strain of Bacillus coagulans*”. *Journal of Biotechnology*. 80:195 - 202.
- Leven L e Schnurer A. (2005) “*Effects of temperature on biological degradation of phenols, benzoates and phthalates under methanogenic conditions*”. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 55:153-160
- Leven L., Nyberg K., Schnurer A. (2012) “*Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste - a review of important microorganisms and impact of temperature.*” *Journal of Environmental Management* 95:S99-S103.
- Li H., Shen T.T., Wang X.L., Li K.F., Liu Y.D., Lu S.G., Gu J.D., Wang P., Lu Q., Du X.M. (2013) “*Biodegradation of perchloroethylene and chlorophenol co-contamination and toxif effect on activated sludge performance*”. *Bioresource Technology*. 137:286-293.
- Liu Y., Liu J., Li C., Wen J., Ban R., Jia X. (2014) “*Metabolic profiling analysis of the degradation of phenol and 4-chlorophenol by Pseudomonas sp cbp 1-3*”. *Biochemical Engineering Journal*. 90:316-323.
- Lopes L. (2005) “*Biodegradação anaeróbia de poluentes têxteis em sistemas mesófilos e termófilos*”. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Kang S., Li X., Fan J., Chang J. (2013) “*Hydrothermal conversion of lignin: a review*”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27:546-558
- Lima Nelson e Mota Manuel (2003) “*Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*”. Edições Lidel. Pp 291, 292, 314, 315.
- Monlau F., Sambusiti C., Barakat A., Quéméneur M., Trably E., Steyer J-P, Carrère H., (2014) “*Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review*” *Biotechnology Advances*.
- Moussavi G., Ghodrati S., Bandpei A.M. (2014) “*The biodegradation and COD removal of 2-chlorophenol in a granular anoxid baffled reactor*”. *Journal of Biotechnology*. 184:111-17.
- Munoz M., Zahara M.P., Casas J.A., Rodriguez J.J. (2013) “*Improved wet peroxide oxidation strategies for the treatment of chlorophenols*” *Chemical Engineering Journal* 228:646-654
- Nordin K. (2004) “*4-Chlorophenol biodegradation by Arthrobacter clhorophenicus A6*”. Dissertação de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biofísica. Universidade de Estocolmo.
- Parshina S.N., Kleerebezem R., Kempen E. van, Nozhevnikova A.N., Lettinga G., Stams, A.J.M. (2000) “*Benzaldehyde conversion by two anaerobic bactéria isolated from an upflow anaerobic sludge bed reactor*”. *Process Biochemistry*. 36:423-429.

- Peng P. e She D. (2014) "*Isolation structural characterization and potential applications of hemicellulose from bamboo: a review*". Carbohydrate Polymers. 112:701-720.
- Penttinen O.P. (1995) "*Chlorophenols in aquatic environments: structure activity correlations*". Finnish Zoological and Botanical Publishing Board. Volume -32:287-294.
- Puyol D., Sanz J.L., Rodriguez J.J., Mohedano A.F. (2012) "*Inhibition of methanogenesis by chlorophenols: a kinetic approach*" New Biotechnology. Volume 30, Número 1.
- Quemeneur M., Hamelin J., Barakat A., Steyer J.P., Carrere H., Trabbly E. (2012) "*Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose derived compounds in mixed cultures*". International Journal of Hydrogen Energy. 37:3150-3159.
- Risberg K., Sun L., Leven L., Horn S.J., Schurer A. (2013) "*Biogas production from wheat straw and manure: impact of pretreatment and process operating parameters*". Bioresource Technology. 149:232-237.
- Shaikh A.U., Sorrels C.A., Samokyszyn V.M. (2002) "*Oxidation-reduction characteristics of chlorophenols in a aprotic medium*". Journal of the Arkansas Academy of Science. Volume 56.
- Veeresh G.S., Kumar P, Mehrotra I. (2005) "*Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review*". Water Research. 39:154-170.
- Velcheva, E.A. e Stamboliyska B.A. (2003) "*IR spectral and structural changes caused by the conversion of 3-methoxy-4hydroxybenzaldehyde (vanillin) into the oxyanion*" Spectrochimica Acta Part A. 60:2013-2019.
- Villareal M.O., Hernandez E.A., Arispuro I.V., Tellez M.A.M. (2012) "*Plant cell Wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives*". InTech. Chapter 4.
- Walton N. J., Mayer M.J., Narbad A. (2003) "*Vanillin*" Phytochemistry. 63:505-515.
- Wiegant, W.M e Lettinga G. (1985) "*Thermophilic anaerobic digestion of sugars in upflow anaerobic sludge blanket reactors*". Biotechnology and Bioengineering. 21:1605-1607.

Cibergrafia

<http://www.apren.pt/pt/> consultado a 01/08/2014