



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Tratamento de águas da cozedura da cortiça através de Leitos de Macrófitas

**Williams José Goes da Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Arlindo Gomes  
Coorientador: Prof. Doutor Rogério Simões

**Covilhã, junho de 2013**



# Dedicatória

Aos meus pais, irmão e à Joana.



# Agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com o contributo de várias pessoas às quais gostaria de deixar um sincero agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço à minha família, pela ajuda e carinho que me têm dado, em especial ao meu Irmão, aos meus Pais e ao meu Avô Agostinho, pelo apoio incondicional, por tudo o que abdicaram para que pudesse chegar até aqui e por me terem ensinado desde pequena os valores que hoje definem aquilo que sou.

À Joana por ter estado sempre presente, e apoiando-me sempre que necessitei, pelo amor e carinho que me tem dado ao longo destes anos.

Um profundo agradecimento ao Professor Doutor Arlindo Gomes, por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela valiosa orientação científica, incentivo e disponibilidade. Agradecer também ao Professor Doutor Rogério Simões por toda a disponibilidade, entusiasmo e conhecimentos transmitidos.

Agradeço também aos meus Amigos, Bruno, Luís, Hugo, Ricardo, Samuel, “Zé” António e “Zé” Carlos por todos os momentos que passámos juntos, por estarem sempre presentes na minha vida e me terem ajudado a ultrapassar várias etapas da minha vida.

Quero agradecer aos meus colegas de laboratório, Diana e Roberto, pela disponibilidade e ajuda.

Agradecer à Universidade da Beira Interior, à Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros (UMTP) e ao Departamento de Química por me terem disponibilizado todas as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.



## Resumo

A operação de cozimento da cortiça, destinada à purificação da matéria-prima, requer elevados consumos específicos de água e origina um efluente de cor escura intensa, composição complexa e elevada carga orgânica. O impacto ambiental desta atividade é agravado pela dificuldade no tratamento deste efluente através dos processos convencionais de depuração, nomeadamente os baseados no tratamento biológico, devido à elevada carga orgânica com carácter recalcitrante e tóxico. Os efluentes utilizados nesta investigação apresentam elevadas cargas orgânicas, com CQO de cerca 1 756 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, concentração de fenóis totais de 182,6 mg ácido tânico L<sup>-1</sup>, e uma coloração castanho-escura intensa. Este efluente caracteriza-se também pela sua reduzida biodegradabilidade, com valores de 0,30 e 0,44 para as razões CBO<sub>5</sub>/CQO e CBO<sub>20</sub>/CQO, respetivamente.

A presente dissertação incide sobre o estudo da tecnologia de leitos de macrófitas, nomeadamente sobre a influência da vegetação na remoção de matéria orgânica.

O trabalho desenvolvido incluiu a implementação de uma instalação experimental de dois leitos de macrófitas de escoamento sub-superficial com fluxo horizontal à escala piloto, com a monitorização de dados físico-químicos (pH, temperatura e potencial redox,), CQO, CBO (5 e 20), fenóis totais, compostos aromáticos e coloração.

Efetuarão-se adaptações sucessivas dos leitos a diferentes cargas orgânicas de efluentes de modo a preparar os leitos para a depuração de efluentes reais da cozedura da cortiça.

As remoções obtidas no tratamento para o efluente de maior carga orgânica (5,4 g CQO m<sup>-2</sup> L<sup>-1</sup>) foram 60% para o CQO, 86% para a CBO<sub>5</sub> e 82% para a CBO<sub>20</sub>, 48% para os fenóis totais e 31% para os compostos aromáticos LC. É de salientar que para esta carga orgânica não se verificou a remoção da cor.

## Palavras-chave

Leitos de macrófitas; Efluente do cozimento da cortiça; Biodegradabilidade.



# Abstract

The cork boiling operation, for the purification of the raw material, has a high specific water consumption and form an effluent with a strong dark color, a complex composition and a high organic load. The environmental impact of this activity is aggravated by the difficulty to made the treatment of this effluent through conventional purification processes, including those based on biological treatment due to the high organic load with a toxic and recalcitrant nature.

The effluents used in this investigation have high organic loads, with a COD around 1 756 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, a concentration of total phenols of 182.6 mg tannic acid L<sup>-1</sup> and an intense dark brown staining. The effluent is also characterized by their low biodegradability, with values of 0.30 and 0.44 for reasons CBO<sub>5</sub>/CQO and CBO<sub>20</sub>/CQO, respectively.

This dissertation will go focus the study of the technology of constructed wetlands, in particularly the influence of vegetation in removing organic matter.

The work included the implementation of experimental two constructed wetlands with horizontal subsurface flow at pilot scale, with monitoring of physicochemical data (pH, temperature and redox potential), CQO, CBO (5 and 20), total phenols, aromatic compounds and staining.

Successive adaptations have been made in constructed wetlands at different organic loads in order to prepare them for the purification of real effluents from cork boiling water.

The removal obtained for the effluent with the highest organic load (5.4 g COD m<sup>-2</sup> L<sup>-1</sup>) were 60% CQO, 86% to BOD<sub>5</sub> and 82% BOD<sub>20</sub>, 48% to total phenol and 31% for aromatic compounds. For this organic load has not occurred color removal.

## Keywords

Constructed Wetlands; boiling cork water; Biodegradability.



# Índice

1. Introdução .....	19
2. Revisão Bibliográfica .....	21
2.1 Processo de transformação da cortiça .....	21
2.2 Características do efluente da cozedura da cortiça .....	21
2.3 Processos de depuração Físico-químicos .....	23
2.4 Processos de depuração Biológicos .....	24
2.5 Leitos de Macrófitas: descrição geral .....	25
2.6 Aplicabilidade .....	27
2.7 Componentes do sistema .....	28
2.8 Tipos de sistemas .....	30
2.8.1 Escoamento superficial .....	31
2.8.2 Escoamento Sub-superficial .....	31
2.9 Processos de transformação .....	33
3. Materiais e Métodos .....	35
3.1 Descrição da instalação dos leitos de macrófitas .....	35
3.2 Modo de operação .....	37
3.3 Amostragem e conservação da amostra .....	39
3.4 Recolha e Conservação do Efluente de Cozedura da Cortiça .....	39
3.5 Determinações analíticas e Procedimentos .....	39
3.6 Reagentes .....	41
3.7 Recolhas e manutenção da biomassa .....	41
4. Resultados e discussão .....	43
4.1 Caracterização do efluente do cozimento da cortiça .....	43
4.2 Adaptação dos leitos de macrófitas ao efluente .....	44
5. Considerações finais .....	57
5.1 Perspetivas futuras .....	58
Bibliografia .....	61



# Lista de Figuras

Figura 2.1 - Perfil transversal típico de uma zona húmida natural - tipos de macrófitas .....	29
Figura 2.2 - Classificação dos leitos de macrófitas. ....	30
Figura 2.3 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento superficial [73]. ....	31
Figura 2.4 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento sub-superficial vertical descendente [73]. ....	32
Figura 2.5 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento sub-superficial horizontal [73].....	32
Figura 3.1 - Representação esquemática dos leitos; A) esquema do leito com macrófitas, <i>Phragmites australis</i> , (LM) e as suas dimensões; B) esquema leito sem macrófitas (LC) e as suas dimensões. ....	35
Figura 3.2 - grânulos de LECA no leito. ....	36
Figura 3.3 - <i>Phragmites australis</i> recém-plantadas no leito (primeiro plano LM e em segundo LC).....	37
Figura 4.1 - Evolução temporal dos valores de pH do afluente e do efluente dos leitos, Etapa 1. ....	46
Figura 4.2 - evolução temporal do potencial redox no interior dos leitos, Etapa 1. ....	46
Figura 4.3 - Evolução temporal da CQO do afluente e do efluente dos leitos e a sua remoção, Etapa 1.....	47
Figura 4.4 - Evolução temporal dos valores de pH de afluente e efluente dos leitos nas etapas de adaptação. ....	50
Figura 4.5 - Evolução temporal dos valores de potencial redox no interior dos leitos nas etapas de adaptação. ....	51
Figura 4.6 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) CQO de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da CQO remoção.....	51
Figura 4.7 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) CBO <sub>5</sub> de afluente e efluente dos leitos; B) CBO <sub>20</sub> de afluente e efluente dos leitos. 2.....	52
Figura 4.8 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) CBO <sub>5</sub> /CQO de afluente e efluente dos leitos; B) CBO <sub>20</sub> /CQO de afluente e efluente dos leitos. ....	53
Figura 4.9 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Fenóis totais de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Fenóis totais. ....	54
Figura 4.10 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Abs254 nm de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Abs254 nm. ....	55
Figura 4.11 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Abs580 nm de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Abs580 nm. ....	55



## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Características das águas da cozedura da cortiça [14].....	22
Tabela 2.2 - Aplicações de vários processos de TM para tratamento de águas da indústria corticeira e a sua eficiência. ....	23
Tabela 2.3 - Aplicações de vários processos de oxidação para tratamento de águas da cozedura da cortiça. ....	24
Tabela 2.4 - Principais vantagens e desvantagens dos leitos de macrófitas.....	26
Tabela 2.5 - Os mecanismos de remoção de compostos poluentes nos LM.....	33
Tabela 3.1 Meio de cultura utilizado na etapa de colonização/alimentação .....	38
Tabela 4.1 - Resultados da caracterização do efluente do cozimento da cortiça. ....	43
Tabela 4.2 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a etapa. ....	45
Tabela 4.3 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a Etapa 2. ....	48
Tabela 4.4 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a Etapa 3. ....	49



# Lista de Acrónimos

A254	Absorvência a 254 nm, compostos aromáticos;
A580	Absorvência a 580 nm, cor;
CBO	Carência Bioquímica de Oxigênio;
CBO <sub>20</sub>	Carência Bioquímica de Oxigênio ao fim de 20 dias de incubação;
CBO <sub>5</sub>	Carência Bioquímica de Oxigênio ao fim de 5 dias de incubação;
COT	Carbono Orgânico Total;
CQO	Carência Química de Oxigênio;
Ft	Fenóis totais
LC	Leito Controlado
LM	Leito de macrófita
LM-ES	Leito de escoamento superficial
LM-ESS	Leito de escoamento sub-superficial
LM-ESSH	Leito de escoamento sub-superficial horizontal
LM-ESSV	Leito de escoamento sub-superficial vertical
MF	Microfiltração
NF	Nanofiltração
ORP	Potencial redox (do inglês <i>oxidation reduction potential</i> )
SST	Sólidos Suspensos Totais
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
TM	Tratamento por membranas
TRH	Tempo de retenção hidráulico
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta



# 1. Introdução

A cortiça é extraída de forma sustentável do sobreiro (*Quercus suber L.*), uma árvore característica das regiões mediterrânicas, onde este tipo de ecossistema, o montado de sobro, ocupa cerca de 730 mil hectares. Estima-se que em Portugal sejam atualmente explorados cerca de 34% da área total, a que corresponde uma produção média anual de 150 mil toneladas, ou sejam aproximadamente 52% da produção mundial. Em termos da indústria transformadora, a posição de Portugal é ainda mais relevante já que 60% da matéria-prima é processada por empresas nacionais, as quais exportam 90% da cortiça transformada. Tradicionalmente, a cortiça com melhor qualidade destina-se à produção de rolhas, estimando-se que seja utilizada cerca de 40% da matéria-prima, a que corresponde a dois terços das vendas [1]. Assim, apesar do desenvolvimento de outros produtos, nomeadamente para isolamento, conserva-se uma forte dependência das atividades de produção e transformação da cortiça relativamente à aceitação das rolhas como vedante em detrimento de produtos sintéticos.

O processo de transformação da cortiça envolve o uso de grandes quantidades de água e consequentemente uma elevada produção de águas residuais. Estima-se que sejam consumidos 400 L de água por tonelada de cortiça processada na etapa de purificação da matéria-prima, designada por cozimento, a qual tem como objetivo principal a purificação da matéria-prima, a qual é mergulhada em água quente (temperatura entre 95 a 105°C) durante uma hora. Este tratamento permite a extração de compostos fenólicos e taninos, nomeadamente do 4,6-tricloroanisol (TCA) e pentaclorofenol, os quais são suscetíveis de migrar das rolhas para o vinho, promovendo a sua degradação. De modo a garantir a qualidade das rolhas as indústrias limitaram o número de ciclos de reutilização da água quente. O impacto ambiental desta atividade é agravado pelo facto do tratamento deste efluente ser difícil de obter através dos processos convencionais de depuração, nomeadamente os baseados no tratamento biológico, devido à elevada carga orgânica com carácter recalcitrante e tóxico.

Atualmente, ainda não existe uma opção de depuração com viabilidade técnica e económica suficiente para permitir a sua implementação universal, verificando-se nalguns casos a descarga dos efluentes em meios recetores naturais sem terem sido sujeitos a tratamento prévio. Este cenário é agravado pelo facto de predominarem no sector empresas de pequena dimensão, com caudais de água residuais baixos e descontínuos [2,3].

Com base nestas premissas é necessário estudar opções de tratamento dos efluentes resultantes da cozedura da cortiça que permitam reduzir o impacto ambiental e que salvaguardem a aceitação da cortiça como material de referência na produção de vedantes de vinhos e bebidas espirituosas.

A presente dissertação incide sobre o estudo da tecnologia de leitos de macrófitas, nomeadamente sobre a influência da vegetação na remoção de matéria orgânica. Este tipo de tecnologia de tratamento pode trabalhar a caudais de água residuais baixos e descontínuos, e tem mostrado um bom desempenho no tratamento de uma grande gama de águas residuais.

O presente trabalho é constituído por 5 capítulos:

1. A “Introdução” onde será feita uma contextualização do trabalho;
2. A “Revisão bibliográfica”, que reúne a informação mais relevante sobre a produção e transformação da cortiça, caracterização do efluente do cozimento da cortiça e dos resultados obtidos de depuração por diversas tecnologias;
3. Os “Materiais e Métodos” onde serão apresentados os métodos analíticos, procedimentos, materiais e equipamentos utilizados em cada etapa deste estudo;
4. Os “Resultados experimentais: tratamento e discussão”, onde serão apresentados e discutidos os resultados obtidos;
5. As “Considerações finais” onde serão evidenciadas as principais conclusões obtidas e apresentadas algumas sugestões para um trabalho futuro.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Processo de transformação da cortiça**

A cortiça apresenta propriedades únicas como a sua leveza, impermeabilidade a líquidos e gases, elasticidade, compressibilidade além da capacidade de funcionar como isolante térmico e acústico. Apesar do seu potencial para ser utilizada na construção civil, indústria aeroespacial e automóvel, inclusive para fins artísticos como design e moda a sua principal aplicação atual continua a ser as rolhas de cortiça destinadas à indústria vinícola [4,5].

Após a extração do sobreiro, a cortiça não tem a elasticidade necessária para ser transformada e, além disso, está contaminada com fungos e insetos. Assim sendo, este material tem de sofrer um tratamento que permita aumentar a sua elasticidade, reduzir a porosidade assim como eliminar microrganismos e contaminantes. Esta operação começa por um período de repouso, após o descortiçamento, de vários meses em empilhamento com exposição ao ar. Durante este tempo ocorre a redução do teor de água das pranchas de cortiça, dá-se a “cura” da cortiça (perde a sua seiva) e ocorre também oxidação polifenóis, provocando o aumento da estabilidade da sua estrutura [6].

Após o período de repouso as pranchas brutas são submetidas a uma operação de cozedura com água, por tratamento em tanques ou autoclaves com água em ebulição durante aproximadamente uma hora ou hora e meia. A cozedura altera algumas propriedades físico-químicas da cortiça, nomeadamente aumenta a espessura, tornando-a suficientemente macia e flexível para o seu processamento posterior. Nesta fase de cozedura da cortiça há também solubilização de uma pequena fração de compostos extratáveis da cortiça, particularmente taninos [6,7]. Além disso proporciona a destruição de fungos, bicho da cortiça e outros insetos. Esta água pode ser utilizada para várias cozeduras sendo no final despejada na totalidade [6].

Segue-se um período de estabilização da cortiça para se conseguir o aplanamento das pranchas de cortiça, estabilização dimensional e redução da humidade. A duração do repouso varia significativamente dependendo da indústria ser preparadora ou também fazer a brocagem de rolhas. Após o repouso, a cortiça é classificada por grupos de calibres e por classe de qualidade. Nestas fases estão envolvidas quatro operações: o traçamento, o recorte, a calibragem e a classificação, a qual permite separar as pranchas em classes de qualidade [7,8].

### **2.2 Características do efluente da cozedura da cortiça**

Os efluentes produzidos pela indústria corticeira resultam principalmente dos processos de cozedura da cortiça e da lavagem das rolhas. A água utilizada na operação de cozedura é reutilizada várias vezes até à sua saturação e consequente escurecimento tendo então que ser substituída. Nesta operação estima-se que sejam utilizados cerca de 400 L água por tonelada de cortiça preparada [6,9,10]. O efluente resultante do processo de cozedura apresenta uma carga

poluente elevada que deriva da extração aquosa a quente das substâncias solúveis em água, nomeadamente compostos fenólicos, aminoácidos e outros compostos extratáveis [6,7]. Os compostos de difícil degradação que são libertados no efluente derivam da cozedura do material lenhoso e incluem ácidos fenólicos (gálico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico), taninos, TCA e pentaclorofenol. Os ácidos carboxílicos (ácidos polifenólicos) contribuem para a acidificação do meio, verificando-se que estes efluentes apresentam, em média, um pH da ordem de 4,6, inferior ao permitido para a descarga (6,0) [6,11].

Tabela 2.1 - Características das águas da cozedura da cortiça [11].

Parâmetro	Expressão dos	Valores Médios <sup>1)</sup>	Valores Médios <sup>2)</sup>	Valor Máximo
pH	Escala Sörensen	4,5 - 5,5	4,62	6,0 - 9,0
CBO <sub>5</sub> <sup>4)</sup>	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	1 100 - 1 800	1124	40
CQO <sup>5)</sup>	mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>	4 500 - 5 500	5093	150
SST <sup>6)</sup>	mg L <sup>-1</sup>	500 - 1 000	1775	150
Cobre Total	mg Cu L <sup>-1</sup>	0,4 - 0,7	0,6	1,0
Ferro total	mg Fe L <sup>-1</sup>	5 - 6	6,4	2,0
Cheiro		Detetável na	Detetável na	Não detetável na
Cor		Visível na diluição	Visível na diluição	Não visível na
Fenóis	mg fenol L <sup>-1</sup>	0,4 - 0,7	0,6	0,5
Polifenóis	mg ácido tânico L <sup>-1</sup>	600 - 900	857	

1) ANIEC - Associação Nacional dos Industriais e Exportadores da Cortiça; 2 ) CTCOR - Centro Tecnológico da Cortiça; 3) Decreto-lei nº 236/98; 4) Carência Bioquímica de Oxigénio; 5) Carência Química de Oxigénio; 6) Sólidos Suspensos totais.

Atendendo as características deste efluente industrial pode observar-se a presença de valores superiores aos permitidos (Decreto-lei nº 236/98) para a descarga. Antes da descarga, este efluente deverá proceder-se ao seu arrefecimento e pré-tratamento. Devido à baixa biodegradabilidade (baixa razão de CBO<sub>5</sub>/CQO), geralmente, deverá proceder-se a um tratamento físico-químico do efluente seguido de um tratamento biológico, que poderá ser realizado em estações de tratamento de águas residuais (ETAR) própria ou camarária [9,11].

## 2.3 Processos de depuração Físico-químicos

O tratamento mais comum aplicado para este tipo de efluente é a remoção prévia da matéria orgânica por coagulação/floculação com ou sem flutuação, permitindo a posterior instalação de um processo biológico. Outros processos utilizados são a purificação por membranas e a oxidação química (por reagente de Fenton, ou ozonização), bem como os Processos de Oxidação Avançados.

Alguns processos de tratamento por membranas (TM) já foram testados no tratamento de águas residuais da indústria corticeira, como são os casos da microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF).

**Tabela 2.2** - Aplicações de vários processos de TM para tratamento de águas da indústria corticeira e a sua eficiência.

Parâmetro	Remoção/Redução				
	MF	UF		NF	
CQO	17-41%	17-41%	40-91%	94-96%	
A254 nm	27-54%	27-54%			
Cor	47-85%	47-85%	61-99%	100%	
Taninos	21-48%	21-48%	64-91%	90- 94%	
Ácido elágico	41-98%	41-98%			
COT			38-85%	94-96%	95%
CBO <sub>5</sub>			37-88%	86-93%	
Referência	[13]	[13]	[12]	[12]	[14]

A principal vantagem dos processos de separação baseados em membranas é permitirem a recuperação de água (permeado) com qualidade suficiente para reutilização na operação ou substituir o consumo de água fresca noutras utilizações. Contudo, apresentam elevados custos de equipamento e consumos energéticos, para além dos problemas originados pela colmatação rápida das membranas [15]. Os problemas de colmatação podem ser minimizados por pré-tratamentos químicos, mas isto reduz o tempo de vida útil da membrana.

Existem vários processos de oxidação e oxidação avançados que têm sido utilizados para este tipo de efluente, nomeadamente a oxidação simples por ozono (O<sub>3</sub>) ou combinado a ultravioleta (UV) e/ou peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxidação por reagente de Fenton (Fe<sup>2+</sup> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Foto-Fenton (Fe<sup>2+</sup> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV).

**Tabela 2.3** - Aplicações de vários processos de oxidação para tratamento de águas da cozedura da cortiça.

Parâmetro	Remoção/Redução					
	Fe <sup>2+</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /UV	O <sub>3</sub>	O <sub>3</sub> /UV	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
CQO	17-92%	91%	42-76%	98%	76-80%	98%
A254 nm			91-96%	99%	91-95%	100%
Ácido cafeico			80-99%	100%	95-97%	99%
Referência	[16]	[18]	[17]	[17]	[17]	[17]

Também já foram estudadas combinações de processos de oxidação com outras técnicas, como Fe<sup>2+</sup>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e processos de coagulação/floculação [19] ou tratamento biológico. Combinações de oxidação simples por O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/UV e O<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com MF e UF também já foram testadas [20]. Como principais vantagens dos processos de oxidação destacam-se as taxas de reação elevadas, capacidade para reduzir a toxicidade e possível mineralização dos compostos orgânicos tratados. As desvantagens associadas a estes processos são os custos de operação e manutenção poderem ser elevados, ocorrência de formação de bromatos e a eficiência do processo pode ser comprometida pela interferência de compostos [21,22].

## 2.4 Processos de depuração Biológicos

Os organismos vivos podem ser utilizados na degradação (biodegradação) de compostos orgânicos presentes na água, nomeadamente bactérias, fungos, plantas, algas verdes ou as suas enzimas. O processo metabólico que tem mostrado maior aptidão na degradação de compostos orgânicos poluentes nos processos de biorremediação é o microbiano [23].

A biorremediação é o conceito utilizado para definir um processo no qual organismos vivos como bactérias, fungos, plantas, algas verdes ou as suas enzimas são utilizados para diminuição, ou mesmo eliminação, de compostos orgânicos poluentes transformando-os em compostos de baixa toxicidade [24].

A estrutura química dos poluentes orgânicos influencia a metabolização destes através de microrganismos, especialmente com respeito às taxas e à extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são facilmente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (difícil degradação) [25].

Se as enzimas que catabolizam a degradação de compostos naturais possuem uma baixa especificidade pelo seu substrato, os xenobióticos com estrutura química semelhante a estes compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sistema ativo da enzima e deste modo aproveitados pelo microrganismo como fonte de nutrientes e energia [23].

A degradação dos compostos poluentes ocorre através de reações bioquímicas mediadas pelos microrganismos. De uma forma geral, um composto orgânico quando é oxidado perde eletrões para um recetor final de eletrões, que é reduzido. O oxigênio atua de uma forma geral como

recetor final de eletrões, sendo que a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular é chamada de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, aquando da ausência de oxigênio, os microrganismos podem usar compostos orgânicos ou iões inorgânicos como recetores finais de eletrões, condições anaeróbias [25,26,27].

A população microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos atua num processo denominado co-metabolismo. Neste processo os microrganismos são divididos em primários e secundários. Os microrganismos primários são aqueles que conseguem metabolizar o substrato principal fornecido pelo sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal mas sim os produtos libertados pelos microrganismos primários [28].

Processos de Biorremediação têm sido utilizados no tratamento de efluentes domésticos obtendo eficiências de 88% na remoção da matéria orgânica [29] e em efluentes industriais, como indústrias têxteis com remoções da matéria orgânica acima dos 98% [30].

Os processos de biorremediação têm sido estudados no tratamento de águas residuais da indústria corticeira, geralmente são utilizados como processos complementares, como por exemplo, a processos de oxidação [31,32]. Contudo, e apesar da baixa biodegradabilidade deste tipo de águas residuais [33], existem estudos de destoxificação/degradação através de microrganismos apresentando uma redução da carga orgânica entre 50 e 70% [11,33].

A biorremediação oferece várias vantagens comparativamente às técnicas físico-químicas convencionais. A vantagem mais atrativa desta técnica consiste na sua aplicação *in-situ*, causando uma perturbação mínima do sistema. Outra grande vantagem corresponde à capacidade extensiva de degradação de compostos sintéticos por parte dos microrganismos, o que permite a aplicação desta técnica em locais contaminados por vários poluentes. É capaz de tratar contaminantes diluídos, requer investimentos baixos, tem uma ação moderadamente rápida e pode ser aplicada em simultâneo com outros tratamentos físicos e químicos [24]. Este processo também evita a transferência de contaminantes de um meio para outro, por exemplo, da terra para a água ou o ar, pode ocorrer a destruição completa dos compostos poluentes [25].

Como principais desvantagens deste método de tratamento considera-se o facto de alguns contaminantes não poderem ser biodegradados, o próprio metabolismo de certos microrganismos poder levar à produção de compostos tóxicos e a biorremediação requer mais tempo do que outras opções alternativas de tratamento [24].

## **2.5 Leitos de Macrófitas: descrição geral**

Os leitos de macrófitas, também designadas por “zonas húmidas construídas”, é um sistema de tratamento de águas residuais que combina processos físicos, químicos e biológicos [34]. Este tipo de processo de tratamento tem como fundamento os fenómenos de depuração que ocorrem as zonas húmidas naturais (“wetlands”). Dentro das zonas húmidas naturais estão

englobados vários grupos de ecossistemas como águas temporariamente estagnadas, pântanos, margens de lagos e rios, entre outros. Todas as zonas húmidas, quer naturais quer construídas, têm uma característica comum que é a presença de água à superfície ou próximo da superfície, pelo menos periodicamente. As zonas húmidas naturais apresentam condições ideais para o crescimento de microrganismos que, pelas suas características, são capazes de utilizar os compostos presentes na água para o seu crescimento e reprodução. Os leitos de macrófitas de origem natural, as zonas húmidas na qual estão presentes espécies de plantas hidrófitas (ou macrófitas aquáticas), são áreas cujo solo está saturado permanentemente ou conforme a estação do ano [35].

Os leitos de macrófitas são normalmente utilizados como tratamento secundário, para complementar o tratamento primário, mas também podem ser utilizados para tratamento terciário [34]. Geralmente, os sistemas de tratamento de águas residuais utilizando leitos de macrófitas são compostos por dispositivos para tratamento preliminar, tratamento primário e tratamento secundário. O dispositivo de tratamento preliminar é geralmente composto por uma grelha para remover os sólidos suspensos de maior dimensão. O tratamento primário é assegurado por um dispositivo de decantação e de flotação. Este dispositivo reduz a concentração de alguns poluentes e contaminantes mas também evita a colmatação sub-superficial do leito, aumentando deste modo o seu período de funcionamento. O tratamento secundário é assegurado por um ou mais leitos de macrófitas constituídos pelo material de enchimento, natural ou artificial, que para além do seu papel como filtro serve também de suporte às plantas e aos microrganismos, alguns deles responsáveis pelo processo de biodegradação da matéria orgânica [36].

Na tabela 2.4 podem observar-se as principais vantagens e desvantagens da utilização de leitos de macrófitas para o tratamento de águas residuais.

**Tabela 2.4** - Principais vantagens e desvantagens dos leitos de macrófitas [34,35].

Vantagem	Desvantagem
Custos de construção e operação relativamente baixos comparativamente com os sistemas convencionais (como por exemplo lamas ativadas ou leitos percoladores)	Necessidade de maiores áreas para implantação que os sistemas convencionais como as lamas ativadas ou leitos percoladores
Necessidade de menores áreas para implantação que os sistemas de lagunagem de estabilização (sem plantas)	Colmatação do leito devido à presença de elevadas concentrações de matéria orgânica e matéria sólida

**Tabela 2.4** - Principais vantagens e desvantagens dos leitos de macrófitas (continuação).

Vantagem	Desvantagem
Fácil operação e manutenção	As eficiências de tratamento mais elevadas podem só ser atingidas dois a três anos após o início da exploração
Elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, matéria sólida, nutrientes (azoto e fósforo) e metais pesados	Apresenta eficiências sazonais, influenciadas pelas épocas vegetativas e não vegetativas
Tolerância a variações de cargas hidráulicas, orgânicas e inorgânicas	Exigem uma quantidade mínima de água para que o ecossistema possa sobreviver
Reduzida emissão de odores (sistemas com escoamento sub-superficial)	
Dispensa a utilização de produtos químicos	
Gastos de energia relativamente baixos	
Possibilidade de reutilização do efluente final	
Benefícios adicionais nomeadamente, espaços verdes, habitats naturais e áreas de recreio ou educacionais	

Para a minimização de algumas das desvantagens apontadas é necessário ter alguns cuidados quando se procede ao seu dimensionamento, tais como as características do afluente após o tratamento primário, o tipo de enchimento, o tipo de planta para colonização e a variação das condições climáticas que podem influenciar o ciclo hidrológico [37].

## 2.6 Aplicabilidade

Os primeiros estudos que visaram a possibilidade de tratamento de águas residuais por leitos de macrófitas foram realizados por Käthe Seidel na Alemanha no início de 1950, no Instituto Max Planck em Plön [38]. Posteriormente, Käthe Seidel levou a cabo numerosas experiências que visaram o uso de leitos de macrófitas para tratamento de vários tipos de águas residuais, incluindo águas residuais contendo fenol, de águas residuais de leitarias ou efluentes de criação de gado. A maioria dos seus estudos foram realizados em leitos de macrófitas com fluxo sub-superficial quer horizontal quer vertical fluxo de sub-superficial. O primeiro leito de macrófitas construído com escoamento de superfície foi na Holanda, em 1967. No entanto, este tipo de

sistema não foi muito utilizado na Europa, onde os leitos de macrófitas de escoamento sub-superficial foram os mais utilizados nos anos 1980 e 1990. Hoje em dia, são utilizadas combinações de leitos de macrófitas de forma a melhorar o tratamento do efluente [39].

A utilização de leitos de macrófitas no tratamento de águas residuais domésticas está estabelecida permitindo obter elevadas remoções da matéria orgânica com valores na ordem do 50 a 90% [37]. No entanto, também têm sido aplicadas no tratamento de outros tipos de águas residuais como indústrias variadas, aterros sanitários, águas pluviais, efluentes ácidos de minas, secagem de lamas, etc [38]. No tratamento de águas residuais industriais os leitos de macrófitas têm sido implementados a efluentes biodegradáveis (indústria de processamento de fruta, matadouros e lagares de azeite) ou que não apresentem toxicidade, para a biomassa ou plantas [38,40]. Estudos mais recentes focam-se na remoção de elementos específicos como corantes, 94-98%, produzidos na indústria têxtil [41] ou na indústria de curtumes, 41-73% CQO [42]. No tratamento de efluentes provenientes da atividade agrícola intensiva (vacarias, leitárias, suiniculturas e aviários) [43,44] também têm sido utilizados leitos de macrófitas com remoções de 95% fósforo e 98% de azoto [45].

Existem também vários estudos sobre a utilização de leitos de macrófitas no tratamento de escoamentos provenientes de solos agrícolas, com presença considerável de azoto, fósforo e pesticidas, remoção de fósforo entre 12 e 16% [45], e provenientes de estradas, remoção de 40% de azoto [46], com elevadas remoções de sólidos e metais pesados, nomeadamente chumbo 50%, cadmio 91.9%, ferro 74.1%, níquel 40.9%, crómio 89%, e cobre 48.3% [47].

## **2.7 Componentes do sistema**

Os componentes essenciais do sistema de leitos de macrófitas são, a água, o meio de enchimento, as plantas (macrófitas aquáticas) e a flora microbiana. Estes tipos de sistemas são projectados de acordo com as características e volume dos efluentes a depurar e do local de construção quer pelas condições climáticas da zona (temperatura, precipitação média e evapotranspiração) quer pelas características geológicas e topográficas do terreno (locais planos ou com pequeno declive, este favorece o escoamento gravítico) [34].

Os meios de enchimento geralmente utilizados na construção de leitos de macrófitas são solo, areia, brita, rochas e materiais orgânicos. Também têm sido utilizados granulados de cortiça como meio de enchimento onde se destaca a sua performance como bioadsorvente [48], outro material utilizado nestes sistemas é a argila expandida, LECA®, que apresenta a vantagem adicional para adsorção do fósforo [49]. Estes componentes atuam como suporte físico para as plantas, aumentam a superfície de contato, servem de suporte para a adesão de microrganismos e removem compostos orgânicos e inorgânicos por processos físicos e químicos [34].

As características físico-químicas dos meios de enchimento alteram-se quando estes são inundados. Num meio saturado a água substitui os gases atmosféricos nos espaços porosos, isto leva ao consumo do oxigénio disponível pelos microrganismos aeróbios. Dado que este consumo ocorre mais rapidamente do que reposição efetuada por difusão a partir da atmosfera, o meio torna-se anóxico. Este ambiente redutor é importante na remoção de poluentes como azoto e metais [34,35].

As espécies botânicas utilizadas nos leitos de macrófitas podem ser classificadas como emergentes, flutuantes e submersas, classificação dada de acordo com a disposição das estruturas supra-radiculares relativamente à água. A figura 2.1 apresenta a classificação das diversas espécies de macrófitas que se encontram vulgarmente nos meios naturais, sendo algumas delas utilizadas no plantio de leitos de macrófitas destinados ao tratamento de efluentes [34].

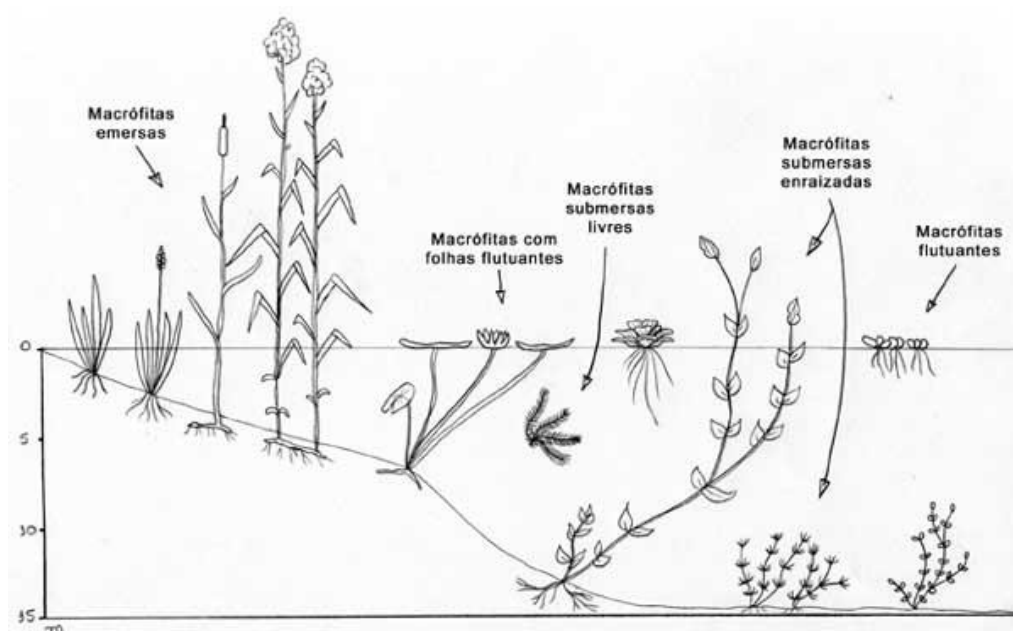


Figura 2.1 - Perfil transversal típico de uma zona húmida natural - tipos de macrófitas

As espécies de macrófitas, quer sejam elas vasculares quer não-vasculares (algas), contribuem essencialmente para oxigenação do meio devido a possuírem raízes e rizomas extensos que favorecem o arejamento do solo e o conseqüente desenvolvimento de microrganismos aeróbios, responsáveis pelos processos de oxidação da matéria orgânica [35].

Contudo, as macrófitas além de permitirem a oxigenação do meio, aumentam a área de contato e aderência do biofilmes através das raízes, caules, e rizomas, impedem a colmatação do solo, transportam oxigénio ate as raízes (promovem condições aeróbias), participam na

desnitrificação e na captação de fósforo, e são capazes de captar/absorver metais [45,49,50,51].

As espécies de plantas geralmente mais utilizadas no plantio dos leitos de macrófitas são os caniços (*Phragmites australis*), os juncos (*Scirpus lacustris*) e as espadanas (*Typha latifolia*), todas elas são macrófitas emergentes [34].

Relativamente aos microrganismos presentes nos leitos de macrófitas desempenham um papel crucial, devido ao seu metabolismo, na degradação de compostos orgânicos e a maioria dos nutrientes. Os microrganismos geralmente presentes no sistema são as bactérias, fungo e protozoários. As populações microbiológicas têm capacidade para se ajustarem às mudanças da água afluyente, crescendo exponencialmente na presença de condições favoráveis (alimento e ambiente), reduzindo drasticamente a atividade na presença de situações adversas, podendo ficar em estado latente durante longos períodos de tempo. Em geral, a comunidade microbiológica pode ser afetada por substâncias tóxicas, como pesticidas e metais pesados. A atividade microbiana também está sazonalmente dependente, uma vez que nos meses mais frios há uma diminuição da atividade microbiana. Nos sistemas de leitos de macrófitas os microrganismos promovem a manutenção das condições de vida no meio (circulação de nutrientes) e promovem a simbiose com outros organismos (organismos quimioautotróficos associam-se na remoção de matéria orgânica e nas transformações do azoto) [34,52].

## 2.8 Tipos de sistemas

A classificação dos leitos de macrófitas tem como base o tipo de plantas utilizadas: flutuantes, submersas e emergentes (Figura 2.2). No caso das plantas emergentes o leito pode ser classificado em função do tipo de escoamento, assim o leito pode ser de fluxo superficial ou de fluxo sub-superficial. Os leitos de fluxo sub-superficial podem ainda ser classificados de acordo com a direção do escoamento, os leitos podem apresentar fluxo horizontal, fluxo vertical ou híbridos (combinação de ambos) [40].

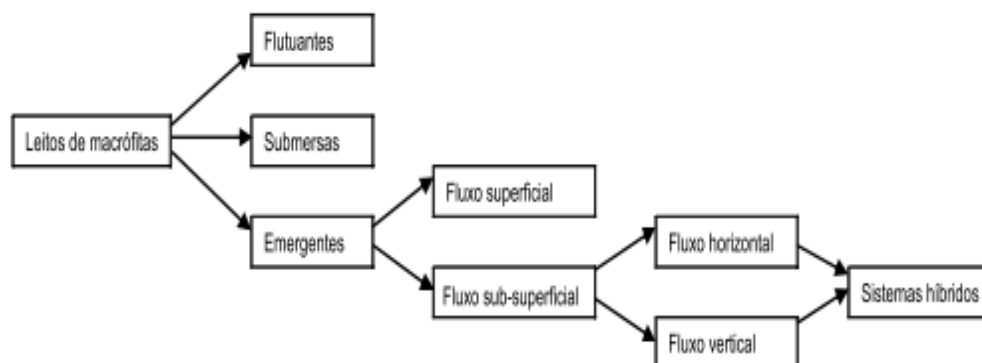


Figura 2.2 - Classificação dos leitos de macrófitas.

## 2.8.1 escoamento superficial

Leitos de macrófitas de escoamento superficial (LM-ES) consistem numa superfície líquida acima do solo ou outro meio de enchimento, sendo que este suporta as raízes da vegetação, e uma estrutura de controlo de água que mantêm a profundidade da água. Os LM-ES parecem-se muito com pântanos naturais e podem fornecer habitat a animais selvagens também têm benefícios estéticos bem como o tratamento da água. Nos LM-ES a camada mais próxima à superfície encontra-se num ambiente aeróbico, enquanto nas águas mais profundas são geralmente anaeróbicos.

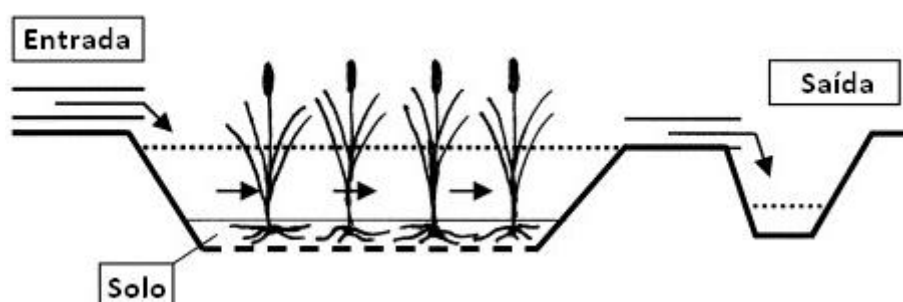


Figura 2.3 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento superficial [52].

Os LM-ES são mais indicados para climas quentes, já que a taxa de degradação biológica diminui com a diminuição da temperatura da água. Por outro lado, em climas frios onde há formação de gelo, aquando da queda do gelo na camada da água, a transferência de oxigénio é reduzida, diminuindo ainda mais os processos de tratamento dependentes de oxigénio. A sua principal utilização é como tratamento secundário e terciário em águas residuais domésticas mas também águas residuais agrícolas e de indústrias como, da pasta e do papel e alimentar [34,35,38].

As vantagens dos LM-ES são o baixo custo de construção e operacionais, bem como a fácil operação e manutenção. As principais desvantagens do sistema de LM-ES são que exigem uma área maior do que outros sistemas e estão associados à proliferação de insetos, bem como a presença de odores desagradáveis [35,38].

## 2.8.2 escoamento Sub-superficial

No sistema de escoamento sub-superficial (LM-ESS) o nível do líquido mantém-se abaixo da superfície do leito. Este aspeto faz com que ocorram baixas taxas de transferência de oxigénio nos sistemas de leitos de macrófitas de escoamento sub-superficial, predominando deste modo os processos anaeróbios na degradação da matéria orgânica. Geralmente, compostos orgânicos estão presentes tanto na forma solúvel como em partículas de matéria orgânica, a remoção de

sólidos suspensos e redução de carência bioquímica de oxigênio são processos interligados neste tipo de sistemas [34,38].

Os leitos de macrófitas com escoamento sub-superficial são geralmente classificados de acordo com a direção predominante do escoamento, vertical ou horizontal. No escoamento vertical (LM-ESSV) o afluente é distribuído pela superfície do leito num escoamento preferencialmente vertical, através do meio poroso. A base do leito, de geometria plana, dispõe de um sistema de drenagem, geralmente tubagens perfuradas, destinadas a recolher o efluente tratado e conduzi-lo para uma caixa de saída. Este tipo de escoamento também pode dividir-se de acordo com o seu sentido, deste modo existe o escoamento vertical descendente, mais comum, e o escoamento vertical ascendente.

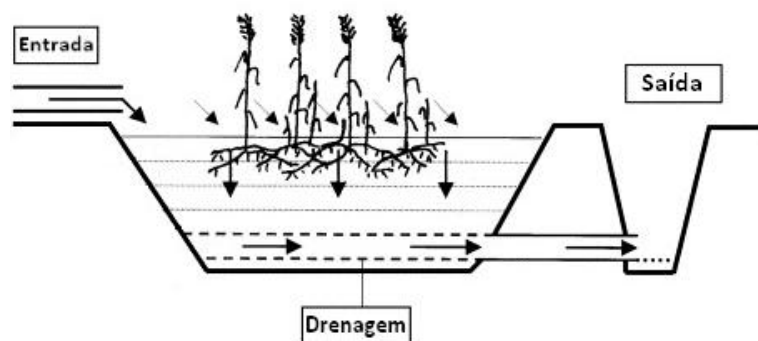


Figura 2.4 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento sub-superficial vertical descendente [52].

Para sistemas de escoamento horizontal (LM-ESSH) o afluente é despejado numa das extremidades do leito penetrando através do meio poroso e da rizosfera com uma deslocação predominantemente horizontal. Os sistemas LM-ESSH são os mais utilizados dos sistemas de escoamento sub-superficial [38,49].

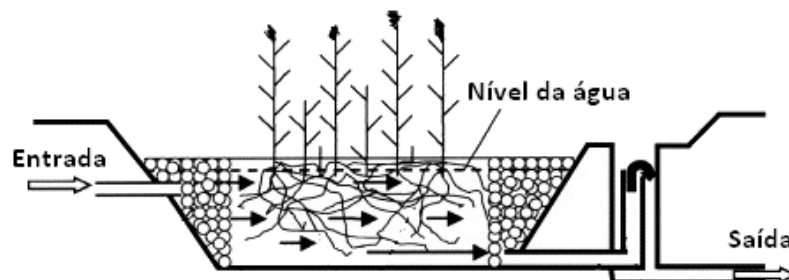


Figura 2.5 - Esquema geral de um leito de macrófitas de escoamento sub-superficial horizontal [73].

As vantagens citadas para este tipo LM-ESS são a sua maior tolerância ao frio, minimização de pragas e problemas de odor, e, possivelmente, maior potencial de assimilação por unidade de área de terra do que nos sistemas LM-ES. O próprio meio de enchimento proporciona uma maior

superfície de contato favorecendo os mecanismos de adsorção, precipitação e degradação microbiana. Uma vez que a superfície da água não é exposta, os riscos de contato das pessoas com a água residual são mínimos. As desvantagens dos sistemas LM-ESS prendem-se com o fato de serem mais dispendiosos, quer na construção quer na manutenção e reparação, quando comparados com os LM-ES. Outro ponto negativo é a possível colmatação do sistema [35,38].

## 2.9 Processos de transformação

A remoção de compostos poluentes nos LM envolve uma complexa gama de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente. Os processos de tratamento presentes nestes sistemas são sedimentação, filtração, precipitação, adsorção, decomposição microbiológica, nitrificação e desnitrificação.

Cada componente, como o meio aquoso, o meio de enchimento, vegetação e microrganismo, destes sistemas influenciam de forma distinta para a remoção dos compostos poluentes.

A eficiência de um LM está diretamente relacionada com a percentagem de nutrientes e substâncias químicas absorvidas, transformadas ou decompostas pelo ecossistema. A maior parte das transformações bioquímicas que ocorrem nos LM são controladas pela população microbiana presente.

A rizosfera expansiva das macrófitas proporciona o surgimento de uma zona favorável para a degradação de compostos orgânicos através de microrganismos aeróbios e aeróbios facultativos aderidos às raízes e rizomas das plantas, já a degradação por microrganismos anaeróbios ocorrem em locais de potencial oxirredução negativos.

**Tabela 2.5** - Os mecanismos de remoção de compostos poluentes nos LM [48-51,53].

Componentes das águas residuais	Mecanismo de remoção
Sólidos Totais	Sedimentação/Filtração, decomposição, precipitação, oxidação pelos microrganismos, assimilação pelas plantas
CBO e CQO	Degradação microbiana (aeróbia e anaeróbia), sedimentação (acumulação de matéria orgânica na superfície do sedimento), filtração
Fósforo	Reações de adsorção a locais das plantas e microrganismos, precipitação de Al, Fe e Ca, formação de complexos com a matéria orgânica, assimilação pelas plantas e microrganismos
Azoto	Assimilação pelas plantas, formação de amônia seguida de nitrificação e desnitrificação
Sulfato	Adsorção (troca catiónica), precipitação de sulfetos metálicos

**Tabela 2.5** - Os mecanismos de remoção de compostos poluentes nos LM (continuação).

Componentes das águas residuais	Mecanismo de remoção
Metais	Sedimentação/filtração, reações de adsorção, precipitação com material orgânico e acumulação, precipitação na forma de hidróxidos e sulfetos, assimilação pelas plantas, transformações microbianas (oxidação)
Fenol	Adsorção à matéria orgânica e partículas do meio de enchimento, degradação microbiana

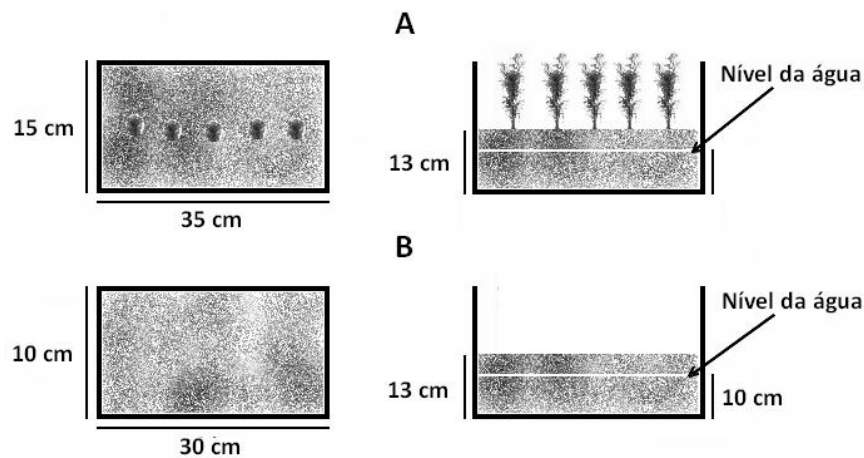
### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Descrição da instalação dos leitos de macrófitas

Os leitos de macrófitas a escala piloto utilizados estão localizados na Universidade da Beira Interior, Covilhã, e foram desenhados de modo a terem fluxo horizontal e escoamento sub-superficial. Os leitos foram instalados num laboratório próximo de uma janela para garantir a exposição a radiação solar. A temperatura ambiente do laboratório variou entre 14 e 32°C de acordo com a estação do ano.

Os estudos iniciaram-se em Outubro de 2011 com a inoculação dos leitos, três semanas depois considerou-se o processo concluído. Durante e após o período de inoculação os leitos foram alimentados em contínuo com efluente sintético, tabela 3.1. Em Fevereiro de 2012 foram plantadas *Phragmites australis* num dos leitos (Leito de Macrófitas, LM), conservando-se o segundo leito como controlo (Leito Controlo, LC).

Os leitos utilizados têm a mesma geometria mas dimensões diferentes e consequentemente volumes úteis também diferentes, sendo que o volume do LC é metade do LM: X L, na figura 3.1 encontram-se esquematizados os leitos de macrófitas.



**Figura 3.1** - Representação esquemática dos leitos; A) esquema do leito com macrófitas, *Phragmites australis*, (LM) e as suas dimensões; B) esquema leito sem macrófitas (LC) e as suas dimensões.

Os leitos testados apresentam escoamento sub-superficial e fluxo horizontal. Como componentes dos leitos temos o sistema de alimentação, o meio de enchimento, a espécie de macrófitas (apenas no LM) e flora bacteriana (biofilme).

O sistema de alimentação dos leitos é constituído pela tubagem, bomba peristáltica, reservatório de efluente com banho de refrigeração e reservatórios para recolha de descarga.

A tubagem utilizada no sistema de alimentação permitiu a transferência do afluente para os leitos. A acumulação de depósitos nos tubos de alimentação foi controlada através da sua

lavagem através da circulação de soluções diluídas de ácido clorídrico e de bicarbonato de sódio. Desta forma evitaram-se obstruções e o desenvolvimento de biofilme. A bomba peristáltica e o diâmetro interno dos tubos permitiu um efectivo controlo do caudal de alimentação e, conseqüentemente do tempo de retenção hidráulico (TRH) pretendido, o qual foi igual em ambos os leitos.

O reservatório contendo o afluente, soluções diluídas de efluente da operação de cozimento da cortiça, foi colocado num banho de refrigeração para preservação sendo conservado a 4°C para minimizar a degradação da matéria orgânica. Deste modo foi possível salvaguardar que a carga orgânica alimentada conservou-se constante em cada etapa do processo de adaptação dos leitos.

O meio de enchimento utilizado nos leitos tem como funções principais suportar as macrófitas emergentes e fixar a biomassa através do desenvolvimento do biofilme. Nestes leitos foram utilizados grânulos de argila expandida, LECA, com uma granulometria 4-8 mm e com uma porosidade de 45%. A LECA antes de ser usada como meio de enchimento dos leitos foi alvo de um processo de lavagem intensivo que decorreu durante uma semana e utilizou um volume abundante de água.



Figura 3.2 - grânulos de LECA no leito.

Após a instalação dos leitos procedeu-se à inoculação destes. Na inoculação dos leitos, os inóculos utilizados eram provenientes das lamas recolhidas na bacia de arejamento de um sistema de lamas ativadas utilizado para depuração de efluente doméstico. O meio de cultura utilizado na colonização tabela 3.2.

Um dos leitos foi colonizado com a espécie *Phragmites australis*, o outro leito ficou desprovido de vegetação. A colonização do LM realizou-se em Fevereiro de 2012 com plantas jovens, previamente cultivadas em cativeiro, de modo a facilitar a colonização e a adaptação das plantas uma vez que o início do ciclo vegetativo anual desta espécie situa-se entre Fevereiro/Março.



Figura 3.3 - *Phragmites australis* recém-plantadas no leito (primeiro plano LM e em segundo LC).

## 3.2 Modo de operação

O sistema foi alimentado de forma contínua com caudais diferentes para cada leito,  $0,3922 \text{ L d}^{-1}$  para o LM e  $0,2232 \text{ L.d}^{-1}$  para o LC, de forma a obtermos um TRH (tempo de retenção hidráulico) teórico de 5 dias para ambos os leitos. Em geral cada etapa do processo de adaptação dos leitos decorreu entre 20 a 30 dias até se obter um desempenho dos sistemas, em termos da remoção da CQO, Ft e cor estável. Utilizou-se a designação etapa para os períodos de operação nos quais as características e composição da alimentação foram mantidas constantes. Os leitos foram alimentados de forma contínua à uma carga hidráulica de aproximadamente  $0,27 \text{ dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $0,65 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ) para o leito com macrófitas (LM) e  $0,25 \text{ dm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$  ( $0,62 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ ) para o leito sem macrófitas (LC) em todas a séries.

Após cinco dias do início de cada série foram recolhidas, periodicamente, amostras cujo processo de amostragem é descrito no subcapítulo 3.3. A caracterização das amostras envolveu a medição da temperatura, pH, potencial redox (ORP), da Absorvência a 580nm (A580 para a cor diluições 1:10) e 254nm (A254 para concentração de aromáticos diluição 1:50) e a determinação da CQO,  $\text{CBO}_5$ ,  $\text{CBO}_{20}$  e Fenóis totais.

As diferentes etapas de alimentação tiveram como objetivo analisar a resposta dos leitos aos afluentes em estudo, nomeadamente obter a adaptação da biomassa através da redução da

diluição dos efluentes, ou seja etapas sucessivas em que se foi aumentando a concentração de CQO da alimentação de 500 até 800 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, valores médios; e avaliar a influência das plantas na depuração obtida.

A **primeira etapa** de operação teve como objetivo o desenvolvimento do biofilme e foi concretizada através da alimentação com um afluente sintético, à base de acetato de sódio com uma CQO de 300 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, contendo ainda sistema tampão de pH, fósforo, azoto, macro e micro nutrientes (Tabela 3.1). Na inoculação dos leitos, os inóculos utilizados eram provenientes das lamas recolhidas na bacia de arejamento de um sistema de lamas activadas utilizado para depuração de efluente doméstico.

**Tabela 3.1** - Meio de cultura utilizado na etapa de colonização/alimentação [54].

Função	Composto (Fórmula molecular)	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Volume usado na preparação de solução (mL L <sup>-1</sup> )
Substrato orgânico	Acetato de sódio (CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O)	113,4	6
Macro-nutrientes	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,50	0,2
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36,43	0,2
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,250	0,2
Oligoelementos	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,040	0,2
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,060	
	ZnSO <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,040	
	EDTA	0,0555	
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0444	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,032	
Cloreto de amónio	NH <sub>4</sub> Cl	76,41	1,5
Nitrato de Potássio	K <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	144,4	5
Tampão pH	Di-hidrogenofostato de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	8,50	2
	(K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	21,75	
	(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	33,40	
	NH <sub>4</sub> Cl	1,70	

Na **segunda etapa** de alimentação decorreu durante cerca de 11 semanas (83 dias) e corresponde ao início do processo de adaptação e avaliação da depuração dos leitos com efluente da operação de cozimento da cortiça diluído para obter uma concentração de matéria orgânica correspondente a CQO para 350-650 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

A **terceira etapa** de operação decorreu durante aproximadamente 20 semanas (144 dias) com um incremento da carga orgânica entre 650-900 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de CQO, igualmente obtida através da diluição do efluente industrial. Actualmente, ainda prossegue o processo de adaptação dos sistemas biológicos à composição e características do efluente industrial mas já com valores de CQO próximos de 1 000 mg L<sup>-1</sup> de CQO.

### **3.3 Amostragem e conservação da amostra**

A colheita das amostras, num ponto próximo da saída e no meio do leito, efetuaram-se com recurso a uma pipeta volumétrica, tendo esta sido introduzida até meio da camada submersa, que foi considerado o ponto de referência para a amostragem. O volume de amostragem variou de 10 a 20 ml, dependendo das análises que foram executadas.

A preservação das colheitas foi feito sendo acidificando (com ácido sulfúrico a pH inferior a 2) um pequeno volume de amostra e armazenadas, como reserva para a eventualidade de ser necessário repetir algum parâmetro.

### **3.4 Recolha e Conservação do Efluente de Cozedura da Cortiça**

O efluente de cozedura de cortiça utilizado neste estudo foi recolhido à saída de um tanque de equalização e homogeneização de uma indústria corticeira no distrito de Portalegre (Portugal) e conservado a -18°C, até ser utilizado.

### **3.5 Determinações analíticas e Procedimentos**

As medições de pH foram realizadas num medidor modelo GLP 22 com um eléctrodo ACC ambos da Crison à temperatura ambiente. O eléctrodo foi calibrado, diariamente, com tampões de pH (pH 4.02 e pH 7.00).

As medições do potencial redox (*Oxidation reduction potential*, ORP) foram efetuadas num Metrohm 794 Basic Titrino com um Sensor PT 6.0451. O desempenho do eléctrodo foi periodicamente avaliado com soluções cujo potencial de redox é conhecido em função da temperatura.

As análises de Carência Química de Oxigénio (CQO) e Carbono Orgânico Total (COT) foram realizadas de acordo com o Standard Methods (APHA, 1998): método 5220 C e método 5310 B, respetivamente. As determinações de Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) foram realizadas em sistema OxiTop OC (WTW, Alemanha), de acordo com o método respirométrico (método 5210 D) adaptado de Standard Methods [55]. O tempo de incubação foi de 5 e 20 dias, permitindo obter a CBO<sub>5</sub> e CBO<sub>20</sub>, respetivamente.

As quantificações de Fenóis totais (Ft) foram efetuadas de acordo com Makkar et al. (1993).

O espectrofotómetro Thermo Scientific de modelo Helios Omega e uma célula de quartzo foram utilizados na medição das absorvências a 254 nm (A254) para determinação dos compostos aromáticos e a 580 nm (A580) para quantificação da cor das amostras conservando constantes as diluições. Anteriormente a cada uma destas medições, foi utilizada água destilada para o zero das leituras.

A determinação da CQO é utilizada para avaliar a qualidade de águas residuais domésticas e industriais, uma vez que permite estimar o oxigénio necessário à oxidação da matéria orgânica presente na amostra e suscetível de oxidação por parte de um oxidante químico forte, dicromato de potássio -  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , em meio ácido (ácido sulfúrico) e na presença de um catalisador (sulfato de prata). A diferença entre a quantidade inicial e remanescente de oxidante é convertida em oxigénio. O excesso de dicromato foi obtido através de titulação com uma solução de sulfato de amónio ferroso, após padronização, utilizando um titulador automático Metrohm, 665 Dosimat, enquanto a digestão decorreu, durante 120 min a 150°C, num bloco digestor Lovibond ET 125.

A determinação da CBO é um teste empírico que recorre a procedimentos laboratoriais normalizados que permitem avaliar a concentração de compostos biodegradáveis presentes em águas residuais e poluídas. O teste mede o oxigénio utilizado, durante um período específico de incubação, para a degradação bioquímica da matéria orgânica e para oxidar matéria inorgânica como sulfeto de ferro e ferro ferroso. Este teste também pode medir o oxigénio necessário à oxidação de compostos com azoto, pelo que foi adicionado um inibidor da nitrificação (N-alquiltioreira).

Os ensaios de CBO deste trabalho foram realizados em sistema OxiTop® OC100 (WTW), utilizando sensores de pressão, de acordo com o método respirométrico adaptado do Standard Methods [55] (método 5210 D) seguindo o manual do equipamento [57]. Este método mede direta e continuamente o oxigénio consumido pelos microrganismos a partir do ar ou de um ambiente enriquecido com oxigénio, num recipiente fechado, sob condições de temperatura e agitação constantes. A quantificação utilizando este sistema é baseada na medição de variação de pressão num sistema fechado, visto que os microrganismos consomem o oxigénio e produzem  $\text{CO}_2$ , o qual é fixado pelo hidróxido de sódio (colocado num suporte específico), resultando numa redução da pressão no interior do sistema. Na Figura 3.4 apresentam-se os principais componentes do sistema. Em cada série de determinações foram incluídos ensaios com água destilada (branco) e com solução padrão de glucose-ácido glutâmico (indicar valor médio $\pm$ SD). Os ensaios foram realizados em duplicado, e quando a diferença entre os valores ultrapassou os 10% para o coeficiente de variação ( $\text{CV}=(\text{desvpadrão}/\text{média})\times 100$ ) foram repetidos.

As determinações da  $\text{CBO}_5$  e  $\text{CBO}_{20}$  permitiram a quantificação da biodegradabilidade através de dois índices:  $\text{CBO}_5/\text{CQO}$  e  $\text{CBO}_{20}/\text{CQO}$ , enquanto a razão entre  $\text{CBO}_5/\text{CBO}_{20}$  permite avaliar a acessibilidade da matéria orgânica ao metabolismo da biomassa aeróbia.

Todo o procedimento experimental pode ser consultado no Anexo 1.

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras em estudo foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu [56] e expressa em termos da concentração de ácido tânico, utilizado para estabelecer a curva de calibração que relaciona a absorvência a 765 nm e a concentração. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos presentes na amostra, produzindo um complexo de coloração azul que absorve a 765 nm. A reação ocorre em meio alcalino que se obtém por adição de uma solução de carbonato de sódio (2 M) [58].

O procedimento experimental seguido para a determinação dos fenóis totais encontra-se no descrito no Anexo 1.

### **3.6 Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos à Merck (Alemanhã), à Fulka (Suíça) ou à Sigma-Aldrich (Suíça) e as soluções aquosas preparadas com água purificada através de um sistema Millipore.

### **3.7 Recolhas e manutenção da biomassa**

A biomassa aeróbia utilizada foi recolhida num reator aeróbio do sistema de lamas ativadas utilizado para o tratamento de águas residuais domésticas; portanto sem qualquer contacto com poluentes específicos do efluente do cozimento da cortiça. O inóculo foi mantido em descontínuo no laboratório, durante 6 meses, à temperatura ambiente. O sobrenadante era quinzenalmente substituído por meio de cultura fresco composto por uma mistura de glucose e acetato (com um CQO de 2 000 mg L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono, micro e macro-nutrientes (Anexo 2). O pH era controlado semanalmente e, se necessário, ajustado ao intervalo de 6.5 a 7.5. Este procedimento permitiu o crescimento, depuração e conservação da biomassa.

Previamente aos ensaios de CBO, a biomassa utilizada como inóculo era sujeita a uma preparação que se encontra descrita no Anexo 1.



## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Caracterização do efluente do cozimento da cortiça

A alimentação dos leitões foi obtida através da diluição de amostras de efluente do cozimento de cortiça para obter os valores de CQO pretendidos. Durante o desenvolvimento experimental foram recolhidas três amostras de efluente, cujas principais características são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Resultados da caracterização do efluente do cozimento da cortiça.

Parâmetros	Efluente de cozedura da cortiça			
	Média	$\sigma$	min	Máx
pH	5,30	0,59	4,70	5,87
CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	1756	412,37	1329	2152
CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	523,33	126,91	411	661
CBO <sub>20</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	776,67	233,24	604	1042
CBO5/COD	0,30	0,02	0,28	0,31
CBO20/CQO	0,44	0,05	487	836
FenóisT (mg ác. tânico L <sup>-1</sup> )	182,6	34	145,7	212,6
A254	0,507	0,069	0,462	0,587
A580	0,572	0,044	0,540	0,622

n - número de amostras;  $\sigma$  - desvio padrão; min - valor mínimo; Máx - valor máximo

A comparação entre estes resultados e os anteriormente publicados (tabela 2.1) denota alguma variação das características do efluente utilizado perante os intervalos de variação estabelecidos através da revisão bibliográfica realizada.

O pH da amostra reflete que o efluente do cozimento da cortiça, utilizado neste trabalho, é moderadamente ácido. Contudo, este resultado não limita a depuração do efluente através de processos físico-químicos ou biológicos, uma vez que o mesmo pode ser facilmente ajustado.

Relativamente à CQO, o resultado obtido ultrapassa significativamente o valor imposto pela legislação para a descarga de águas residuais em meios recetores naturais, 150 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, apesar de corresponder a uma carga orgânica inferior aos resultados publicados, os quais revelam uma variação entre 4 500 e 5 500 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> [14]. É importante referir que a recolha do efluente foi concretizada à saída de um tanque de homogeneização e equalização que precede um pré-tratamento de coagulação/floculação na unidade industrial, onde se efetuou a recolha.

Contudo, o principal do efluente de cozedura da cortiça reside no seu carácter biorrecalcitrante devido a uma diferença entre a CQO (valores médios de  $1\,756\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ ) e da CBO após 5 e 20 dias de incubação com valores médios obtidos a rondar 523,33 para a CBO<sub>5</sub> e 776,67  $\text{mg O}_2\text{ L}^{-1}$  para a CBO<sub>20</sub>. Como consequência, os valores médios obtidos para os índices de biodegradabilidade, CBO<sub>5</sub>/CQO e CBO<sub>20</sub>/CQO, foram 0,30 e 0,44, respetivamente, e revelam que uma fração importante dos poluentes não é acessível à oxidação biológica. Alguns autores recomendam que o âmbito de aplicação de tratamento biológico aeróbio e anaeróbio requer valores da razão CBO<sub>5</sub>/CQO superiores a 0,30 ou 0,40, respetivamente [59].

Para efluentes complexos, como o caso do efluente do cozimento da cortiça, constituídos por compostos orgânicos que integram um grande intervalo de tamanhos moleculares, deve considerar-se a CBO<sub>5</sub> como a fração rápida e facilmente biodegradável de toda a matéria orgânica disponível. Analisando as tabelas 2.1 e 4.1, verifica-se que os resultados de biodegradabilidade obtidos são inferiores aos descritos na literatura.

Relativamente à absorvência a 254 nm (A<sub>254</sub>), esta foi medida, numa diluição de 1:50, e reflete a concentração de compostos aromáticos presentes na amostra. Os resultados médios obtidos (0,507) foram superiores aos descritos na literatura (0,218) para as mesmas condições experimentais [60,61]. Perante este facto pode afirmar-se que o efluente estudado apresenta um teor de compostos aromáticos superior ao da bibliografia.

No que se refere à coloração da amostra, esta foi estudada através da medição da absorvência a 580 nm (A<sub>580</sub>), numa diluição de 1:10. Esta determinação foi adaptada do estudo realizado por [60] com efluentes do cozimento da cortiça de indústrias espanholas, onde as amostras analisadas apresentaram colorações com A<sub>580</sub>=0,114, para uma diluição de 1:10. Assim, pode verificar-se que os efluentes analisados neste trabalho apresentam uma coloração maior (0,572 diluição 1:10) que a descrita na literatura.

Os Ft são a principal classe poluente deste efluente e são expressos em concentração de ácido tânico. Analisando as tabelas 2.1 e 4.1, que concentração de Ft obtida (182,6  $\text{mg ácido tânico L}^{-1}$ ) é inferior aos valores médios descritos na literatura (600 a 900  $\text{mg ácido tânico L}^{-1}$ ), mas encontra-se em linha com a CQO obtida.

## 4.2 Adaptação dos leitos de macrófitas ao efluente

Na tabela 4.2, apresentam-se os principais parâmetros relativos às medições durante a Etapa 1, colonização, dos leitos.

Tabela 4.2 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a etapa 1.

Parâmetros	n	A (Afluente)				LM (Efluente)				LC ( Efluente )			
		Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx
T (°C)	15					20,42	0,36	20,1	21,1	20,3	0,28	20	20,9
pH	11	6,6	0,1	6,3	6,8	7,9	0,2	7,8	8,1	7,8	0,2	7,8	8,1
ORP (mV)	11	239,3	30,5	206	291	-137,3	63,9	-229	-30	-179	43,8	-240	-111
CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	11	304,4	42,0	207	382	39	17,7	18,5	87,8	52	22,1	26,9	107
Carga orgânica (g CQO m <sup>-2</sup> L <sup>-1</sup> )	11	1,3	0,3	1,3	2,5	0,3	22,1	0,1	0,6	0,3	0,1	0,2	0,7

n - número de amostras;  $\sigma$  - desvio padrão; min - valor mínimo; Máx - valor máximo

Analisando a tabela 4.2 denota-se que apenas ocorreu variação da temperatura durante esta etapa, mantendo-se, geralmente, constante devido ao dos leitos se encontrarem num ambiente climatizado, entre os 20 e 21 °C.

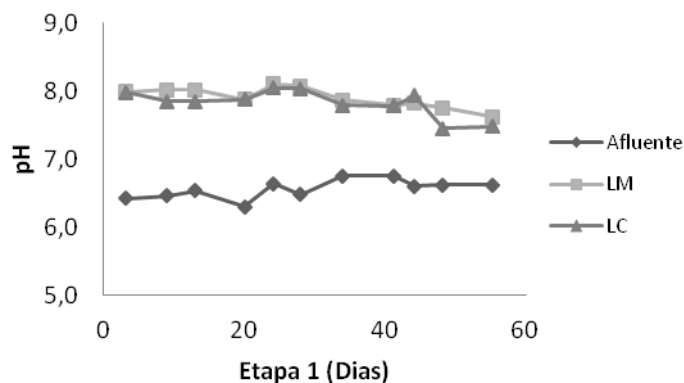


Figura 4.1 - Evolução temporal dos valores de pH do afluente e do efluente dos leitos, Etapa 1.

Relativamente ao pH os dois leitos apresentam valores similares e com pequenas variações dos efluentes dos leitos. De referir que os valores de pH variam entre 7,8 e 8,1, característicos de LM-ESSH [62].

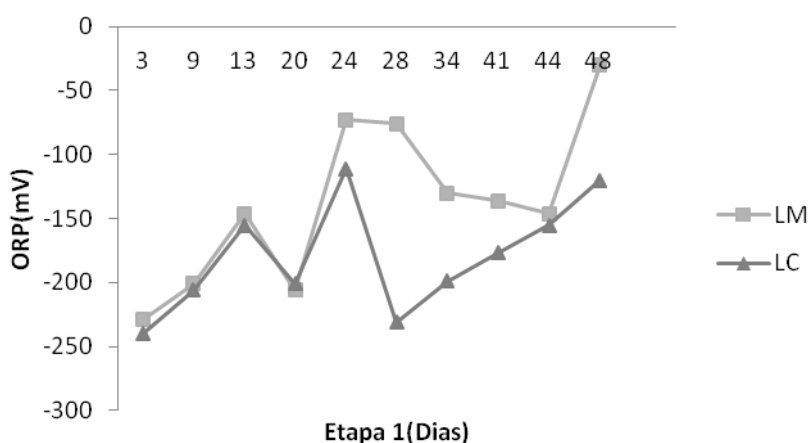


Figura 4.2 - evolução temporal do potencial redox no interior dos leitos, Etapa 1.

As medições de potencial redox efetuadas, tabela 4.2 e figura 4.2, mostraram uma grande variabilidade das condições de oxirredução no interior dos leitos. Globalmente, verifica-se que o LC apresenta valores de oxirredução mais reduzidos, valores médios da ordem dos -179 mV, em relação ao LM com -137,3 mV. O potencial redox é fortemente influenciado pelas cargas influentes de CQO, as necessidades internas de oxigénio e a taxa de transferência de oxigénio no interior dos leitos de macrófitas [62]. As gamas de valores (X) de potencial redox que ditam as condições em que se encontram os leitos num determinado ponto. As condições que estão presentes nos leitos podem ser aeróbias (valores acima de 100 mV), anóxicas

(valores entre 100 mV e -100 mV) e/ou anaeróbias (valores abaixo de -100 mV). Os leitos de macrófitas sub-superficiais com escoamento horizontal são tendencialmente anóxicos ou anaeróbicos.

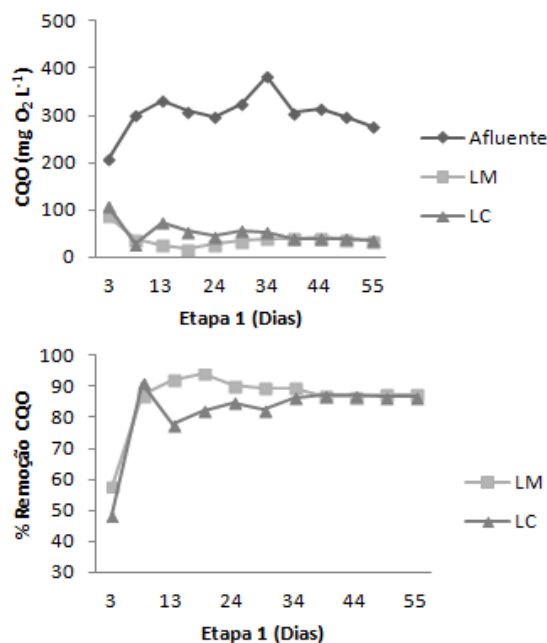


Figura 4.3 - Evolução temporal da CQO do afluente e do efluente dos leitos e a sua remoção, Etapa 1.

A análise da figura 4.3 e a tabela 4.2 denota a degradação da matéria orgânica no interior dos leitos denunciada pelo decréscimo da concentração da CQO no efluente face às cargas afluentes. Podem observar-se remoções elevadas, cerca de 90% da matéria orgânica, este facto denota um bom desenvolvimento do biofilme.

Nas etapas de adaptação ao efluente da cozedura da cortiça (diluído) os leitos foram alimentados, numa primeira fase, com afluentes com uma gama de CQO entre 350 e 650 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Após esta etapa, os leitos foram alimentados com afluentes com uma gama de CQO entre os 650 e 900 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de forma a adaptar os leitos a concentrações mais semelhantes à do efluente industrial.

A avaliação do desempenho dos leitos no tratamento dos efluentes industriais nas duas etapas de adaptação será feita em conjunto.

Tabela 4.3 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a Etapa 2.

Parâmetros	n	A (Afluente)				LM (Efluente)				LC ( Efluente )			
		Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx
T (°C)	41					24,7	2,3	19,4	28,4	26,1	2,7	21,1	31,4
pH	43	7,1	0,2	6,8	7,4	8,5	42,0	6,8	8,8	8,3	42,2	7,7	8,7
ORP (mV)	16	-336	11,4	-350	-319	-337	35	-381	-207	-346	36	-398	-243
CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	34	481,4	116,0	338,0	628,7	252,1	53,8	183,1	400,7	237,7	57,3	169,2	375,7
Carga orgânica (g CQO m <sup>-2</sup> L <sup>-1</sup> )	34	3,1	0,8	2,2	4,1	1,6	0,4	1,2	2,6	1,5	0,4	1,1	2,4
CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	15	116,1	29,1	74,7	148,9	42,8	22,8	11,7	82,4	44,9	27,0	8,7	95,8
CBO <sub>20</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	15	184,0	47,5	148,5	257,3	73,6	29,2	29,6	124,2	72,0	35,2	24,1	161,0
CBO <sub>5</sub> /CQO	15	0,26	0,10	0,12	0,39	0,18	0,11	0,04	0,39	0,21	0,13	0,04	0,43
CBO <sub>20</sub> /CQO	15	0,40	0,10	0,20	0,50	0,30	0,20	0,10	0,50	0,30	0,20	0,10	0,60
Fenóis totais (mg ác. Tânico L <sup>-1</sup> )	33	32,9	10,3	19,2	47,8	15,8	5,8	10,1	31,3	15,9	5,3	10,7	31,2
A254	29	0,15	0,03	0,10	0,24	0,11	0,03	0,06	0,20	0,11	0,03	0,06	0,18
A580	26	0,07	0,02	0,05	0,11	0,05	0,04	0,01	0,17	0,05	0,04	0,01	0,17

Tabela 4.4 - Parâmetros de controlo efetuados nos leitos durante a Etapa 3.

Parâmetros	n	A (Afluente)				LM (Efluente)				LC ( Efluente )			
		Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx	Média	$\sigma$	min	Máx
T (°C)	17					21,9	1,7	19,6	25,7	22	1,5	19,4	25,1
pH	17	7,0	0,4	6,6	7,6	8,1	0,2	7,7	8,1	8,0	0,1	7,8	8,2
ORP (mV)	9					-133	131	-272	42	-298	20	-318	-244
CQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	17	828,76	87,12	683,5	910	323,35	79,58	187	496	333,15	0,52	187	451
Carga orgânica (g CQO m <sup>-2</sup> L <sup>-1</sup> )	17	5,40	0,57	4,45	5,93	2,11	0,52	1,22	3,23	2,17	0,48	1,22	2,94
CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	9	249,3	15,16	225	268	31,38	22,25	6,90	74,80	42,22	22,10	16,80	74,10
CBO <sub>20</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	9	304,94	14,81	288,20	325,40	53,56	20,64	32,20	90,20	71,50	18,25	44,20	100,10
CBO <sub>5</sub> /CQO	7	0,30	0,02	0,27	0,32	0,12	0,10	0,03	0,31	0,15	0,08	0,05	0,30
CBO <sub>20</sub> /CQO	7	0,36	0,03	0,30	0,40	0,20	0,09	0,13	0,38	0,25	0,07	0,19	0,41
Fenóis totais (mg ác. Tânico L <sup>-1</sup> )	14	46,64	8,21	36,30	62,40	24,48	4,92	15,40	32,10	26,30	4,48	16,10	33,80
A254	11	0,25	0,08	0,17	0,34	0,17	0,02	0,14	0,20	0,16	0,01	0,15	0,18
A580	11	0,07	0,01	0,04	0,09	0,10	0,06	0,04	0,18	0,10	0,06	0,04	0,18

A análise da tabela 4.3 e da tabela 4.4 denota que ocorreram variações da temperatura nos leitos, contudo a variação da temperatura é semelhante em ambos os leitos. Esta variabilidade das temperaturas está relacionada com a variação sazonal da temperatura exterior. A temperatura dos leitos encontram-se no intervalo ideal para o melhor desempenho dos leitos, 20 a 35 °C [63].

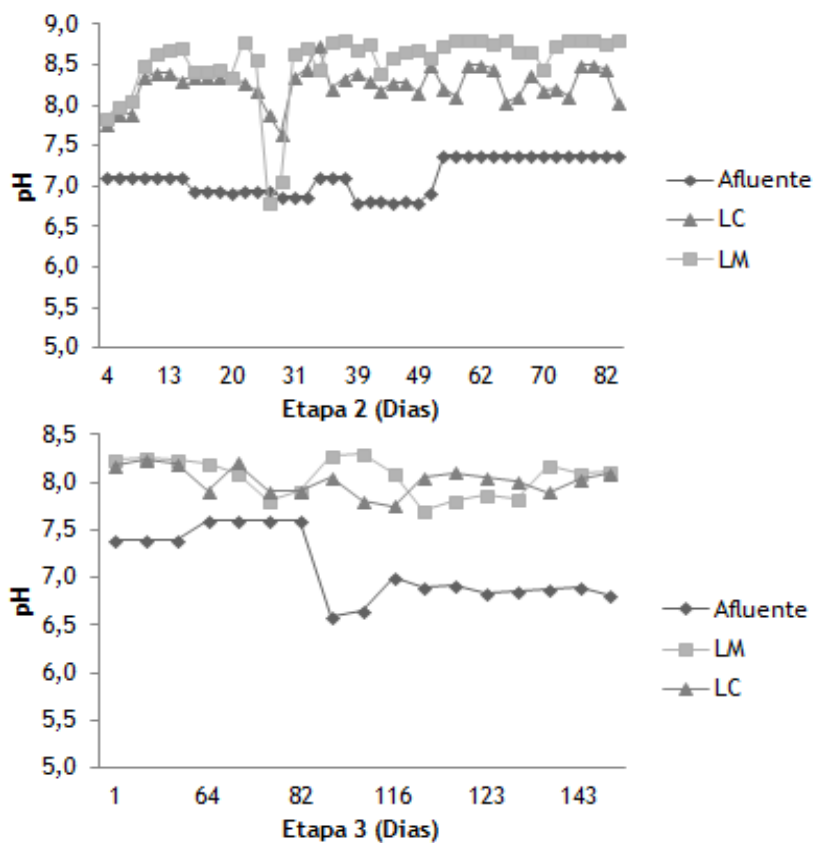


Figura 4.4 - Evolução temporal dos valores de pH de afluente e efluente dos leitos nas etapas de adaptação.

Através da análise da figura 4.4 e das tabelas 4.3 e 4.4, observa-se que os valores de pH dos efluentes dos leitos mantiveram-se, geralmente, constantes e encontram-se dentro dos valores de pH (6,5 a 8,5) apropriados para a remoção carbonada, nitrificação, desnitrificação, oxidação anaeróbia autotrófica de amónio e desnitrificação autotrófica. [37].

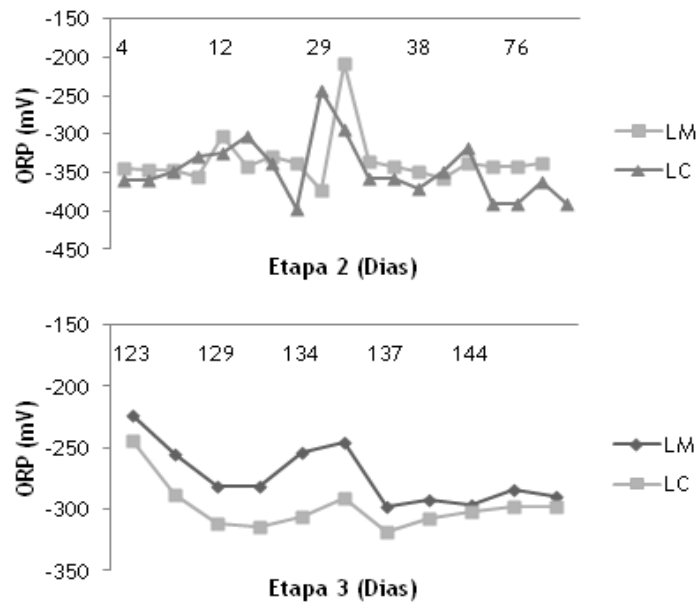


Figura 4.5 - Evolução temporal dos valores de potencial redox no interior dos leitos nas etapas de adaptação.

A análise da Figura 4.5 denota a variabilidade das condições de oxirredução no interior dos leitos, decorrentes das cargas orgânicas afluentes. Globalmente, verifica-se que o leito LC valores de potencial redox mais reduzidos face ao LM. Contudo, ambos os leitos encontram-se sob condições anaeróbias.

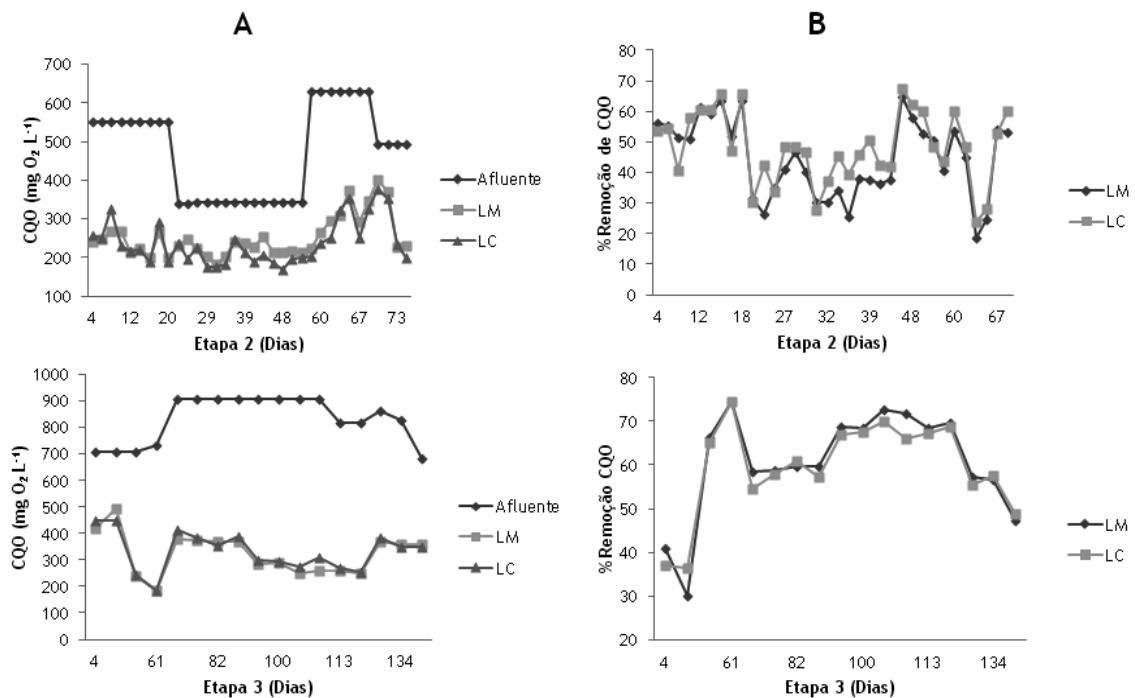


Figura 4.6 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) CQO de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da CQO remoção.

A análise da Figura 4.6 e as Tabelas 4.3 e 4.4 denota a degradação da matéria orgânica no efetuada pelos leitos. Podem observar-se remoções médias de 44% para o LM e 48% para o LC durante a etapa 2.

Durante a etapa 3 observa-se que o aumento da CQO (828,76 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) no afluente faz com que haja um aumento da CQO na saída dos leitos. Contudo, ambos os leitos mostram remoções médias da CQO na ordem dos 60%. Os valores médios dos efluentes dos leitos variaram entre 323 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> para o LM e 333 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> para o LC.

Comparando as duas etapas podemos afirmar que a adaptação dos leitos a afluentes com maior CQO apresenta melhores resultados de remoção. É importante referir que durante as duas etapas de adaptação os valores médios da CQO dos efluentes de ambos os leitos estão acima do estipulado por lei.

Tendo como comparação o tratamento de águas residuais da indústria dos curtumes por LM-ESSH, uma vez que apresentam valores da CQO similares aos da cozedura da cortiça, observa-se que os resultados obtidos durante a Etapa 3 enquadram-se no intervalo de remoção, 41-73%, para este tipo de efluentes residuais [42].

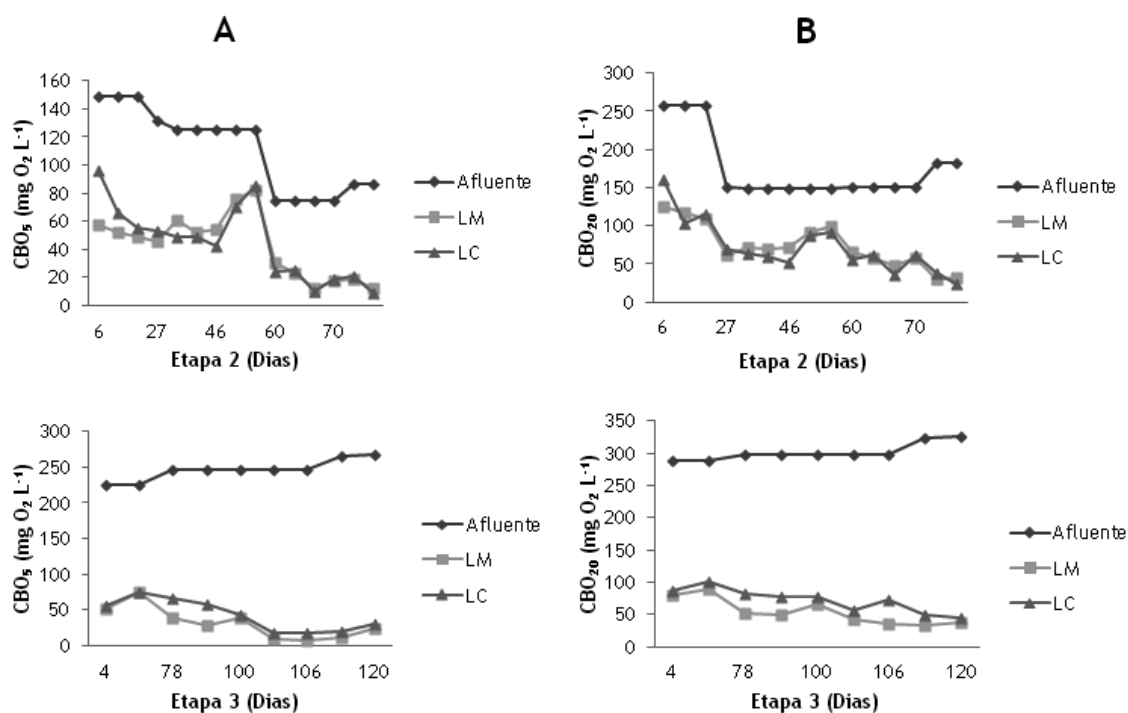


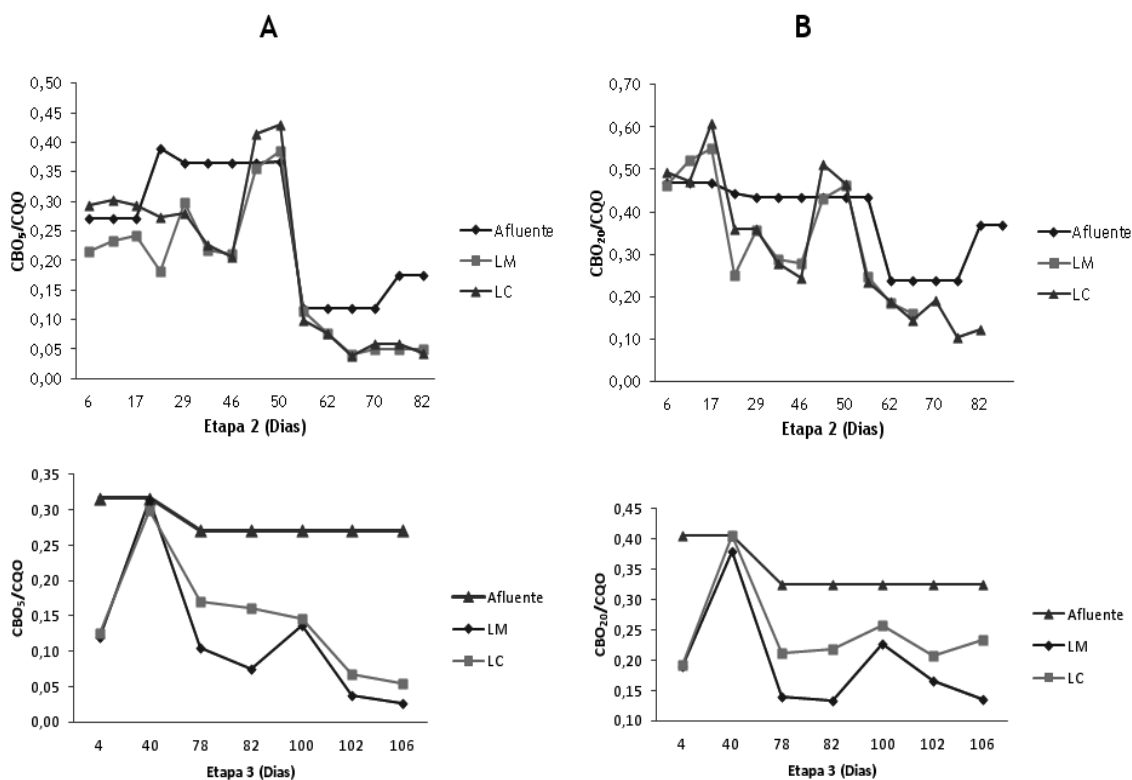
Figura 4.7 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) CBO<sub>5</sub> de afluente e efluente dos leitos; B) CBO<sub>20</sub> de afluente e efluente dos leitos. 2.

Para efluentes complexos, como o caso do efluente do cozimento da cortiça, constituídos por compostos orgânicos que integram um grande intervalo de tamanhos moleculares, deve considerar-se a CBO<sub>5</sub> como a fração rápida e facilmente biodegradável de toda a matéria orgânica disponível. Contudo, o aumento da incubação, CBO<sub>20</sub>, mostra que os microrganismos

ainda têm capacidade para metabolizar alguma matéria orgânica menos favorável à biodegradação.

Através da análise da figura 4.7 e das tabelas 4.3 e 4.4 observam-se que durante a Etapa 3 ocorreu uma maior diminuição da  $CBO_5$  e  $CBO_{20}$  onde os valores à saída de ambos os leitos foram semelhantes. No decorrer da Etapa 3 os valores à saída dos leitos variaram entre 6,90-78  $mg\ O_2\ L^{-1}$  para a  $CBO_5$  e entre 32-100  $mg\ O_2\ L^{-1}$  para a  $CBO_{20}$ . Estes valores equivalem a valores médios de remoção de 85% para a  $CBO_5$  e 80% para a  $CBO_{20}$ .

Durante a Etapa 2 os valores à saída do leito variaram entre 8,7-95,8  $mg\ O_2\ L^{-1}$  para a  $CBO_5$  e entre 24-161  $mg\ O_2\ L^{-1}$  para a  $CBO_{20}$ . Estes valores equivalem a valores médios de remoção de 62% para a  $CBO_5$  e 58% para a  $CBO_{20}$ .



**Figura 4.8** - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A)  $CBO_5/CQO$  de afluente e efluente dos leitos; B)  $CBO_{20}/CQO$  de afluente e efluente dos leitos.

Outros parâmetros utilizados para verificar a biodegradabilidade dos efluentes são a razão de  $CBO_5/CQO$  e a razão  $CBO_{20}/CQO$ . Analisando a figura 4.8 e as tabelas 4.3 e 4.4, observa-se uma diminuição das razões de  $CBO_5/CQO$  e  $CBO_{20}/CQO$  mostrando que, praticamente, toda a matéria orgânica, do afluente, passível de ser metabolizada foi removida durante a Etapa 3.

Relativamente à Etapa 2 os índices de biodegradabilidade apresentam uma maior variabilidade, contudo apresentam, geralmente, uma diminuição das razões  $CBO_5/CQO$  e  $CBO_{20}/CQO$ .

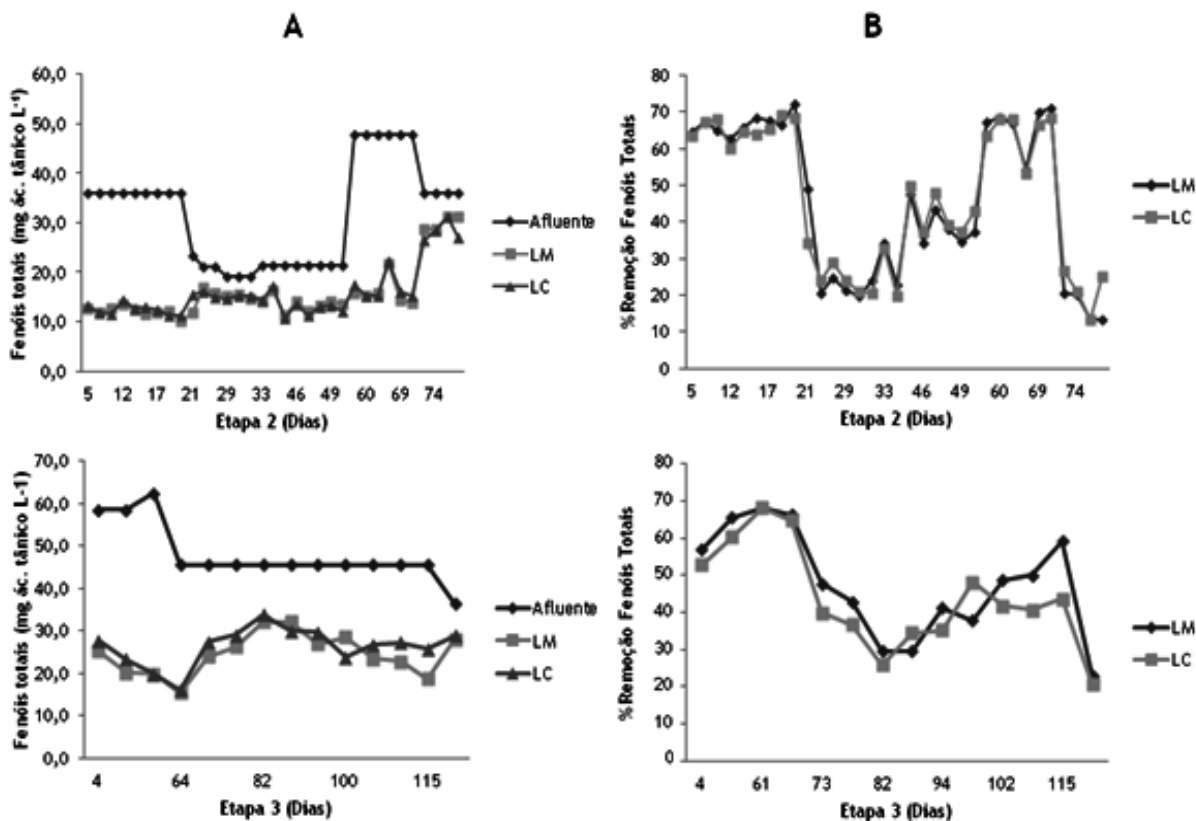


Figura 4.9 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Fenóis totais de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Fenóis totais.

Analisando a figura 4.9 denota-se que a variação na remoção de fenóis totais para a Etapa 2 apresenta valores médios semelhantes em ambos os leitos, 46%. No decorrer da Etapa 3 observaram-se valores médios de remoção de 48% para o LM e 43% para o LC. Deste modo pode dizer-se que a taxa de remoção durante as duas etapas foi praticamente a mesma.

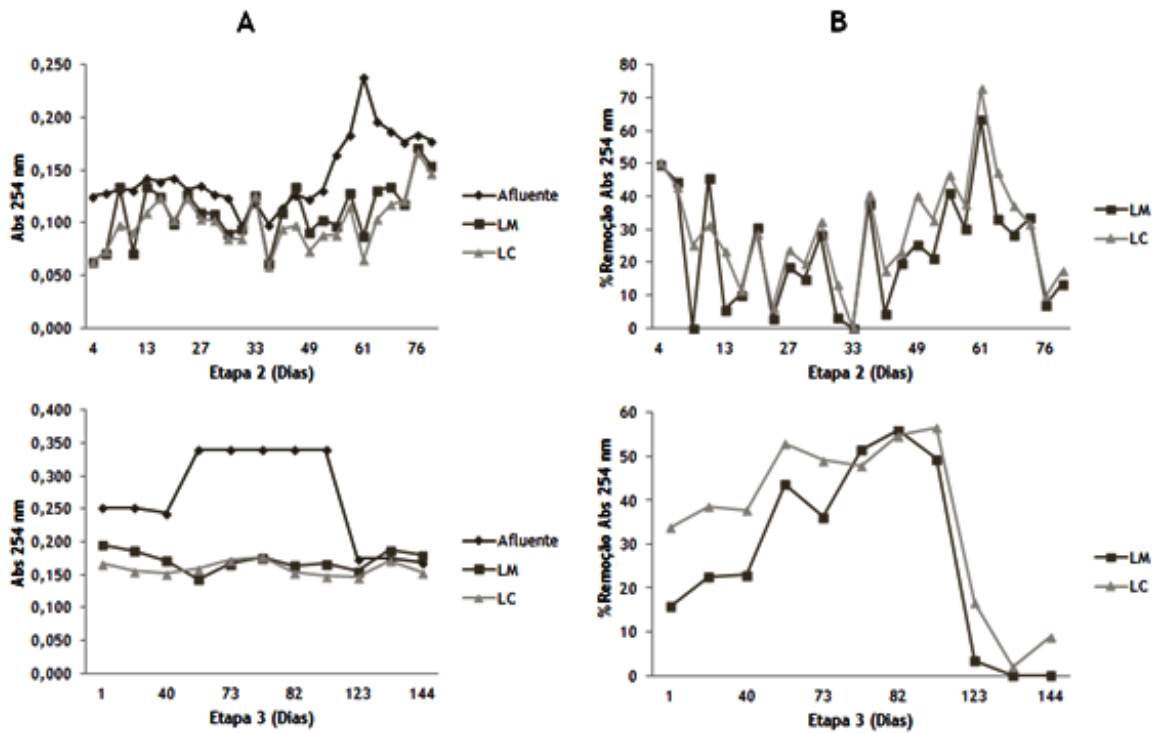


Figura 4.10 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Abs254 nm de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Abs254 nm.

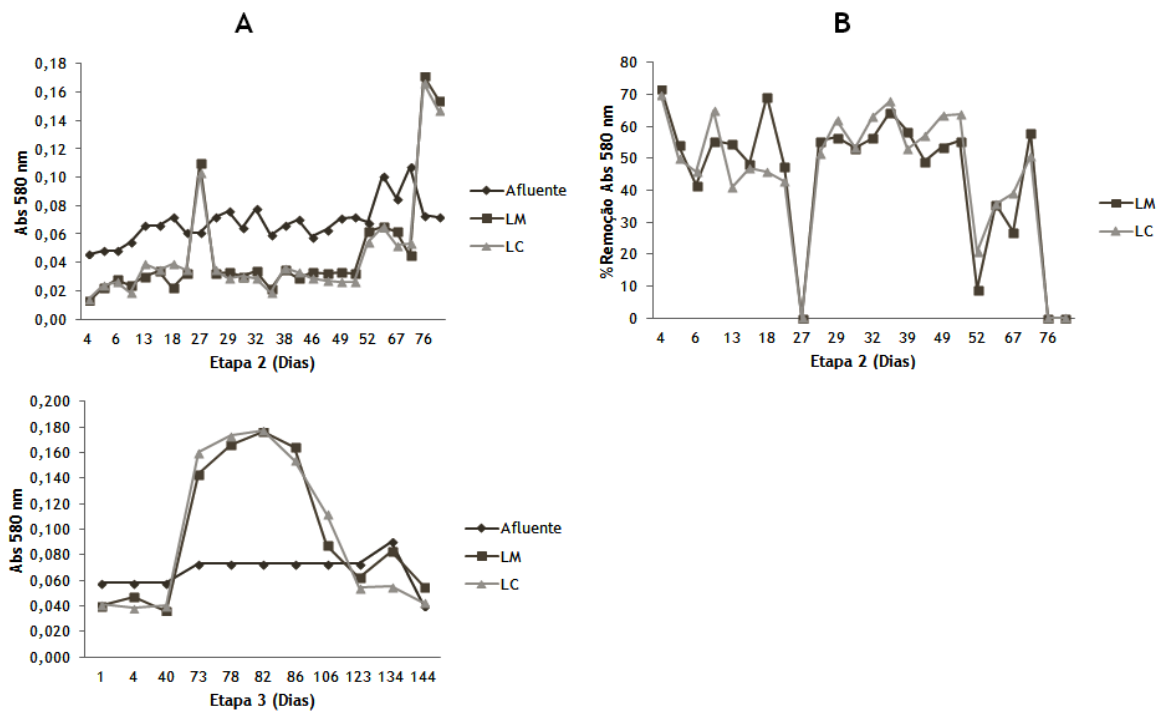


Figura 4.11 - Evolução temporal durante as etapas de adaptação: A) Abs580 nm de afluente e efluente dos leitos; B) Remoção da Abs580 nm.

A absorvência a 254 nm reflete a concentração de compostos aromáticos presentes no afluente e efluente dos leitos. Através da análise da figura 4.10 e da tabela 4.3 denota-se uma grande variação de absorvências durante a Etapa 2, o valor médio de remoção é de 22% para o LM e 29% para o LC.

Relativamente à Etapa 3 verifica-se uma menor variabilidade do que na Etapa 2 mas apenas tem um valor médio de remoção de cerca de 31% para o LM e 36% para o LC.

No que diz respeito à coloração do afluente e efluente dos leitos, absorvência a 580 nm (figura 4.11), é de assinalar que durante a Etapa 2 os leitos ainda conseguem reduzir a coloração do meio aquoso com médias de remoção na ordem dos 44% para ambos os leitos. O mesmo já não acontece durante a Etapa 3 onde os leitos deixam de ter capacidade de remover a coloração, apresentando até valores à saída dos leitos superiores ao do afluente.

## 5. Considerações finais

Os resultados da caracterização do efluente do cozimento da cortiça, confirmaram ser atualmente um dos principais desafios enfrentados pela indústria corticeira. O efluente apresenta uma elevada carga orgânica, com CQO igual a  $1\,756\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ , uma concentração de fenóis totais de  $182,6\text{ mg ácido tânico L}^{-1}$ , e uma coloração castanho-escura intensa. O efluente caracteriza-se também pela sua reduzida biodegradabilidade, com valores de 0,30 e 0,44 para as razões  $\text{CBO}_5/\text{CQO}$  e  $\text{CBO}_{20}/\text{CQO}$ .

A presente dissertação apresentou como objetivo fundamental o estudo das possíveis diferenças de desempenho de leitos de macrófitas com escoamento sub-superficial horizontal (LM-ESSH) na remoção da carência química de oxigênio (CQO), carência bioquímica de oxigênio ( $\text{CBO}_5$  e  $\text{CBO}_{20}$ ), fenóis totais, compostos aromáticos e coloração.

A espécie de macrófitas utilizada foi a *Phragmites australis* tendo o estudo sido efetuado numa instalação piloto pretendendo ser um contributo para o conhecimento desta espécie enquanto componente de sistema do tipo LM-ESSH nas remoções dos parâmetros acima referidos.

No presente estudo efetuaram-se adaptações sucessivas dos leitos a diferentes cargas orgânicas de afluentes de modo a preparar os leitos para a depuração de efluentes reais da cozedura da cortiça. Nestas adaptações sucessivas a teve melhor desempenho em termo de remoção foi a Etapa 3, na qual a carga orgânica administrada foi a mais elevada, em média  $5,4\text{ g CQO m}^{-2}\text{ L}^{-1}$ . Durante esta etapa obtiveram-se valores de remoção da CQO na ordem dos 60% em ambos os leitos. No que se refere a CBO o leito que apresentou melhor desempenho foi o LM, mais 5% de remoção que o LC, com remoções de 86% para a  $\text{CBO}_5$  e 82% para a  $\text{CBO}_{20}$ . O desempenho dos leitos na remoção de fenóis totais durante a Etapa 3 foi, praticamente igual à Etapa 2, obtendo valores médios de remoção de 48% para o LM e 43% para o LC. A remoção média de compostos aromáticos durante este período foi de cerca de 31% para o LM e 36% para o LC. A coloração nesta etapa foi o que apresentou piores resultados uma vez que os leitos não conseguiram remover, praticamente, a cor tendo inclusive valores superiores aos do afluente.

O contributo da *Phragmites australis*, no LM, fez-se notar apenas na remoção da CBO (5 e 20) e dos fenóis totais, nestes parâmetros obteve uma remoção 5% maior que o LC.

De referir também que apesar de algumas taxas de remoção dos parâmetros analisados serem elevadas, de acordo com o Decreto-lei nº 236/98 os efluentes resultantes dos leitos não obtêm os valores necessários para a descarga.

## 5.1 Perspetivas futuras

Seguidamente resumem-se os trabalhos complementares que poderiam dar continuidade a este estudo:

- Implementação de um processo de oxidação química antes ou após o tratamento por leitos de macrófitas.
- Realização de ensaios similares em leitos com diferentes espécies de plantas e/ou meios de enchimento, a fim de avaliar a sua influência na remoção de CQO, CBO<sub>5</sub> e CBO<sub>20</sub>, fenóis totais, compostos aromáticos e coloração.
- Identificação dos géneros e espécies microbiológicas presentes ao longo do comprimento do leito, que poderão fornecer informações complementares sobre os mecanismos de remoção de carbono orgânico.
- Equilibrar os balanços de C/N/P e avaliar a sua influência na remoção das características do efluente.





## Bibliografia

1. Lan, B. Y., Nigmatullin, R., & Li Puma, G. (2008). Ozonation kinetics of cork-processing water in a bubble column reactor. *Water research*, 42(10-11), 2473-82.
2. APCOR, 2012. Cortiça - Cork 2012, Portuguese Cork Association, Santa Maria de Lamas, Portugal
3. Silva, S. P., Sabino, M. a., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., & Reis, R. L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50(6), 345-365.
4. <http://www.cork.pt> (23-11-2012)
5. <http://www.cork-boutique.com> (16-11-2012)
6. Guedes, A. M. (1998). Oxidação Química com Reagente de Fenton: Aplicação às Águas de Cozimento da Cortiça. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto.
7. Costa, A., & Pereira, H. (2004). Caracterização e Análise de Rendimento da Operação de Traçamento na Preparação de Pranchas de Cortiça para a Produção de Rolhas, 12(1), 51-66.
8. Vieira, H. D. (2009). Análise de Características da Cortiça Amadia Relevantes para a sua Qualidade Industrial. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
9. Guia técnico sectorial - Indústria da Cortiça. (2001). Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial.
10. Maciel, A., & Pintor, A. (2010). Tratamento de Águas Residuais da Indústria Corticeira por Processos Combinados Foto-Fenton Solar / Oxidação Biológica.
11. Dias Machado, M. M.; 2005. Degradação biológica de polifenóis: Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal.
12. Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., & Minhalma, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: a biodegradation and valorisation study. *Water research*, 45(2), 904-12.
13. Benítez, F. J., Acero, J. L., & Leal, A. I. (2006). Application of microfiltration and ultrafiltration processes to cork processing wastewaters and assessment of the membrane fouling. *Separation and Purification Technology*, 50(3), 354-364.

14. Geraldés, V., Minhalma, M., Pinho, M. N. De, & Anil, A. (2009). Nanofiltration of Cork Wastewaters and Their Possible Use in Leather Industry as Tanning Agents. *Methods*, 18(3), 353-357.
15. Allgeier, S., Alspach, B., & Vickers, J. (2005). Membrane filtration guidance manual. *United States Environmental Protection Agency, US*, (November).
16. Heredia, J. B. De, Domínguez, J. R., & López, R. (2004). Advanced oxidation of cork-processing wastewater using Fenton's reagent: kinetics and stoichiometry. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(4), 407-412.
17. Acero, J. L., Benítez, F. J., Heredia, J. B. De, & Leal, A. I. (2004). Chemical treatment of cork-processing wastewaters for potential reuse. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79(10), 1065-1072.
18. Guedes, A. M., Madeira, L. M., Boaventura, R. a, & Costa, C. a. (2003). Fenton oxidation of cork cooking wastewater--overall kinetic analysis. *Water research*, 37(13), 3061-9.
19. Peres, J. a, Beltrán de Heredia, J., & Domínguez, J. R. (2004). Integrated Fenton's reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of hazardous materials*, 107(3), 115-21.
20. Benítez, F. J., Acero, J. L., Leal, A. I., & Real, F. J. (2008). Ozone and membrane filtration based strategies for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of hazardous materials*, 152(1), 373-80.
21. Sharma, S., Ruparelia, J. P., & Patel, M. L. (2011). A general review on Advanced Oxidation Processes for waste water treatment, *nuicone.org*, 382-481.
22. Stocking, A., Rodriguez, R., Browne, T., & Ph, D. (n.d.). 3.0 Advanced Oxidation Processes.
23. Gaylarde, C. C., Bellinaso, M. D. L., & Manfio, G. P. (2005). Aspéctos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos.
24. Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74(1), 63-67.
25. Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
26. Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research*, 2011(Figure 1), 11.

27. Battimelli, A., Loisel, D., Garcia-Bernet, D., Carrere, H., & Delgenes, J.-P. (2010). Combined ozone pretreatment and biological processes for removal of colored and biorefractory compounds in wastewater from molasses fermentation industries. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(7), 968-975.
28. Bioremediation, C., Hazen, T. C., & Berkeley, L. (2010). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. K. N. Timmis, (Ed.).
29. Sánchez-Andrea I, Triana D, Sanz JL. (2012). Bioremediation of acid mine drainage coupled with domestic wastewater treatment. *Water Science Technology*, 66(11), 2425-31.
30. Idris, A., Hashim, R., & Rahman, R. (2007). Application of Bioremediation Process for Textile Wastewater Treatment Using Pilot Plant. *International Journal of ...*, 4(2), 228-234.
31. Oller, I., Malato, S., & Sánchez-Pérez, J. a. (2011). Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination--a review. *The Science of the total environment*, 409(20), 4141-66.
32. Ledakowicz, S., Solecka, M., & Zylla, R. (2001). Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. *Journal of biotechnology*, 89(2-3), 175-84.
33. Mendonça, E., Pereira, P., Martins, a., & Anselmo, a. M. (2004). Fungal Biodegradation and Detoxification of Cork Boiling Wastewaters. *Engineering in Life Sciences*, 4(2), 144-149.
34. US Environmental Protection Agency (EPA/US), Constructed wetlands treatment of municipal wastewaters, EPA 625-R-99-010, 2000.
35. Davis, L. (1995). *A handbook of constructed wetlands* (Vol. 1, p. 57).
36. Seco, T., Duarte, A., Peres, J., & Bentes, I. (2008). Avaliação do Desempenho de Sistemas de Leitões de Macrófitas no Tratamento de Águas Residuais Domésticas. *civil.uminho.pt*, 12.
37. Oliveira, J. M. (2008). Estudo da Influência do Material de Enchimento na Remoção de Matéria Orgânica , Azoto e Sólidos em Leitões de Macrófitas do Tipo ESSH. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.
38. Vymazal, J. (2008). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment : A Review, 965-980.

39. Vymazal, J. (2010). Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environmental science & technology*, 45(1), 61-9.
40. Yalcuk, A., Pakdil, N. B., & Turan, S. Y. (2010). Performance evaluation on the treatment of olive mill waste water in vertical subsurface flow constructed wetlands. *Desalination*, 262(1-3), 209-214.
41. Ong, S.-A., Uchiyama, K., Inadama, D., Ishida, Y., & Yamagiwa, K. (2010). Treatment of azo dye Acid Orange 7 containing wastewater using up-flow constructed wetland with and without supplementary aeration. *Bioresource technology*, 101(23), 9049-57.
42. Calheiros, C. S. C., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2007). Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. *Water research*, 41(8), 1790-8.
43. Scholz, M., Harrington, R., Carroll, P., & Mustafa, A. (2010). Monitoring of nutrient removal within integrated constructed wetlands (ICW). *Desalination*, 250(1), 356-360.
44. Vymazal, J. (2009). The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering*, 35(1), 1-17.
45. Shan, B., Ao, L., Hu, C., & Song, J. (2011). Effectiveness of vegetation on phosphorus removal from reclaimed water by a subsurface flow wetland in a coastal area. *Journal of Environmental Sciences*, 23(10), 1594-1599.
46. Thorén, A.-K., Legrand, C. e Herrmann, J. (2003). Transport and transformation of de-icing urea from airport runways in a constructed wetland system. *Water Science and Technology*, 48(5), 283-290 pp.
47. Khan, S., Ahmad, I., Shah, M. T., Rehman, S., & Khaliq, A. (2009). Use of constructed wetland for the removal of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of environmental management*, 90(11), 3451-7.
48. Dordio, A., & Gonçalves, P. (2011). Pharmaceuticals sorption behaviour in granulated cork for the selection of a support matrix for a constructed wetlands system. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, (October), 37-41.
49. Vymazal, J. (2007). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *The Science of the total environment*, 380(1-3), 48-65.
50. Maine, M. a, Duarte, M. V, & Suñé, N. L. (2001). Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water research*, 35(11), 2629-34.

51. Brix, H. (1994). Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 29(4), 71-78.
52. Vymazal, J. (2010). Constructed Wetlands for Wastewater Treatment. *Water*, 2(3), 530-549.
53. Faulwetter, J. L., Gagnon, V., Sundberg, C., Chazarenc, F., Burr, M. D., Brisson, J., Camper, A. K., et al. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 35(6), 987-1004.
54. Albuquerque, a, Oliveira, J., Semitela, S., & Amaral, L. (2009). Influence of bed media characteristics on ammonia and nitrate removal in shallow horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Bioresource technology*, 100(24), 6269-77.
55. APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington, DC, USA
56. Makkar, H., Blummel, M., Brorowy, M., Becker, N., (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61(2), 161-165.
57. System OxiTop Control - Operating Manual, WTW (1998) Germany.
58. Da Piedade Silva, T.; 2011. Avaliação dos antioxidantes presentes nas águas de processo da indústria corticeira. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.
59. Metcalf, I. Eddy, 1991. Wastewater Engineering Treatment Disposal Reuse, 3rd ed., McGraw Hill International Editions, Singapore
60. Benítez, F., Acero, J., Leal, A., 2008 (b). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination* 229(1-3), 156-169.
61. Benítez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I., Gonzalez, M., 2009. The use of ultrafiltration and nanofiltration membranes for the purification of cork processing wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 162(2-3), 1438-1445.
62. Kadlec, R.H., Wallace, S.D., 2008. Treatment Wetlands, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, FL.
63. Kadlec, R., & Reddy, K. (2001). Temperature effects in treatment wetlands. *Water Environment Research*, 73(5), 543-557.



# Anexos

## Anexo 1

Neste anexo, é apresentado o protocolo experimental para as determinações da biodegradabilidade aeróbia, da preparação de biomassa para os ensaios de CBO e dos fenóis totais, bem como os reagentes utilizados e preparação/composição dos mesmos.

### Protocolo experimental para determinação de CBO

Em cada frasco (310 mL de capacidade total) deve introduzir-se:

- 0,8 mL de solução de macro nutrientes;
- 0,4 mL de solução de micro nutrientes;
- 1,2 mL de solução de tampão fosfato (pH 7,2);
- 0,4 mL de solução de cloreto de amónio;
- 2 mL de biomassa aeróbia;
- Diluição da amostra com pH corrigido entre 6,5 e 7,5.

Após introduzir estes elementos, o volume deve ser ajustado a 100 mL com água destilada.

1. Antes de se fecharem os frascos, é necessário introduzir NaOH no topo de cada frasco para fixar o dióxido de carbono que é libertado durante o ensaio.
2. Após fechar os frascos, estes são introduzidos numa incubadora, sob agitação constante, à temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 2 horas para estabilizar a temperatura, previamente ao início do ensaio.
3. Quando a temperatura atinge valores estáveis, o ensaio tem início usando-se um controlador OxiTop que irá medir o oxigénio consumido, durante o ensaio.
4. Ao fim do ensaio (5 ou 20 dias), os resultados são recolhidos com o controlador OxiTop.
5. Finalmente, os resultados são transferidos do controlador OxiTop para o computador.

O branco é preparado da mesma forma que as amostras, sendo o volume da amostra substituído por água destilada; no caso das amostras padrão, o volume da amostra é substituído por uma solução de glucose e ácido glutâmico.

### Reagentes:

- Solução de macro-nutrientes: 27,7 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 101 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4,84 g L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O.
- Solução de micro-nutrientes: 40 mg L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 57 mg L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 43 mg L<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, 35 mg L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 100 mg L<sup>-1</sup> FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 100 mg L<sup>-1</sup> EDTA.
- Solução de glucose e ácido glutâmico: 15 g L<sup>-1</sup> ácido glutâmico e 15 g L<sup>-1</sup> glucose. Antes de preparar esta solução, é necessário secar os reagentes a 103 °C, durante 1 horas.
- Solução de cloreto de amónio: 38,2 g L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl.
- Solução tampão de fosfato: 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,1 M NaOH. Este tampão deve ter pH igual a 7,2.

### Protocolo experimental para preparação de biomassa para os ensaios de CBO

1. Centrifugar a biomassa de forma a retirar o “meio de cultura” (para otimizar a centrifugação pode-se deixar sedimentar e em seguida decantar, de forma a concentrar a biomassa.) Meia ampola tem, aproximadamente, 8g de biomassa.
2. Decantar e re-suspender a biomassa em tampão fosfato 0,1M.
3. Colocar a suspensão em agitação 20/30 min de forma a “lavar” a biomassa e retirar os nutrientes presentes no meio de cultura.
4. Repetir o ponto 2 e 3 (três ou mais vezes).
5. Agitar 12h na incubadora de CBO (durante a noite)

Depois de decantar, pesar a biomassa (precipitado da centrifugação) e re-suspender de forma a obter uma solução de biomassa em tampão fosfato de 333g L<sup>-1</sup> de tampão (3 ml de tampão por grama de biomassa).

1 Solução tampão fosfato: Pesar 13,8 gramas de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 2 gramas de NaOH e dissolver em 1 L de H<sub>2</sub>O. Corrigir o pH para 6,9-7,1 com NaOH.

### Protocolo experimental para determinação de Fenóis Totais

O protocolo experimental para determinação dos fenóis totais no efluente do cozimento da cortiça e nas frações antes e após ozonização foi baseado na técnica proposta por Makkar *et al.* (1993) com algumas adaptações. Esta quantificação é baseada no reagente *Folin-Ciocalteu*.

**Soluções padrão:**

1. Preparar soluções padrão com concentrações entre 0 a 25 mg L<sup>-1</sup> e adicionar um volume igual a 2 mL aos tubos.
2. Adicionar 1 mL de reagente *Folin-Ciocalteu* em cada tubo e agitar no vortex.
3. Adicionar 5 mL de solução de NaCO<sub>3</sub> (20%), agitar bem e deixar à temperatura ambiente, no escuro, durante 40 minutos.
4. Passados 40 minutos, ler as absorvências das amostras a 765 nm, realizando o zero com o branco.
5. Com os resultados pode construir-se a reta de calibração.

**Amostras:**

1. Realizar as diluições de amostras pretendidas e adicionar 2 mL das mesmas nos tubos.
2. Proceder do mesmo modo que nas soluções padrão.
3. Ler as absorvências das amostras a 765 nm, sendo a concentração de fenóis totais estimada pela reta de calibração.

**Reagentes:**

Reagente *Folin-Ciocalteu* (1 N): o reagent comercial *Folin-Ciocalteu* é diluído no mesmo volume de água destilada. A solução resultante deve ser conservada no escuro a 4 °C envolta em papel de alumínio.

Solução de carbonato de sódio, NaCO<sub>3</sub> (20 %): dissolver 50 g de carbonato de sódio (NaCO<sub>3</sub>.10H<sub>2</sub>O) em água destilada e transferir para um balão volumétrico de 250 mL, perfazendo o volume com água destilada.

Solução padrão de ácido tânico (0,5 mg mL<sup>-1</sup>): dissolver 25 mg de ácido tânico em água destilada e transferir para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o restante volume perfeito com água destilada. Esta solução só deve ser preparada para utilização imediata

## Anexo 2

Neste anexo encontra-se descrito a composição do meio da biomassa aeróbia.

### Composição do meio de biomassa aeróbia

Tabela A1: Descrição da composição do meio da biomassa aeróbia.

Substâncias	Concentrações
Macro-nutrientes <sup>1</sup>	0,5 mL L <sup>-1</sup>
Micro-nutrientes <sup>2</sup>	0,5 mL L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	0,017 g L <sup>-1</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,037 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,030 g L <sup>-1</sup>
Glucose	1,8 g L <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub> <sup>3</sup>	3,7 - 4 g L <sup>-1</sup>
HCl 37%	0,09 mL L <sup>-1</sup>

1) Composição: 27,7 g L<sup>-1</sup> of CaCl<sub>2</sub>, 101 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 4,84 g L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O. 2) Composição: 40 mg L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 57 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 43 mg L<sup>-1</sup> de ZnCl<sub>2</sub>, 35 mg L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 100 mg L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O e 100 mg L<sup>-1</sup> de EDTA. 3) Esta quantidade é ajustável até se atingir um pH neutro entre 7 e 8

## Anexo 3

Neste anexo são apresentadas as retas de calibração obtidas para a quantificação dos fenóis totais, [56].

### Reta de calibração para quantificação de Fenóis Totais

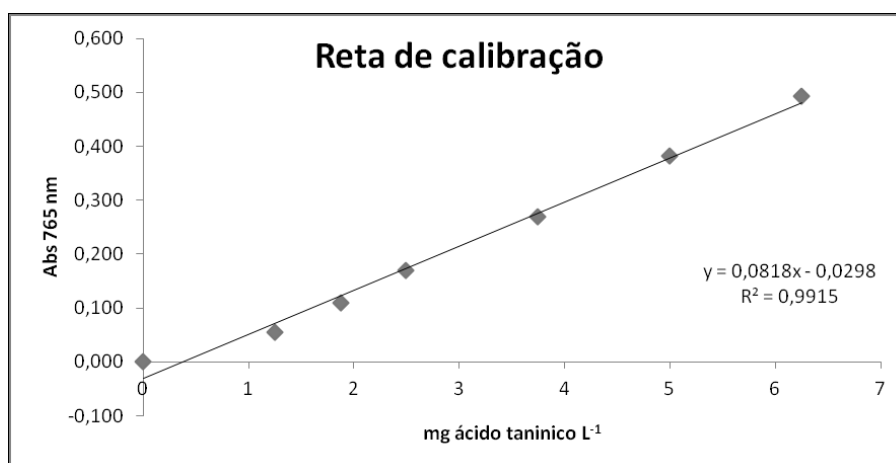


Figura A1-Reta de calibração utilizada para quantificação de Fenóis Totais