



DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

# DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE POLIFENÓIS

## Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça

**Maria Manuela Dias Machado**

Licenciada em Engenharia do Ambiente pela  
Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Dissertação submetida para satisfação parcial  
dos requisitos do grau de mestre em  
**Engenharia do Ambiente**  
(ramo de Gestão e Tratamento de Resíduos Industriais)

Dissertação realizada sob a supervisão da  
**Professora Doutora Olga Cristina Pastor Nunes**  
do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da  
Universidade do Porto e da  
**Professora Doutora Célia Maria Manaia Rodrigues**  
da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Porto, Abril de 2005

Aos meus pais

## RESUMO

Na indústria de transformação da cortiça são produzidas grandes quantidades de águas de cozedura. Estas águas contêm elevados níveis de polifenóis, como taninos hidrolisáveis (ácido tânico e os seus metabolitos) que apresentam propriedades tóxicas.

Com o objectivo de isolar culturas bacterianas capazes de degradar polifenóis, isolaram-se três culturas de água de cozedura de cortiça à temperatura de 25 °C e a pH's 4,7 e 7,2 e à temperatura de 50 °C e a pH 4,7 usando enriquecimentos em ácido tânico. A cultura de enriquecimento mesofílica obtida a pH 4,7 apresentou maior redução de Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e de polifenóis do que a cultura de enriquecimento termofílica. Porém, apesar de a cultura de enriquecimento mesofílica ter sido mais eficiente a remover o ácido tânico, a cultura de enriquecimento termofílica produziu menor quantidade de biomassa para degradar a mesma quantidade de polifenóis, o que pode ser uma vantagem num sistema de tratamento biológico.

Apesar da eficácia demonstrada na degradação de ácido tânico, as culturas de enriquecimento mesofílicas apresentaram fraca capacidade para degradar os polifenóis existentes na água de cozedura de cortiça. A versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento obtidas a pH 4,7 e de cada um dos respectivos isolados também foi testada para diferentes compostos fenólicos e outras fontes de carbono designadamente açúcares, aminoácidos, vitaminas e bases nitrogenadas. A cultura de enriquecimento mesofílica apresentou maior versatilidade na utilização de fontes únicas de carbono do que a cultura termofílica.

As três culturas de enriquecimento foram caracterizadas quanto à sua composição em bactérias cultiváveis, observando-se que todas as bactérias mesofílicas recuperadas eram Gram negativas enquanto as termofílicas eram Gram positivas. A cultura de enriquecimento mesofílica obtida a 25 °C e pH 7,2 (M 7,2) era constituída por cinco isolados bacterianos identificados como pertencentes às espécies *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae* (2 isolados), *Pseudomonas fluorescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*. A cultura de enriquecimento obtida a 25 °C e pH 4,7 (M 4,7) era composta por dois isolados pertencentes às espécies *Burkholderia tropicalis* e *Klebsiella pneumoniae* e a cultura de enriquecimento obtida a 50 °C e pH 4,7 (T 4,7) por dois isolados das espécies "*Bacillus acidogenesis*" e *Bacillus licheniformis*.

## ABSTRACT

In the cork transformation industry large quantities of cooking water are produced. This water contains a high level of polyphenolic compounds, such as hydrolysable tannins (tannic acid and its phenolic metabolites), which have toxic properties.

In order to isolate bacterial cultures able to degrade polyphenols, three bacterial mixed cultures were isolated from cooking water of a cork-processing plant, at 25 °C and pH 4.7 or 7.2 and at 50 °C and pH 4.7, through enrichments in tannic acid. The mesophilic enrichment cultures presented higher reduction of dissolved organic carbon (DOC) and tannic acid depletion than the thermophilic culture. The mesophilic enrichment culture was more efficient on the removal of the tannic acid. However, for the same quantity of degraded polyphenols, the thermophilic enrichment culture produced a smaller quantity of biomass, which can be considered an advantage in a biological treatment system.

Despite the effectiveness to degrade tannic acid, the mesophilic enrichment cultures presented low capacity to degrade the polyphenols present in the cork cooking water. Nutritional versatility of cultures (meso and thermophilic) and of each of their respective isolates at pH 4.7 was also assessed for different phenolic compounds and other carbon sources (sugars, aminoacids, vitamins and bases). The mesophilic enrichment culture presented higher nutritional versatility than the thermophilic culture.

The culturable bacteria isolated from the mesophilic enrichment cultures were Gram negative, while those isolated from the thermophilic enrichment culture were Gram positive. The enrichment culture obtained at 25 °C and pH 7.2 (M 7.2) was composed by five bacterial isolates identified as *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae* (2 strains), *Pseudomonas fluorescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*. The enrichment culture obtained at 25 °C and pH 4.7 (M 4.7) was composed by two isolates identified as *Burkholderia tropicalis* and *Klebsiella pneumoniae*. The enrichment culture obtained at 50 °C and pH 4.7 (T 4.7) was composed by two isolates identified as "*Bacillus acidogenesis*" and *Bacillus licheniformis*.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição de várias pessoas a quem devo os meus mais sinceros agradecimentos.

Às Professoras Doutora Olga Nunes e Doutora Célia Manaia agradeço o apoio científico e a disponibilidade com que orientaram esta tese.

À Engenheira Ana Macedo agradeço a amabilidade e a facilidade prestada na obtenção de amostras de água de cozedura de cortiça.

Às Engenheira Alberta Macedo, Engenheira Sílvia Faia e Dona Maria do Céu Lopes agradeço o apoio e a disponibilidade para a realização das análises da água de cozedura de cortiça.

À Doutora Balbina Nogales da Universidade das Ilhas Baleares (Palma de Maiorca) agradeço a disponibilidade e amabilidade para analisar a sequência do gene rRNA 16S das estirpes bacterianas isoladas.

Aos meus colegas do laboratório da Escola Superior de Biotecnologia, Albina Franco, Francisco Campos e Miguel Silva agradeço por toda a ajuda e simpatia.

Aos meus colegas da Faculdade de Engenharia, Ana Filipa Portugal, Adriano Ribeiro, Ana Pereira, Cândida Manuel, Cláudia Coelho, Eduardo Oliveira, Ivone Moreira, João Santos, Luisa Barreiros, Mónica Silva, Patrícia Correia, Roxane Rosmaninho, Sofia Fernandes e Susana Lamas, agradeço por toda a ajuda, apoio, simpatia e amizade.

Agradeço ainda a todas as pessoas que apesar de não estarem aqui mencionadas contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E por fim, um agradecimento muito especial à minha família – mãe, irmãos e sobrinho – por todo o carinho, compreensão, paciência, apoio e dedicação constantemente demonstrados.

## ÍNDICE

RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	4
AGRADECIMENTOS .....	5
ÍNDICE.....	6
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS .....	8
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....	9
1.1. Enquadramento Geral .....	9
1.2. Indústria da cortiça .....	10
1.3. Polifenóis .....	14
1.4. Estudos de biodegradação de polifenóis.....	21
1.5. Mecanismos de degradação de polifenóis.....	23
1.6. Objectivos do estudo .....	26
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
2.1. Recolha e conservação da amostra .....	28
2.2. Caracterização físico-química da água de cozedura de cortiça .....	28
2.3. Meios de cultura .....	31
2.4. Enumeração dos microrganismos heterotróficos totais a 25 °C e 50 °C.....	33
2.5. Culturas de enriquecimento .....	34
2.6. Manutenção das culturas .....	34
2.7. Isolamento, purificação e identificação .....	35
2.8. Relação entre densidade óptica e biomassa.....	44
2.9. Estudo cinético de degradação de ácido tânico a 25 °C e a 50 °C a pH 4,7 ....	45
2.10. Crescimento a 25 °C da cultura de enriquecimento termofílica T 4,7.....	47
2.11. Biodegradação de polifenóis de água de cozedura de cortiça em reactor fechado .....	47
2.12. Ensaios de degradação de polifenóis com <i>resting cells</i> das culturas de enriquecimento de M 4,7 e T 4,7.....	48
2.13. Crescimento da cultura de enriquecimento M 4,7 em água de cozedura de cortiça suplementada com ácido tânico e ácido gálico.....	49
2.14. Métodos Analíticos.....	50

---

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
3.1. Caracterização físico-química da água de cozedura de cortiça .....	55
3.2. Enumeração dos microrganismos heterotróficos totais a 25 °C e a 50 °C presentes na água de cozedura de cortiça .....	56
3.3. Enriquecimento e caracterização das culturas .....	57
3.4. Estudo cinético de crescimento e degradação de polifenóis pelas culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7.....	66
3.5. Crescimento e degradação da cultura de enriquecimento T 4,7 à temperatura de 25 °C .....	70
3.6. Biodegradação de polifenóis de água de cozedura de cortiça em reactor fechado pelas culturas de enriquecimento M 7,2 e M 4,7 .....	71
3.7. Ensaio de degradação de polifenóis por <i>resting cells</i> das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7.....	74
3.8. Avaliação da capacidade de degradação de ácido tânico e de ácido gálico em água de cozedura de cortiça pela cultura de enriquecimento M 4,7.....	78
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO.....	81
4.1. Conclusões.....	81
4.2. Trabalho futuro .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
ANEXO A – Dados experimentais dos perfis de crescimento e degradação das culturas de enriquecimento em ácido tânico .....	94
ANEXO B – Dados experimentais dos ensaios em reactor fechado com as culturas de enriquecimento M 7,2 e M 4,7 .....	95
ANEXO C – Dados experimentais dos ensaios de <i>resting cells</i> das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7.....	96

## **LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

SST – Sólidos Suspensos Totais

CBO<sub>5</sub> – Carência Bioquímica de Oxigênio

CQO – Carência Química de Oxigênio

COT – Carbono Orgânico Total

COD – Carbono Orgânico Dissolvido

VLE – Valor limite de emissão

PCA – Plate Count Agar

D.O. – Densidade Óptica

HPLC – Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência

# CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1. Enquadramento Geral

Portugal é líder mundial na produção e transformação de cortiça. O nosso país possui 33 % da área mundial ocupada por sobreiros, com uma produção média anual de 185 000 toneladas. Portugal detém 55 % da produção e 85 % da transformação de cortiça a nível mundial. O processo de transformação da cortiça envolve o uso de grandes quantidades de água, havendo conseqüentemente uma elevada produção de águas residuais (AEP, 2000).

Das águas residuais produzidas na indústria da cortiça, as de cozedura são as mais difíceis de tratar, visto apresentarem uma composição complexa, rica em substâncias recalcitrantes. Este problema é agravado pelo facto de existirem muitas unidades industriais de pequena dimensão, com caudais de águas residuais baixos e descontínuos, que são encaminhados para os meios receptores sem qualquer tratamento prévio.

As águas residuais da indústria da cortiça apresentam uma elevada carga orgânica e considerável toxicidade pois recorrem à extracção a quente das substâncias hidrossolúveis. Estas águas são ricas em polifenóis (taninos), aminoácidos livres e outros extractivos, que permanecem em solução e que contribuem para a acidificação das águas (AEP, 2000).

Os polifenóis são compostos que, caso não sejam removidos das águas residuais, podem alterar as propriedades dos ecossistemas aquáticos (aromaticidade, relação carbono:azoto, cor e reactividade) bem como produzirem efeitos fitotóxicos e antibacterianos. Para além disso, a sua presença nas águas para consumo humano pode levar à formação de clorofenóis, resultante da desinfecção com cloro, que são compostos cancerígenos, muito mais tóxicos e resistentes à biodegradação do que os compostos fenólicos não clorados.

Para a remoção de polifenóis de águas residuais têm sido propostos métodos físicos, químicos e até biológicos. Aparentemente, qualquer uma destas abordagens apresenta fortes limitações tais como elevados custos, problemas técnicos, baixa eficiência, morte celular durante o bioprocessamento e a necessidade de elevadas áreas para as instalações (Ettayebi *et al.*, 2003).

A biorremediação é uma forma rápida, economicamente vantajosa e ambientalmente sustentável de remoção de compostos orgânicos, pois pode promover uma redução rápida da concentração, toxicidade e mobilidade dos poluentes.

A maioria dos compostos orgânicos produzidos naturalmente poderão ser utilizados, nas condições apropriadas, como fonte de carbono e energia por alguns microrganismos, pelo que o tratamento biológico simples ou combinado com outros processos pode ser uma opção para o tratamento de efluentes.

Tendo em consideração que os polifenóis são substâncias que apresentam alguma resistência à biodegradação e que as águas residuais da indústria corticeira atingem temperaturas elevadas, entendeu-se haver interesse em avaliar o potencial de biodegradação da flora microbiana mesófila e termófila destas águas.

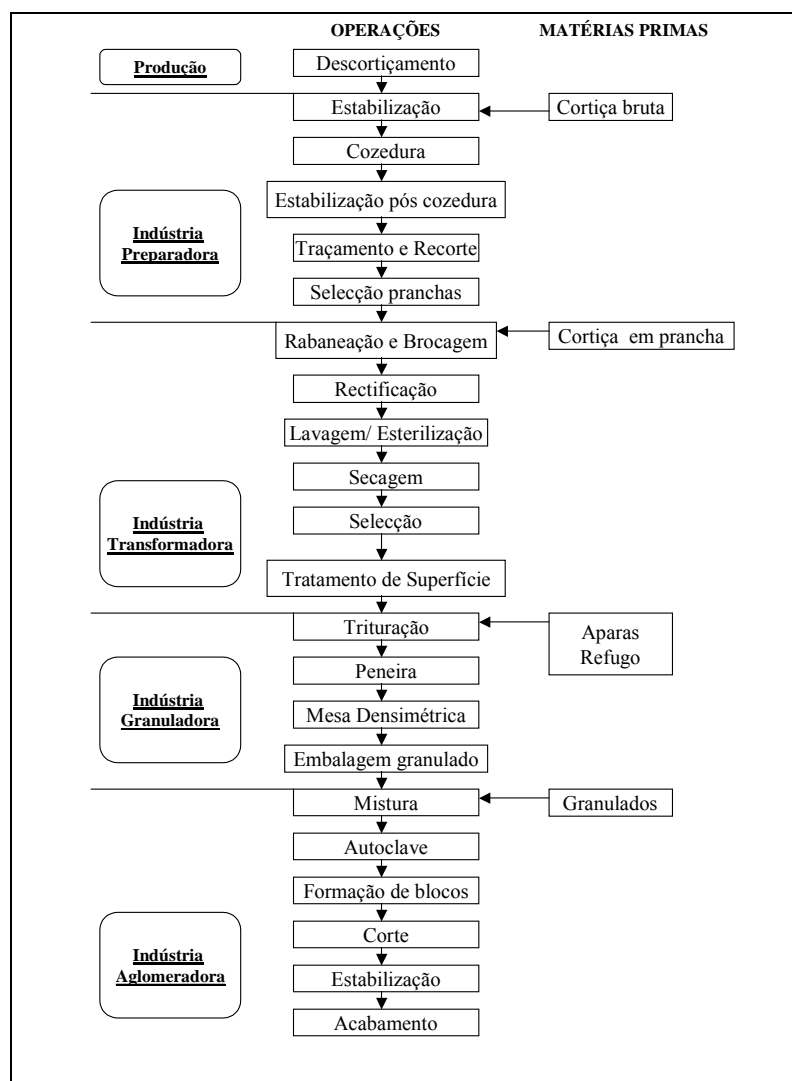
## **1.2. Indústria da cortiça**

A cortiça é um produto natural, leve, elástico, impermeável, renovável, reciclável, biodegradável, para além de ser um excelente isolante térmico e de apresentar boas características de correcção acústica e vibrática. Pelas suas características possui aplicações em vários sectores de actividade, nomeadamente: vinícola, construção civil, indústria automóvel, pesca, calçado, entre outros.

O sector corticeiro é dominado por pequenas e muito pequenas empresas (microempresas), existindo 1 100 empresas em Portugal.

A nível ambiental as áreas mais gravosas são os efluentes líquidos (águas de cozedura e lavagem), os resíduos sólidos (aparas e pó de cortiça) e o ruído (processos de despoeiramento).

A preparação mecânica que a cortiça sofre antes de entrar no processo produtivo, as tecnologias usadas e os produtos finais permitem destacar quatro subsectores Indústria Preparadora, Indústria Transformadora, Indústria Granuladora e Indústria Aglomeradora, cujas principais actividades se encontram sumariadas na Figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma Genérico do Processo Produtivo do Sector Corticeiro (adaptado de AEP, 2000).

### 1.2.1. Águas de cozedura de cortiça

O problema dos efluentes líquidos do sector da cortiça manifesta-se sobretudo ao nível das águas de cozedura. Esta água apresenta uma composição complexa e variada, designadamente no que se refere a compostos fenólicos, sendo a presença de polifenóis (taninos) de particular relevância visto apresentarem elevada toxicidade, mesmo em concentrações baixas. Além de compostos fenólicos, outros compostos solúveis são libertados na água. Factores ambientalmente desfavoráveis são também o baixo pH devido à extracção de ácidos polifenólicos e a temperatura elevada a que estas águas são libertadas. A presença destes compostos origina valores elevados de Sólidos Suspensos

Totais (SST), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO<sub>5</sub>) e Carência Química de Oxigénio (CQO), bem como o aparecimento de cheiro e cor intensos (AEP, 2000; Minhalma & Pinho, 2001; Guedes *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

Nestas águas atingem-se ainda concentrações relativamente elevadas de ferro e cobre em diferentes estados de oxidação. Na Tabela 1 apresenta-se uma caracterização geral das águas residuais da cozedura da cortiça, bem como os valores limite de emissão (VLE) para vários parâmetros na descarga de águas residuais para o meio receptor (D.L. n.º.236/98, de 1 de Agosto). Como se pode constatar, as águas de cozedura de cortiça não podem ser encaminhadas para os meios receptores (água ou solo) sem tratamento prévio.

**Tabela 1.** Caracterização das Águas Residuais da Cozedura da Cortiça e valores limite de emissão (VLE) na descarga de águas residuais (AEP, 2000).

Parâmetro	Expressão dos Resultados	Valores Médios	Valores Médios	Valor Máximo Admissível
pH	Escala Sörensen	4,5-5,5	4,62	6,0-9,0
T amostragem	°C	85-95	98	Aumento de 3°C
CBO <sub>5</sub>	mg.L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	1100-1800	1124	40
CQO	mg.L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub>	4500-5500	5093	150
SST	mg.L <sup>-1</sup>	500-1000	1775	60
Cobre Total	mg.L <sup>-1</sup> Cu	0,4-0,7	0,6	1,0
Ferro Total	mg.L <sup>-1</sup> Fe	5-6	6,4	2,0
Cheiro		Detectável na diluição 1:20	Detectável na diluição 1:20	Não detectável na diluição 1:20
Cor		Visível na diluição 1:20	Visível na diluição 1:20	Não visível na diluição 1:20
Fenóis	mg.L <sup>-1</sup> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	0,4-0,7	0,6	0,5
Sulfatos	mg.L <sup>-1</sup> SO <sub>4</sub>	100-150	151	2000
Nitratos	mg.L <sup>-1</sup> NO <sub>3</sub>	10-15	13,04	50
Polifenóis	mg.L <sup>-1</sup> ácido tânico	600-900	857	
<b>FONTE</b>		<b>ANIEC, 1999<sup>(a)</sup></b>	<b>CTCOR<sup>(b)</sup></b>	<b>DL n.º.236/98</b>

<sup>(a)</sup> ANIEC – Associação Nacional dos Industriais e Exportadores da Cortiça.

<sup>(b)</sup> CTCOR – Centro Tecnológico da Cortiça.

### 1.2.1.1. Tratamento das águas de cozedura de cortiça

O tratamento das águas residuais tem como principal objectivo minimizar o seu impacto ambiental permitindo a redução da carga poluente e/ou a bio-transformação em produtos de valor (Davies, 2003).

As águas de cozedura de cortiça são frequentemente eliminadas directamente para o meio receptor sem qualquer tratamento. É também comum a sua evaporação em tanques, sendo que este procedimento causa maus odores provocados pela actividade de microrganismos anaeróbios, proliferação de insectos e possibilidade de poluição das águas superficiais e subterrâneas (Peres *et al.*, 2004).

O tratamento deste tipo de efluentes utiliza processos como a incineração, a oxidação química, a degradação biológica, a adsorção em carvão activado, a permuta iónica ou a separação por membranas (Tabela 2). De todos os processos utilizados, os tratamentos biológicos aeróbios e/ou anaeróbios têm sido reconhecidos como os mais viáveis na depuração destes efluentes e também os mais utilizados, nomeadamente o processo de lamas activadas (Peres *et al.*, 2004). No entanto, os tratamentos biológicos apresentam algumas limitações uma vez que, devido à sua toxicidade, as águas de cozedura de cortiça podem inibir os microrganismos particularmente sensíveis à presença de alguns compostos orgânicos (polifenóis) (Peres *et al.*, 2004).

**Tabela 2.** Condições de operação dos processos de remoção de polifenóis (Simão & Marcelino, 2001)

Processo	Concentração polifenóis entrada (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração polifenóis saída (mg.L <sup>-1</sup> )
Incineração	> 60000	~0
Oxidação com peróxido de hidrogénio	100-5000	0,001-10
Oxidação com ozono	100-500	0,001-0,1
Oxidação biológica em lamas activadas	50-300	~0
Extracção líquido-líquido	100-10000	1-100
Adsorção em carvão activado	500-1000	1-10
Permuta iónica	5000-15000	3-50
Membranas líquidas emulsionadas	50-5000	<0,5

### ***1.2.1.2. Composição fenólica das águas de cozedura de cortiça***

As águas de cozedura de cortiça são complexas misturas de extractos vegetais que se apresentam com o aspecto de um licor escuro (castanho). Entre outros compostos naturais, estas águas apresentam concentrações elevadas de polifenóis como sejam ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol, pentaclorofenol, ácido benzóico e ácidos cinâmicos (Benitez *et al.*, 2003). Segundo Minhalma e Pinho (2001), os ácidos fenólicos mais abundantes na água de cozedura de cortiça são os ácidos gálico, protocatéquico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico.

## **1.3. Polifenóis**

O termo “polifenóis” foi introduzido há alguns anos para substituir o termo “taninos vegetais” e incluía os compostos fenólicos solúveis em água com peso molecular entre 500 e 3000 D, que apresentam propriedades especiais como a capacidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas (Zhu *et al.*, 1992). No entanto, o subsequente uso do termo fez englobar compostos com peso molecular mais baixo. Assim, o termo polifenóis usa-se actualmente para designar compostos que vão desde simples ácidos fenólicos a taninos condensados altamente polimerizados (King, 1999). Esta variedade estrutural dificulta a sua caracterização, quantificação e estudo (Acamovic & Stewart, 1999), com a agravante de os polifenóis de diferentes plantas serem quimicamente distintos e apresentarem diferentes graus de polimerização (Smith *et al.*, 2003).

### **1.3.1. Distribuição**

Os polifenóis encontram-se intensamente difundidos no reino vegetal. São comuns em Gimnospérmicas e em Angiospérmicas, sendo que nestas últimas são mais frequentes nas Dicotiledóneas do que nas Monocotiledóneas. Estes compostos encontram-se distribuídos por toda a planta: nos tecidos germinativos (provavelmente como protecção contra o frio), nas folhas (mais frequentes nas páginas superiores), nas raízes (actuando como barreira química à penetração e colonização das raízes por organismos patogénicos), nas sementes (associados à manutenção da dormência, apresentam propriedades alelopáticas e bactericidas) e no caule e casca (implicados na

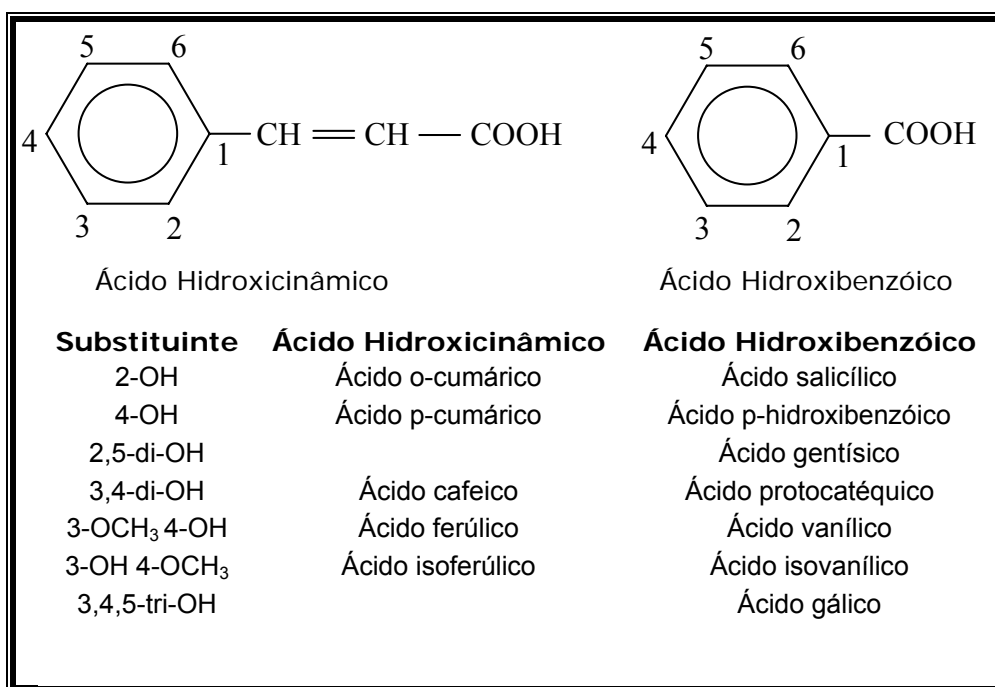
regulação do crescimento dos tecidos e na inibição da actividade microbiana) (Cunha-Santino *et al.*, 2002). Em virtude de estarem normalmente retidos em vacúolos ou na superfície cerosa das plantas, não interferem com o metabolismo das plantas. Quando se dá a ruptura das células, os polifenóis ficam livres e inactivam enzimas, precipitam proteínas e formam ligações com os ácidos nucleicos da célula (Turley *et al.*, 1990; Reed, 1995; Galvez *et al.*, 1997; Acamovic & Stewart, 1999; Nishitani & Osawa, 2003).

### 1.3.2. Estrutura Química

Os polifenóis presentes nas plantas podem ser classificados como ácidos fenólicos ou como flavonóides. Em seguida resumem-se as principais propriedades de cada um destes grupos.

#### 1.3.2.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos apresentam-se divididos em dois grupos que derivam do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico (Naczki & Shahidi, 2004; Stervobá *et al.*, 2004). Na Figura 2 apresentam-se as formas estruturais mais importantes dos derivados destes subgrupos.



**Figura 2.** Fórmulas estruturais dos derivados de ácidos fenólicos.

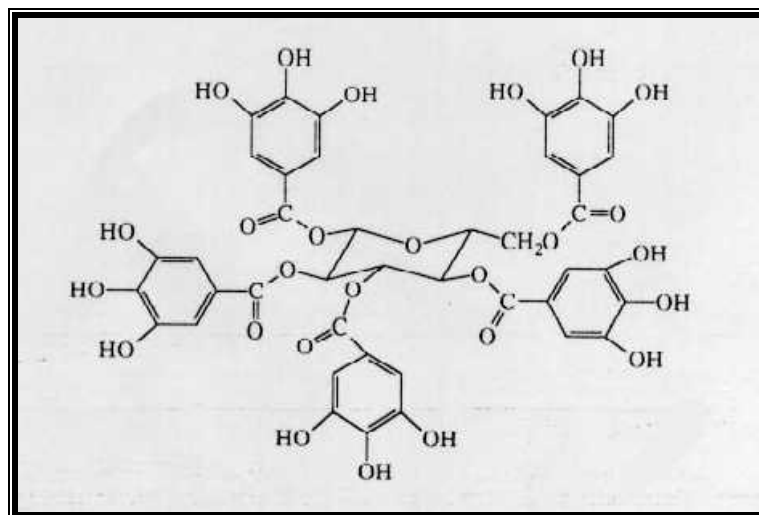
Os ácidos fenólicos praticamente não se encontram na forma livre em plantas. O grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ) destes compostos é muito reactivo e transforma-os em ésteres por reacção com álcoois alifáticos ou fenóis e em amidas quando os combina com compostos amínicos. Os grupos hidroxilo dos ácidos fenólicos ( $-\text{OH}$ ) também são muito reactivos com compostos fenólicos como o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico) e o ácido elágico (2,3,7,8-tetrahidroxi-1-benzopirano-5,4,3-cde-1-benzopirano-5,10-diona) formando ésteres, vulgarmente denominados como taninos hidrolisáveis ou por galotaninos ou elagitaninos respectivamente (Mokoboki *et al.*, 2002). O ácido tânico é um exemplo de um galotanino.

Os compostos mais importantes que derivam do ácido hidroxicinâmico são o ácido ferúlico, o ácido cafeico e o ácido cumárico, que surgem em quantidades reduzidas nas plantas. Pelo contrário, os ésteres do ácido hidroxibenzóico apresentam uma ampla distribuição nas plantas.

#### 1.3.2.1.1. Ácido Tânico

O ácido tânico (nome comercial do galotanino chinês) é uma mistura de galotaninos compostos por ésteres de ácido gálico e glicose. O ácido tânico é intensamente utilizado na indústria farmacêutica como adstringente e na indústria das bebidas como clarificador do vinho e da cerveja. Ao nível da indústria química é aplicado no curtimento do couro e na composição de tintas, sendo ainda utilizado como reagente em ensaios laboratoriais de química analítica e para o fabrico de testes de gravidez (Turley *et al.*, 1990).

A composição do ácido tânico pode variar, dependendo da sua constituição em galotaninos, mas empiricamente apresenta a seguinte fórmula química  $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$  e a sua estrutura encontra-se representada na Figura 3. Este composto pode apresentar diversas designações, tanino, ácido galotânico, ácido digálico, glicerite ou galotanino.



**Figura 3.** Estrutura química do ácido tânico (Isenburg *et al.*, 2003).

O ácido tânico encontra-se na casca e nos frutos de muitas plantas, principalmente na casca de carvalhos. Normalmente apresenta-se como um pó castanho ou amarelo, amorfo, com um odor característico e um sabor adstringente, que gradualmente escurece quando exposto ao ar e à luz. Forma precipitados com albumina, celulose, gelatina e com grande parte dos alcalóides e dos sais metálicos. É muito solúvel em água, assim como em álcool e acetona e praticamente insolúvel em benzeno, clorofórmio e éter. Na Tabela 3 apresentam-se algumas propriedades físico-químicas do ácido tânico.

Tendo em consideração a diversidade e complexidade de ácidos fenólicos e de taninos hidrolisáveis presentes na água de cozedura de cortiça, havia necessidade de, para este estudo, seleccionar um composto modelo não só para a realização de enriquecimentos, mas sobretudo para facilitar a monitorização da degradação. Pela sua vastíssima distribuição optou-se por utilizar ácido tânico.

**Tabela 3.** Propriedades físicas e químicas do ácido tânico (Szafranski, 1996).

<b>Peso Molecular</b>	1701,28 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilidade em água (20 °C)</b>	2857 g.L <sup>-1</sup>
<b>Ponto de fusão</b>	210 °C
<b>Temperatura de auto-ignição</b>	526 °C
<b>Percentagem de voláteis (v/v) a 21 °C</b>	0 %

### 1.3.2.2. Flavonóides

Para além de ácidos fenólicos, encontram-se outros polifenóis nas plantas, os flavonóides. Os flavonóides derivam do flavano (2-fenol-benzo-di-hidropirano), cuja estrutura é apresentada na Figura 4 e dividem-se em cinco subgrupos de acordo com os seus substituintes (Reed, 1995; Cowan, 1999):

1. Antocianidinas
2. Flavonas e Flavonolas
3. Flavanonas
4. Catequinas e Leucoantocianidinas
5. Proantocianidinas ou Taninos Condensados.

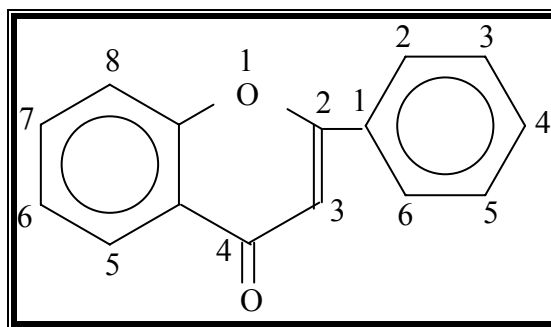


Figura 4. Fórmula estrutural do flavano.

### 1.3.3. Interações dos polifenóis com outras macromoléculas

Os polifenóis, nomeadamente os taninos, têm a capacidade de formar complexos com inúmeros tipos de moléculas, incluindo hidratos de carbono, proteínas e estruturas celulares como membranas citoplasmáticas bacterianas (Turley *et al.*, 1990; Hagerman *et al.*, 1992; Galvez *et al.*, 1997; Makkar *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999; Mokoboki *et al.*, 2002). No caso dos hidratos de carbono sabe-se que o amido e a celulose são complexados por polifenóis, nomeadamente proantocianidinas. As interações dos polifenóis com os hidratos de carbono aumentam se estes últimos apresentarem elevado peso molecular, baixa solubilidade e flexibilidade conformacional. As interações polifenol-proteína são específicas e dependem da estrutura de ambos os compostos. As características das proteínas que mais favorecem ligações fortes com polifenóis são elevado peso molecular, estrutura flexível e aberta e abundância do aminoácido prolina.

No caso dos polifenóis as características essenciais são também o elevado peso molecular e grande flexibilidade conformacional (Spencer *et al.*, 1988).

#### 1.3.4. Toxicidade e efeitos anti-nutricionais

Os polifenóis são conhecidos inibidores do crescimento de microrganismos nas plantas, pelo que é compreensível que estes compostos resistam à biodegradação, prejudicando o tratamento de águas residuais. Além disso, estes compostos oxidam rapidamente na água, reduzindo substancialmente o teor de oxigénio dissolvido disponível para o normal desenvolvimento da fauna e da flora. Uma concentração de 15 mg.L<sup>-1</sup> em taninos pode causar a morte de peixes (Flouri *et al.*, 1996).

A toxicidade destes compostos na nutrição animal está associada à sua capacidade de formar complexos com proteínas. Sendo que a toxicidade de um polifenol é tanto maior quanto maior for o seu tamanho e menor for a sua solubilidade, uma vez que estas características favorecem a formação de complexos polifenol-proteína. Estes compostos afectam negativamente a ingestão e digestibilidade dos alimentos. Os efeitos dependem do tipo de polifenóis ingeridos e da tolerância do animal, o que varia consoante o tipo de sistema digestivo, o tipo de alimentação, o tamanho do animal e os seus mecanismos de desintoxicação. Os polifenóis actuam sobretudo ao nível da cavidade oral (a mastigação quebra as células das plantas e expõe os polifenóis às proteínas e aos hidratos de carbono) e do tracto gastrointestinal (os polifenóis livres complexam as proteínas dos alimentos e as enzimas) (Mokoboki *et al.*, 2002). Após a sua ingestão, os sintomas podem aparecer, de algumas horas a vários dias depois, dependendo das quantidades e do tipo de polifenóis que as plantas possuem. As lesões predominantes são de gastroenterite e de glomerunefrite. Há formação de edemas e hemólise sanguínea, com proteinémia, clorémia e calcémia e níveis aumentados de nitrogénio, creatinina, potássio e fósforo. Em alguns casos a ingestão de quantidades elevadas de taninos hidrolisáveis pode provocar envenenamento e, em casos extremos, a morte do animal (Zhu *et al.*, 1992, Norton, 1999).

#### **1.3.4.1. Toxicidade para os microrganismos**

A toxicidade dos polifenóis para os microrganismos pode estar associada a diversos mecanismos como sejam a inibição de enzimas, a privação de substrato, a perda de iões metálicos. Em alguns casos pode ainda induzir alterações na morfologia celular (Acamovic & Stewart, 1999).

A toxicidade dos polifenóis tem sido descrita para diversas espécies bacterianas como por exemplo *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilis*, *Cellvibrio subtilis*, *Clostridium cellulosolvens*, *Sporocytophaga myxococcoides*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Nelson *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 2001, O'Donovan & Brooker, 2001). Contra estes factores de *stress*, os microrganismos desenvolvem vários mecanismos de defesa que envolvem a secreção de polímeros de ligação, a síntese de enzimas resistentes aos polifenóis e mesmo a sua biodegradação.

#### **1.3.5. Efeitos favoráveis dos polifenóis**

Os compostos polifenólicos desempenham um papel muito importante em diversos mecanismos relacionados com a defesa das plantas. O seu espectro de acção estende-se a bactérias e fungos, inibindo o seu crescimento, a animais herbívoros, diminuindo a digestibilidade das forragens e ainda protege as plantas de radiações ultravioleta (Takechi *et al.*, 1985; Norton, 1999; Mämmelä *et al.*, 2000; Nozella, 2001).

Outro importante papel desempenhado pelos polifenóis nas plantas, relaciona-se com os processos de comunicação biológica. Por exemplo, compostos como os flavonóides, presentes nas pétalas de flores, são responsáveis pela atracção dos insectos no processo de polinização das Angiospérmicas.

Baseado em estudos com animais há ainda evidência de que os polifenóis, nomeadamente os taninos, podem apresentar propriedades pró-carcinogénicas ou anti-carcinogénicas, assim como mutagénicas ou anti-mutagénicas (Chung *et al.*, 1998; King, 1999). O ácido tânico tem sido descrito como supressor da formação e crescimento de vários cancros, nomeadamente da pele, dos pulmões, do fígado, do esófago e do estômago (Marienfeld *et al.*, 2003). Outros benefícios destes compostos

incluem propriedades anti-inflamatórias, anti-víricas ou ainda prevenção de doenças cardiovasculares (King, 1999; Marienfel *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2002).

#### 1.4. Estudos de biodegradação de polifenóis

Apesar das suas propriedades antimicrobianas, muitas bactérias, fungos filamentosos e leveduras são resistentes aos polifenóis e conseguem crescer e desenvolver-se na sua presença (Deschamps, 1989; Bhat *et al.*, 1998; Scalbert, 1991).

##### 1.4.1. Degradação bacteriana de polifenóis

De acordo com a literatura, há uma grande variedade de bactérias capazes de degradar compostos polifenólicos. De seguida apresentam-se alguns exemplos destas bactérias.

A degradação de flavonóides por bactérias do intestino humano, do rúmen bovino e de raízes de plantas tem sido relatada. A catequina é degradada por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, *Leucaena leucophala*, *Rhizobium japonicum* e *R. trifoli* enquanto as estirpes *Butyrivibrio* sp. C3 e *Pediococcus* sp. Q-05 e membros da espécie *Eubacterium oxidoreducens* degradam quercetina (Hooper & Mahadevan, 1997).

Algumas estirpes bacterianas de *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Cellulomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium* sp. e *Streptococcus caprinus* têm sido referenciadas como degradadores de taninos hidrolisáveis e condensados (Deschamps *et al.*, 1980; Kumar *et al.*, 1999;).

Di Gioia *et al.* (2001) isolaram as estirpes bacterianas *Ralstonia* sp. LD 35 e *Pseudomonas putida* DSM 1868 que degradavam uma mistura de nove compostos aromáticos monocíclicos que incluem os ácidos vanílico, cafeico, siríngico, entre outros.

Estirpes de *Clostridium scindens*, *Clostridium orbiscindens*, *Eubacterium desmolans* e *Eubacterium ramulus*, isolados de fezes humanas, são descritas como capazes de converter flavonóides. Uma estirpe de *Clostridium orbiscindens* pode converter quercetina e taxifolina em ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, luteolina e eriodictiol em ácido 3-(3,4-di-hidroxifenilpropiónico) e apigenina, naringenina e

floretina em ácido 3-(4-hidroxifenilpropiónico), respectivamente. No entanto, apenas uma estirpe de *E. ramulus* foi posteriormente caracterizada como potencial degradador de flavonóides (Schoefer *et al.*, 2003).

Civolani *et al.* (2000) referem ainda que a estirpe *Pseudomonas fluorescens* BF13 utiliza ácido ferúlico e ácidos *m*- e *p*-cumárico como única fonte de carbono. A metabolização de ácido gálico por estirpes de *Leuconostoc oenos* e *Lactobacillus hilgardii* é reportada por Mendonça *et al.* (2004).

Relativamente aos ácidos fenólicos, Peng *et al.* (2002) isolaram trinta e quatro estirpes termofílicas do género *Bacillus* de casca de árvores em decomposição e de uma nascente termal que apresentavam capacidade para degradar ácido vanílico a 60 °C. Para além de ácido vanílico, estas estirpes eram ainda capazes de degradar uma grande variedade de ácidos fenólicos, nomeadamente os ácidos cinâmico, 4-cumárico, 3-fenilpropiónico, 3-(*p*-hidroxifenil) propiónico, ferúlico, benzóico e 4-hidroxibenzóico. Este estudo teve a particularidade de ser um dos pioneiros na caracterização de organismos termofílicos com capacidade para degradar ácidos fenólicos.

A degradação de ácido tânico (tanino hidrolisável utilizado como modelo neste estudo) por estirpes bacterianas tem sido também referenciada. Deschamps *et al.* (1980) isolaram quinze estirpes bacterianas pertencentes aos géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Klebsiella* que utilizavam ácido tânico como única fonte de carbono.

#### **1.4.2. Degradação de polifenóis por fungos filamentosos e leveduras**

Os fungos dos géneros *Penicillium* e *Aspergillus* são de grande utilidade para degradar efluentes contendo polifenóis, em particular taninos. Estirpes pertencentes a outros géneros, nomeadamente *Chaetomium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon* e *Trichoderma* têm também sido referenciadas como degradadoras de polifenóis. Mendonça *et al.* (2004) testaram a capacidade de uma estirpe de *Fusarium flocciferum* para degradar ácidos fenólicos, nomeadamente os ácidos gálico, protocatéquico, vanílico, siríngico, cafeico e ferúlico e o aldeído siríngico, normalmente encontrados nos resíduos agro-alimentares. Esta estirpe utilizava os sete compostos como fonte de carbono, isolados ou em mistura.

Relativamente à biodegradação de taninos, Lewis & Starkey (1969) referiram que culturas puras de fungos isoladas do solo cresciam em meio contendo taninos como

fonte única de carbono. Sendo que as estirpes dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fomes*, *Polyporus* e *Trametes* crescem melhor em ácido tânico (galotanino) do que em castanho (elagitanino) ou mimosa (tanino condensado) (Bhat *et al.*, 1998).

Em sistemas de tratamento de polifenóis com fungos descobriu-se que os taninos são degradados mais rapidamente na presença de outras substâncias metabolizáveis. Ganga *et al.* (1977) relataram que estirpes de *Aspergillus niger* e de *Penicillium* spp. apresentavam elevado crescimento num meio com glicose e tanino da madeira de macieira. No entanto, noutros estudos com outros organismos verificou-se que a degradação de ácido gálico e ácido tânico é retardada na presença de uma fonte de carbono adicional (Bhat *et al.*, 1998). Deste modo, será de concluir que dependendo dos organismos, o co-metabolismo pode ou não ser vantajoso.

Quanto ao ácido tânico existem referências de que pode ser degradado por estirpes de *Aspergillus niger*, de *Aspergillus awamori*, de *Penicillium glabrum* e de *Rhizopus oryzae* (Bhat *et al.*, 1997; Kar *et al.*, 1999; Lagemaat & Pyle, 2000; Seth & Chand, 2000).

São escassos os estudos de degradação de polifenóis por leveduras. Aoki *et al.* (1976 a, b) relataram que uma estirpe do género *Candida* possuía um sistema enzimático de degradação de taninos, ou seja, utilizava taninos como substrato. Mais tarde, foi relatado que estirpes de *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis* e *Torulopsis candida* conseguiam degradar taninos condensados (Otuk & Deschamps, 1983; Vennat *et al.*, 1986). Recentemente Álvarez-Rodriguez *et al.* (2003) isolaram cinco leveduras de amostras de cortiça capazes de degradar ácido vanílico.

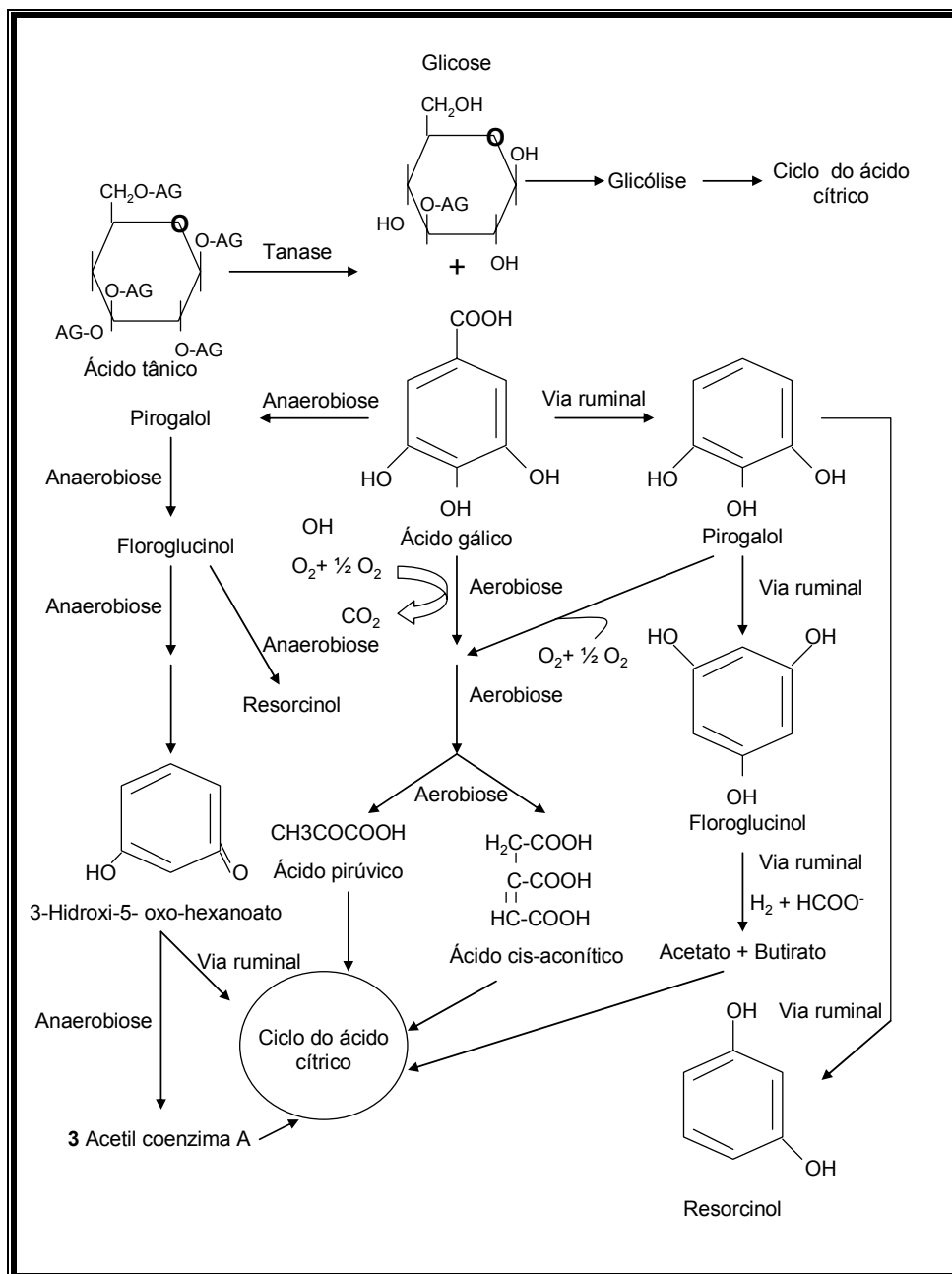
## 1.5. Mecanismos de degradação de polifenóis

Alguns mecanismos de degradação de taninos hidrolisáveis e condensados têm sido elucidados e descritos. O ácido tânico é hidrolisado a ácido gálico e glicose pela actividade enzimática de tanases ou por hidrólise ácida, em condições aeróbias ou anaeróbias. A degradação aeróbia de taninos hidrolisáveis por fungos bem como os mecanismos de degradação de ácido gálico (monómero dos taninos hidrolisados) têm sido estudados. No caso da espécie *Aspergillus niger*, o ácido gálico sofre uma clivagem oxidativa através de uma oxigenase para formar um intermediário, um ácido tricarbóxico, muito instável. Este composto é então descarboxilado por uma

descarboxilase oxidativa para formar o ácido cis-aconítico, que entra no ciclo do ácido cítrico. No caso da espécie *Aspergillus flavus*, esta degrada o ácido gálico a ácido oxaloacético e finalmente a ácido pirúvico através de ácidos tricarbóxicos intermediários (Bhat *et al.*, 1998).

A degradação anaeróbia do ácido gálico, o monómero dos taninos hidrolisados, ocorre por vários mecanismos (Figura 5). O primeiro passo consiste na descarboxilação do ácido gálico para formar pirogalol, que em seguida passa a floroglucinol através da enzima pirogalol-floroglucinol isomerase e depois a di-hidrofloroglucinol pela enzima floroglucinol reductase. O di-hidrofloroglucinol é convertido a 3-hidroxi-5-oxo-hexanoato (HOHN) pela enzima di-hidrofloroglucinol hidrolase. O HOHN apresenta vários mecanismos de degradação, em sistemas anaeróbios ou ruminais. Em sistemas anaeróbios é convertido a 3,5-di-oxohexanoato pela enzima HOHN de-hidrogenase e finalmente a três moléculas de acetil co-enzima através da seguinte sequência enzimática: triacetil- CoA transferase, tri-acetato  $\beta$ -cetotiolase, acetoacetil-CoA  $\beta$ -cetotiolase, fosfotransacetilase e acetatocinase. Estudos de degradação ruminal de taninos e seus monómeros indicam que bactérias do rumem conseguem degradar ácido gálico, pirogalol, floroglucinol e quercetina a acetato e butirato. No sistema ruminal, a degradação de HOHN segue um mecanismo diferente. HOHN-CoA que deriva da acção enzimática da HOHN-CoA transferase é transformada em acetato e butirato pela acção da seguinte sequência enzimática:  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA de-hidrogenase, butiril-CoA de-hidrogenase, acetil-CoA acetil transferase, enoil-CoA hidrase, fosfato acetiltransferase e acetatocinase (Haddock & Ferry, 1989, Brune & Schink, 1990; Bhat *et al.*, 1998; Zheida *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999; Schink *et al.*, 2000).

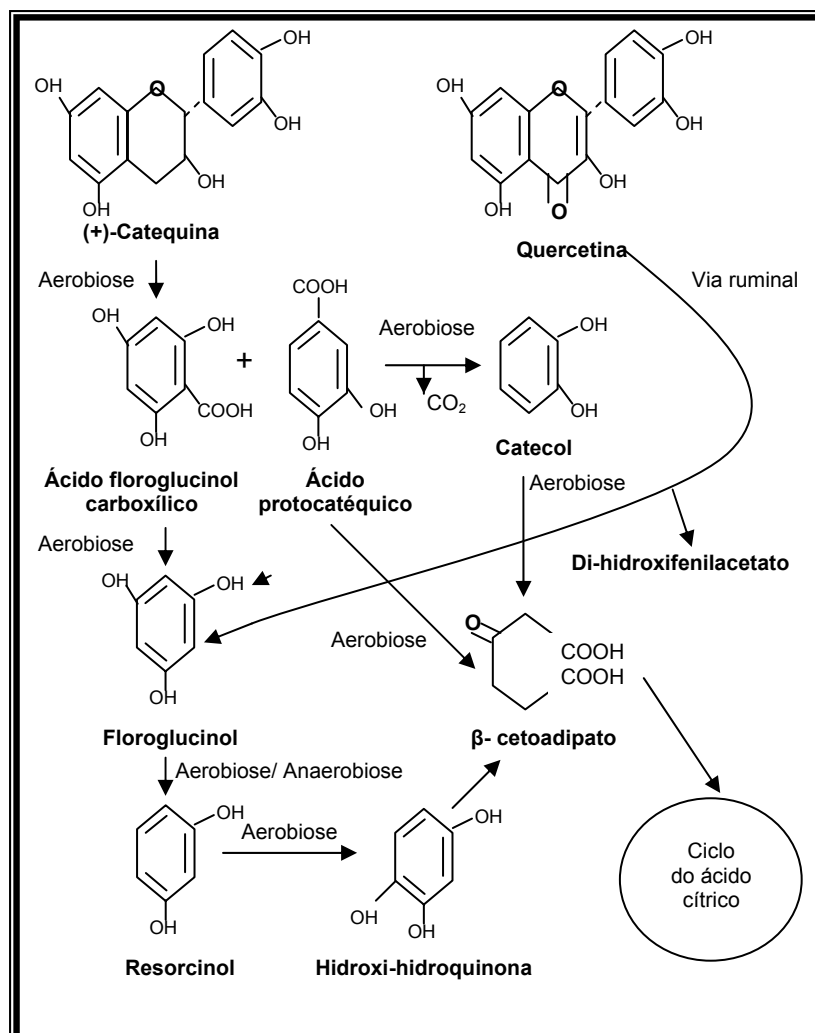
Para além do ácido gálico e do pirogalol, outros metabolitos são produzidos aquando da biodegradação de ácido tânico, nomeadamente o ácido 4-O-metilgálico, o resorcinol e o ácido elágico.



**Figura 5.** Mecanismo de degradação do ácido tânico (AG-ácido gálico) (adaptado de Bhat *et al.*, 1998; Zheida *et al.*, 1998 e Kumar *et al.*, 1999).

Para a degradação de compostos flavonoídes, derivados dos taninos condensados, foram descritos dois mecanismos (Figura 6). O primeiro ocorre pela clivagem do anel heterocíclico da catequina, que passa a ácido floroglucinol carboxílico e a ácido protocatéquico. No segundo mecanismo, a quercetina é cortada dando origem a floroglucinol e a 3,4-di-hidroxifenilacetato. Em ambos os mecanismos obtém-se β-cetoadipato como composto final, que será utilizado no ciclo do ácido cítrico (Bhat *et*

*al.*, 1998). Na Figura 6 encontra-se o mecanismo genérico de degradação biológica de dois flavonóides (catequina e quercetina).



**Figura 6.** Mecanismos de degradação de taninos flavonóides (catequina e quercetina) (adaptado de Bhat *et al.*, 1998).

## 1.6. Objectivos do estudo

O presente trabalho estudou a possibilidade de desenvolver uma metodologia de tratamento de água de cozedura de cortiça em duas fases:

- Tratamento termofílico: promovendo a biodegradação dos polifenóis durante o processo de arrefecimento da água de cozedura de cortiça, que demora alguns dias;

- Tratamento mesofílico: em que a biodegradação é promovida após a fase de arrefecimento da água de cozedura de cortiça.

Assim teve como principais etapas:

- Enriquecimento de culturas meso e termofílicas a partir de águas de cozedura de cortiça, a 25 °C e 50 °C respectivamente;
- Isolamento, caracterização e identificação das estirpes termofílicas e mesofílicas capazes de degradar polifenóis;
- Avaliação da cinética de degradação de polifenóis pelas culturas termofílicas e mesofílicas utilizando o ácido tânico como composto modelo;
- Estudo da biodegradação de polifenóis da água de cozedura da cortiça utilizando um reactor *batch*;
- Avaliação da versatilidade nutricional de cada cultura de enriquecimento e de cada isolado meso e termofílico para diferentes compostos fenólicos.

## CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Recolha e conservação da amostra

A recolha da amostra de água de cozedura de cortiça foi realizada numa empresa produtora de rolhas do concelho de Santa Maria da Feira, distrito de Aveiro. A água de cozedura de cortiça recolhida estava exausta, ou seja, já tinha sofrido 20 a 30 cozeduras e foi retirada da caldeira antes de ser encaminhada para os colectores municipais.

Após a recolha da amostra, efectuou-se o seu transporte para a Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, onde se realizou a sua caracterização físico-química, bem como a enumeração dos microrganismos heterotróficos totais a 25 °C e a 50 °C. A restante amostra foi conservada numa câmara frigorífica (Sanyo Medical Freezer) a -30 °C para posterior utilização nos ensaios de biodegradação.

### 2.2. Caracterização físico-química da água de cozedura de cortiça

As águas de cozedura de cortiça foram analisadas para um conjunto de parâmetros físico-químicos, designadamente Carência Bioquímica de Oxigénio, Carência Química de Oxigénio, Carbono Orgânico Total e pH, de acordo com os métodos a seguir apresentados.

A Carência Bioquímica de Oxigénio foi determinada pelo método das diluições de acordo com o procedimento descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998). Inicialmente preparou-se a água de diluição que consistiu em adicionar por cada litro de água destilada utilizada 1 mL de solução de cloreto de ferro (III) ( $0,25 \text{ g.L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 1 mL de solução de cloreto de cálcio ( $36,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 1 mL de solução de sulfato de magnésio ( $22,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e 1 mL de solução de tampão fosfato pH 7,2 ( $8,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $28,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $17,7 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  e  $2,1 \text{ g.L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Em seguida diluiu-se 100 e 200 vezes a amostra de água de cozedura de cortiça com água de diluição. Transferiram-se cada uma das diferentes diluições, em duplicado, para frascos de Winkler de 250 mL. Os frascos foram completamente cheios de modo que, quando rolhados, o ar fosse todo deslocado e não ficassem bolhas de ar dentro dos frascos. Para

além da amostra diluída também se prepararam 3 ensaios em branco (controles), ou seja, 3 frascos de Winkler apenas com água de diluição. O oxigénio dissolvido foi medido inicialmente e após os 5 dias de incubação a 20°C com uma sonda de oxigénio *Orion O<sub>2</sub> electrode Model 97-08-00*. A Carência Bioquímica de Oxigénio foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$CBO_5 = \left[ (C_1 - C_2) - \frac{V_t - V_e}{V_t} \times (C_3 - C_4) \right] \times \frac{V_t}{V_e} \quad (1)$$

Onde:

C<sub>1</sub>- Oxigénio dissolvido (mg O<sub>2</sub>/L) da amostra diluída no início;

C<sub>2</sub>- Oxigénio dissolvido (mg O<sub>2</sub>/L) da amostra diluída ao fim de 5 dias de incubação;

C<sub>3</sub>- Oxigénio dissolvido (mg O<sub>2</sub>/L) do branco (água de diluição) no início;

C<sub>4</sub>- Oxigénio dissolvido (mg O<sub>2</sub>/L) do branco (água de diluição) ao fim de 5 dias de incubação;

V<sub>e</sub>- volume (mL) de amostra usada na preparação da diluição;

V<sub>t</sub>- volume total (mL) da diluição.

A Carência Química de Oxigénio foi determinada pelo método de refluxo aberto de acordo com o procedimento descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998). Vinte mililitros da amostra dez vezes diluída foi colocada num frasco ao qual foram adicionados 0,4 g de sulfato de mercúrio (HgSO<sub>4</sub>), esferas de vidro e muito lentamente 5 mL de reagente de digestão (5,5 g Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/kg H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após arrefecimento desta solução, adicionou-se 10 mL de dicromato de potássio 0,0417 M. Colocou-se o condensador no frasco e adicionou-se o restante reagente de digestão (25 mL) através da extremidade do condensador. A amostra e os brancos (em que o volume de amostra é substituído por igual volume de água destilada) foram efectuados em duplicado e colocados num digestor *G. Vittadini Model Recod/6 Test* durante duas horas à temperatura de 150 °C. Após este período de tempo, foram retirados dos digestor, arrefecidos e adicionou-se água destilada por forma a que no final se obtivesse aproximadamente duas vezes o volume inicial. Às amostras e aos brancos foram adicionadas umas gotas de indicador (ferroína) e o excesso de dicromato de potássio foi então titulado com uma solução de sulfato de ferro e amónio 0,25M (Fe

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>).6H<sub>2</sub>O). O ponto de titulação era obtido quando a cor passava de azul esverdeado a castanho avermelhado. A Carência Química de Oxigénio foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$CQO = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{C} \quad (2)$$

Onde:

A- Volume (mL) de solução de sulfato de ferro e amónio utilizado para titular o controlo;

B- Volume (mL) de solução de sulfato de ferro e amónio utilizado para titular as amostras;

C- Volume de amostra utilizado;

M- Molaridade da solução de sulfato de ferro e amónio.

#### **Composição e preparação da ferroína**

Ferroína: dissolveu-se 1,485 g de 1,10-fenantrolina mono-hidratada e 695 mg de sulfato de ferro hepta-hidratado em água destilada até prefazer 100 mL.

O Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado por combustão catalítica a alta temperatura utilizando o equipamento *TOC-5000A Shimadzu*. A concentração de COT foi determinada por diferença entre a concentração de carbono total e a concentração de carbono inorgânico na amostra. Para calibração do aparelho utilizaram-se soluções de diftalato de potássio, com concentrações de carbono orgânico próximas das concentrações a medir.

Para leitura do pH utilizou-se um potenciómetro equipado com um eléctrodo de pH ligado a um medidor digital da marca *ORION pH meter modelo 420A*.

Para além dos parâmetros acima referidos, também se analisou o teor em polifenóis das águas de cozedura de cortiça, cujo procedimento se encontra na secção 2.15.

### 2.3. Meios de cultura

Os microrganismos foram cultivados nos meios PCA ( Plate Count Agar) e LA (Luria Bertani agarizado). Para preparar estes dois meios, cuja composição se encontra nas Tabelas 4 e 5, adicionaram-se cada um dos componentes a 1 L de água destilada, autoclavou-se (a 121 °C durante 20 minutos) e arrefeceu-se a cerca de 50 °C. Em seguida o meio foi distribuído por placas de Petri estéreis, que foram armazenadas até sua utilização.

**Tabela 4.** Composição de 1 L de meio LA.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Triptona (Merck)	10 g
Extracto de levedura (Merck)	5 g
Cloreto de sódio (Merck)	10 g
Agar (Merck)	20 g

**Tabela 5.** Composição de 1 L de meio Plate Count Agar (Merck).

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona de caseína	5 g
Extracto de levedura	2,5 g
D (+) – Glucose	1 g
Agar-agar	14 g

Para cultivar os microrganismos em meio líquido utilizou-se um meio mineral composto por macronutrientes, micronutrientes, cloreto de cálcio, sulfato de amónia e extracto de levedura. Todas estas soluções foram esterilizadas por autoclavagem antes de serem adicionadas à água destilada também estéril.

A solução de macronutrientes foi preparada por dissolução de cloreto de sódio, cloreto de magnésio e cloreto de ferro (II) em água destilada de acordo com as quantidades que constam da Tabela 6.

**Tabela 6.** Composição de 1 L de solução de macronutrientes (Barreiros *et al.*, 2003).

Componente	Quantidade
NaCl	73,63 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	27,33 g
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,17 g

Para preparar a solução de micronutrientes dissolveram-se em água destilada vários sais e 1,3 mL de ácido clorídrico (25 %), cuja descrição se encontra na Tabela 7.

**Tabela 7.** Composição de 1 L de solução de micronutrientes (Barreiros *et al.*, 2003).

Componente	Quantidade
ZnCl <sub>2</sub>	0,070 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,100 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,062 g
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,190 g
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,017 g
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036 g

Para preparar as soluções de cloreto de cálcio, sulfato de amónia e extracto de levedura dissolveram-se respectivamente 2,94 g; 5,00 g e 1,00 g destes compostos em 100 mL de água destilada.

A partir das soluções previamente descritas preparou-se o meio mineral, sendo que para preparar 1 L de meio se adicionaram as quantidades referidas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Composição de 1 L de meio mineral.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Macronutrientes	6 mL
Micronutrientes	1 mL
Cloreto de cálcio 0,2 M	1 mL
Sulfato de amónia 50 g.L <sup>-1</sup>	10 mL
Extracto de levedura 10 g.L <sup>-1</sup>	5 mL
Água destilada	977 mL (pH 4,7) ou 957 mL (pH 7,2)

A fonte de carbono deste meio de cultura, ácido tânico, foi adicionada a partir de uma solução com uma concentração de 100 g.L<sup>-1</sup> previamente esterilizada por filtração (filtros com poro de 0,22 µm e 25 mm de diâmetro da marca *Pall Supor®-200*). Para o ajuste de pH a 4,7 utilizou-se uma solução de di-hidrogenofosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,2 M estéril, adicionando-se 4 mL desta solução a 1 L de meio, enquanto que para o ajuste a pH 7,2 utilizou-se uma solução de tampão fosfato 1,35 M a pH 7,2, sendo que a 1 L de meio se adicionou 20 mL dessa solução.

#### **2.4. Enumeração dos microrganismos heterotróficos totais a 25 °C e 50 °C**

Para enumeração dos microrganismos heterotróficos presentes na água de cozedura de cortiça foram realizadas diluições decimais ao factor 10<sup>-4</sup> em solução salina estéril [NaCl 0,85 %, (p/v)], seguidas de espalhamento ou incorporação em meio Plate Count Agar (PCA) e incubação a 25 e a 50 °C.

No caso de espalhamento, pipetaram-se 100 µL de cada uma das diluições para meio PCA. Com a ajuda de um espalhador flamejado, espalhou-se a amostra cuidadosamente sobre todo o agar e incubou-se a 25 e a 50 °C. Para a incorporação, de cada diluição pipetou-se 1 mL para uma caixa de Petri estéril. Em seguida verteu-se 15 a 20 mL de meio PCA fundido (± 45 °C) que se misturou cuidadosamente com a amostra (agitando com movimentos circulares nos dois sentidos) e deixou-se solidificar antes de incubar a 25 e a 50 °C. Todas as inoculações destinadas à enumeração foram realizadas em duplicado. Após um período de incubação de 48 horas procedeu-se à

contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) nas culturas que apresentavam um número entre 30 e 300 UFCs.

## 2.5. Culturas de enriquecimento

O enriquecimento iniciou-se com a transferência, em condições assépticas, de uma amostra de 10 mL de água de cozedura de cortiça para um matraz de 250 mL contendo 40 mL de meio mineral com uma concentração de ácido tânico de  $1\text{g.L}^{-1}$ . Prepararam-se 6 matrizes (quatro com meio a pH 4,7 e dois a pH 7,2).

Quatro das referidas culturas (duas a pH 4,7 e duas a pH 7,2) foram incubados a 25 °C numa incubadora (GallenKamp) e as restantes a 50 °C num banho termostatizado (*GRANT OLS 200*) em condições aeróbias, com agitação orbital de 120 rpm (rotações por minuto) durante 7 dias. Como controlo abiótico, utilizaram-se 40 mL de meio mineral com uma concentração de  $1\text{g.L}^{-1}$  de ácido tânico e 10 mL de água destilada estéril em matrizes de 250 mL, incubados nas mesmas condições. Durante dois meses, 5 mL de cada cultura [10 % (v/v) de inóculo] e respectivo controlo abiótico foram transferidos semanalmente para 45 mL de meio mineral com uma concentração de  $200\text{mg.L}^{-1}$  de ácido tânico nas mesmas condições.

## 2.6. Manutenção das culturas

As culturas de enriquecimento e as culturas puras foram criopreservadas a -80 °C numa câmara frigorífica (*Sanyo Ultra Low*) em meio mínimo suplementado com glicerol a 15 %, em tubos do tipo *Eppendorf*.

No caso das culturas de enriquecimento, sempre que necessário, transferiu-se uma suspensão criopreservada para um matraz de 100 mL, contendo 20 mL de meio mineral com  $200\text{mg.L}^{-1}$  de ácido tânico. A cultura era incubada conforme descrito anteriormente. Para garantir que o glicerol presente nas suspensões era totalmente consumido e que não iria servir como fonte de carbono e energia nos ensaios a realizar, estas culturas foram transferidas pelo menos três vezes, utilizando 10 % (v/v) de inóculo. As culturas puras eram cultivadas transferindo-se uma pequena porção da suspensão criopreservada para uma placa de meio LA.

## 2.7. Isolamento, purificação e identificação

No final do período de enriquecimento foram obtidas três culturas mistas, M 4,7 (cultura de enriquecimento obtida a 25 °C e pH 4,7), T 4,7 (cultura de enriquecimento obtida a 50 °C e pH 4,7) e M 7,2 (cultura de enriquecimento obtida a 25 °C e pH 7,2). A composição das culturas de enriquecimento foi determinada por cultivo, isolamento, purificação e identificação de cada bactéria cultivável. O isolamento e purificação das estirpes presentes nos enriquecimentos foram realizados através de espalhamentos em meio LA a 25 °C e a 50 °C, de acordo com as temperaturas de incubação das culturas de enriquecimento. Cada tipo de morfologia colonial foi seleccionado para purificar por repicagens sucessivas. Para identificar as bactérias obtidas no período de enriquecimento utilizaram-se testes bioquímicos de caracterização fenotípica e sequenciação do gene para o rRNA 16S das estirpes bacterianas, bem como o estudo da versatilidade nutricional a compostos orgânicos e outras fontes de carbono. O estudo da versatilidade nutricional também foi realizado para as culturas de enriquecimento.

### 2.7.1. Caracterização fenotípica

#### 2.7.1.1. *Morfologia colonial e celular*

Por observação dos microrganismos isolados crescidos em meio LA, anotou-se a sua morfologia colonial, a cor e o contorno periférico. A morfologia celular foi descrita com base na observação de preparações das estirpes bacterianas por microscopia óptica.

#### 2.7.1.2. *Coloração de Gram*

A coloração de Gram foi realizada de acordo com o método de Hucker conforme descrito por Darveau & Hancock (1983).

Preparação e fixação do esfregaço: Após se ter colocado uma gota de água numa lâmina, retirou-se com auxílio de uma ansa, uma pequena porção da cultura a analisar que foi dispersada nessa mesma gota. Em seguida, as células foram fixadas ao calor levando a lâmina à chama várias vezes, de modo a secar sem aquecer demais.

**Coloração:** O esfregaço foi coberto com uma solução de cristal de violeta durante 30 a 60 segundos, de seguida foi lavado com água e coberto por uma solução de iodo de Gram por mais 30 a 60 segundos. Este corante foi retirado por uma solução de descoloração que ficou a actuar durante 30 a 60 segundos. Seguiu-se nova lavagem com água e coloração com solução de safranina por mais 30 a 60 segundos. A preparação foi então lavada, seca com papel absorvente e observada ao microscópio óptico com a objectiva de imersão. As estirpes bacterianas cujas células apresentaram cor violeta foram consideradas Gram positivas e como Gram negativas se apresentavam cor vermelha.

#### **Composição e preparação dos corantes**

Corante Cristal de Violeta: mistura de solução de cristal de violeta a 10 % (p/v) em etanol a 95 % (v/v) e oxalato de amónio a 1 % (p/v) na proporção de 1:4. Depois de repousar durante 24 horas, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman nº. 1).

Iodo de Gram: solução aquosa de iodo e iodeto de potássio a 3,3 g.L<sup>-1</sup> e 6,7 g.L<sup>-1</sup>.

Solução de descoloração: mistura de etanol e acetona na proporção de 80:20 (v/v).

Corante de contraste: solução de safranina O a 2,5 % (p/v) em etanol a 95 % (v/v), 10 vezes diluída.

#### **2.7.1.3. Coloração de endósporos**

Os endósporos podem ser corados diferencialmente com uma solução de verde de malaquite e safranina, apresentando uma cor verde, em contraste com a cor rosada da célula vegetativa conferida pela safranina. Este teste foi realizado de acordo com o método de Dorner conforme descrito por Easterbrook (1989).

**Coloração:** O esfregaço, preparado conforme descrito anteriormente, foi coberto com uma solução de verde malaquite [solução aquosa 0,5 % (p/v)] e aquecido durante 10 minutos, tendo o cuidado de não deixar ferver nem evaporar o corante. Após esse período, o esfregaço foi lavado com água e coberto por uma solução de safranina por mais 1 minuto. A preparação foi então lavada com água, seca com papel absorvente e observada ao microscópio óptico com a objectiva de imersão. Quando presentes, os endósporos observavam-se como estruturas refringentes de cor verde, dentro da célula corada de vermelho.

#### ***2.7.1.4. Presença da enzima citocromo c oxidase***

Este teste bioquímico é utilizado para detectar a presença da enzima citocromo c oxidase responsável pela transferência de electrões do citocromo c para o oxigénio.

Este teste segue o método descrito por Smibert & Krieg (1981), que consistiu em espalhar o material celular sobre uma tira de papel de filtro humedecida com uma solução aquosa de ácido tetra-metil-*p*-fenildiamina di-hidroclorídrico a 1 % (p/v), preparada na altura. Considerou-se um resultado positivo o desenvolvimento de uma coloração azul dentro de 10 segundos.

#### ***2.7.1.5. Presença da enzima catalase***

A presença da enzima catalase em bactérias pode ser testada utilizando peróxido de hidrogénio. A catalase converte o peróxido de hidrogénio em água com libertação simultânea de bolhas de oxigénio. Esta é a indicação visível para um resultado positivo para o teste da catalase. Para realizar este teste, que segue o método descrito por Smibert & Krieg (1981), retirou-se com uma ansa parte de uma colónia isolada para uma lâmina de vidro e ressuspendeu-se em peróxido de hidrogénio a 3 %.

#### ***2.7.1.6. Identificação dos isolados bacterianos***

Para identificação dos microrganismos isolados Gram negativos dos enriquecimentos a 25 e a 50 °C utilizaram-se as galerias de identificação API 20 E e API 20 NE (BioMérieux). O API 20 E é um sistema que permite a identificação de enterobactérias e de outros bacilos Gram negativos não fastidiosos utilizando 21 testes bioquímicos padronizados e uma base de dados. Os testes bioquímicos utilizados por este sistema para identificar as bactérias encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9.** Testes bioquímicos de identificação do API 20 E.

Testes	Substratos	Reacções/ Enzimas
ONPG	2-Nitrofenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidase
ADH	Arginina	Arginina hidrolase
LDC	Lisina	Lisina hidrolase
ODC	Ornitina	Ornitina hidrolase
CIT	Citrato de sódio	Utilização de citrato
H <sub>2</sub> S	Tiosulfato de sódio	Produção de H <sub>2</sub> S
URE	Ureia	Urease
TODA	Triptofano	Triptofano desaminase
IND	Triptofano	Produção de indol
VP	Creatina e piruvato de sódio	Produção de acetoína
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinase
GLU	Glicose	
MAN	Manitol	
INO	Inositol	
SOR	Sorbitol	
RHA	Ramnose	Fermentação/oxidação
SAC	Sacarose	
MEL	Melibiose	
AMY	Amigdalina	
ARA	Arabinose	
OX	Tetra-metil- <i>p</i> -fenildiamina	Citocromo oxidase

A galeria API 20 E comporta 20 microtubos que contêm substratos desidratados. Os microtubos foram inoculados com as suspensões bacterianas (culturas puras) preparadas de acordo com o fornecedor. As reacções produzidas traduziram-se pela mudança de cor espontânea ou revelada através da adição de reagentes. A galeria foi lida para cada teste anotando o resultado como positivo ou negativo.

O API 20 NE é também um sistema de identificação multitestes constituído por vinte testes. A galeria API 20 NE compõe-se de 20 microtubos que contêm meios e/ou substratos desidratados. Os testes bioquímicos utilizados por este sistema para identificar as bactérias encontram-se na Tabela 10.

**Tabela 10.** Testes bioquímicos de identificação do API 20 NE.

Testes	Substratos	Reacções/ Enzimas
NO <sub>3</sub>	Nitrato de potássio	Redução dos nitratos a nitritos e/ou redução dos nitratos a nitrogénio
TRP	Triptofano	Formação de indol
GLU	Glicose	Fermentação
ADH	Arginina	Arginina hidrolase
URE	Ureia	Urease
ESC	Esculina	Hidrólise ( $\beta$ -glucosidase)
GEL	Gelatina	Hidrólise (protease)
PNPG	<i>p</i> -Nitro-fenil- $\beta$ -galactopiranosida	<i>B</i> -galactosidase
GLU	Glicose	Assimilação
ARA	Arabinose	
MNE	Manose	
MAN	Manitol	
NAG	N-Acetil-glucosamina	
MAL	Maltose	
GNT	Gluconato	
CAP	Caprato	
ADI	Adipato	
MLT	Malato	
CIT	Citrato	
PAC	Fenil-acetato	
OX	Tetra-metil- <i>p</i> -fenildiamina	

Os primeiros oito microtubos foram inoculados com uma suspensão salina bacteriana (cultura pura) que reconstitui o meio. As reacções que se produzem durante a incubação traduzem-se em variações de cor espontâneas ou reveladas mediante a adição de reagentes cromogénicos. Os restantes doze microtubos (testes de assimilação) foram inoculados com um meio mínimo. Após incubação, a turvação do meio indica capacidade para utilizar o substrato. A leitura das galerias foi realizada como se descreveu anteriormente. Os resultados permitem obter um código, que foi pesquisado na base de dados para a respectiva galeria, obtendo-se a correspondente identificação.

### 2.7.2. Análise da sequência do gene para o RNA ribossomal 16S

A análise da sequência do gene do RNA ribossomal 16S das bactérias em estudo foi realizada conforme descrito por Nogales *et al.* (2001). A sequência parcial foi comparada com outras disponíveis nas bases de dados EMBL e Genebank. Esta análise

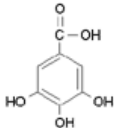
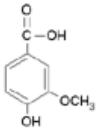
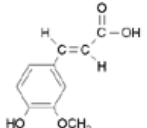
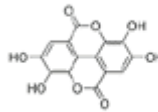
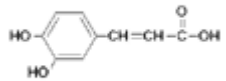
foi realizada em colaboração com a Doutora Balbina Nogales da Área de Microbiologia da Universidade das Ilhas Baleares, Palma de Maiorca, Espanha.

### **2.7.3. Versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 e respectivos isolados**

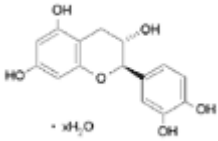
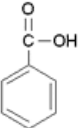
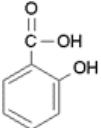
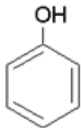
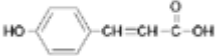
#### ***2.7.3.1. Testes de crescimento em fontes únicas de carbono***

Os testes de crescimento das culturas de enriquecimento e dos respectivos isolados em diferentes compostos fenólicos foram realizados em frascos universais contendo 4 mL de meio mineral suplementado com o substrato em estudo, como única fonte de carbono a uma concentração final de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Os compostos fenólicos testados, bem como algumas das suas propriedades físicas e químicas encontram-se descritas na Tabela 11. As culturas foram inoculadas com uma densidade óptica a 610 nm (D.O.<sub>610 nm</sub>) inicial de 0,08. Como controlos utilizaram-se os respectivos meios não inoculados e meio mínimo inoculado, sem fonte de carbono. As culturas foram observadas diariamente, tendo-se registado a D.O.<sub>610 nm</sub> no tempo inicial e ao fim de 7 dias.

**Tabela 11.** Propriedades químicas dos compostos fenólicos (Szafranski,1996.)

Composto	Ácido Gálico	Ácido Vanílico	Ácido Ferúlico	Ácido Elágico	Ácido Cafeico
<b>Fórmula química</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	170,01 g.mol <sup>-1</sup>	168,14 g.mol <sup>-1</sup>	194,18 g.mol <sup>-1</sup>	302,19 g.mol <sup>-1</sup>	180,16 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Outras designações</b>	Ácido 3, 4, 5-tri-hidroxibenzóico	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico	Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, ácido 3-metoxi-4-hidroxicinâmico, ácido 3-metileter cafeico ou 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) propenóico	Ácido benzoárico ou 2, 3, 7, 8-tetra-hidroxi (1) benzopirano (5, 4, 3-c,d,e)(1)b enzopirano-5,10-diona	Ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-propenoico, ácido 3,4-di-hidroxicinâmico ou ácido 3,4-di-hidroxicinâmico
<b>Estrutura química</b>					
<b>Solubilidade em água</b>	11,49 g.L <sup>-1</sup>	0,86 g.L <sup>-1</sup>	0,97 g.L <sup>-1</sup>	<1 g.L <sup>-1</sup>	54,1 g.L <sup>-1</sup>

**Tabela 11.** Propriedades químicas dos compostos fenólicos (continuação).

Composto	Catequina	Ácido Benzóico	Ácido Salicílico	Fenol	Ácido <i>p</i> -Cumárico
<b>Fórmula química</b>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
<b>Peso molecular</b>	290,28 g.mol <sup>-1</sup>	122,12 g.mol <sup>-1</sup>	138,12 g.mol <sup>-1</sup>	94,11 g.mol <sup>-1</sup>	164,2 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Outras designações</b>	Ácido catequínico, catecol ou ácido catéquico	Ácido benzocarboxílico, ácido fenilórmico ou ácido dracílico	Ácido 2-hidroxibenzoico	Ácido carbólico, ácido fénico, ácido fenílico, hidróxido de fenilo, hidroxibenzeno ou oxibenzeno	Ácido 4-hidroxicinâmico, ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico ou ácido β – (4-hidroxifenil) acrílico
<b>Estrutura química</b>					
<b>Solubilidade em água</b>	63,1 g.L <sup>-1</sup>	2,9 g.L <sup>-1</sup>	2,17 g.L <sup>-1</sup>	66,7g.L <sup>-1</sup>	Pouco solúvel

### 2.7.3.2. Testes de assimilação de outras fontes de carbono: compostos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e bases

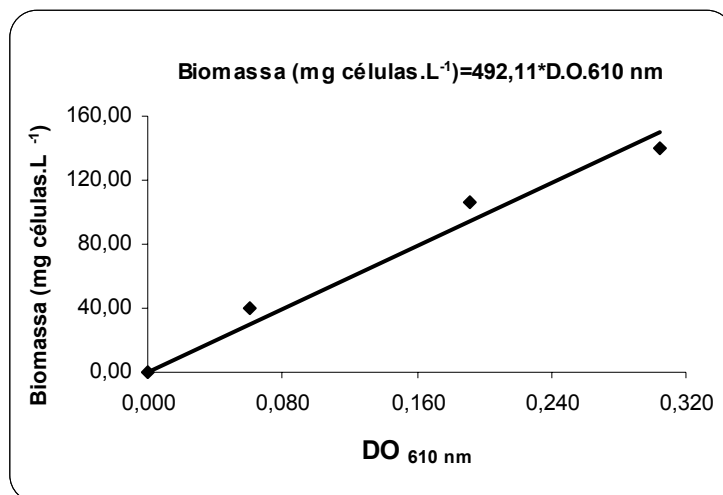
Através do Sistema Biolog Microplate, Gram positive identification test (Biolog, Inc.) testou-se a capacidade dos isolados assimilarem 95 fontes de carbono (Tabela 12). Preparou-se uma suspensão de cada isolado em solução salina estéril com uma densidade óptica a 610 nm de 0,3-0,4. Para o isolado M12 preparou-se também uma suspensão a pH 4,7, para obter as condições ótimas para o seu crescimento. A suspensão foi inoculada nos poços (150  $\mu$ L), sendo que todos os poços se apresentavam incolores. As galerias foram incubadas de 4 a 6 horas ou de 16 a 24 horas à temperatura a 25 °C ou a 50 °C sendo um resultado positivo indicado pelo aparecimento de cor violeta.

**Tabela 12.** Fontes de carbono testadas através do sistema Biolog.

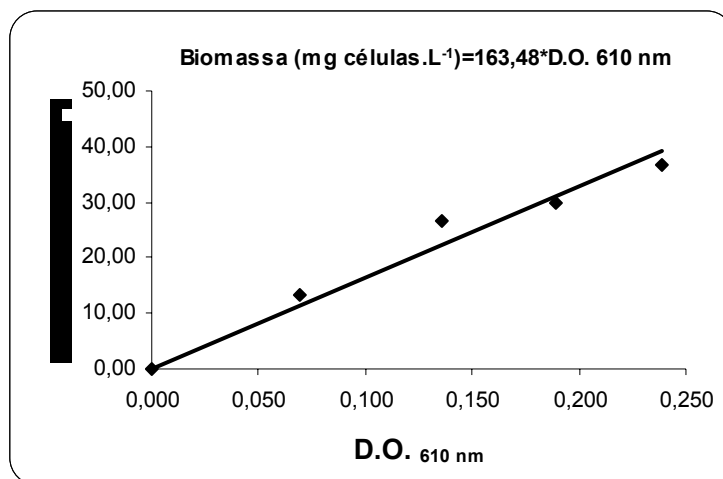
Fontes de Carbono				
$\alpha$ - Ciclodextrina	$\beta$ - Ciclodextrina	Dextrina	Glicogénio	Inulina
Manose	Tween 40	Tween 80	N-Acetil-D – Glucosamina	N-Acetil-D- Manosamina
Amigdalina	L-Arabinose	D-Arabitol	Arbutina	D-Celobiose
D-Frutose	L-Fucose	D-Galactose	Ácido D- Galacturónico	Gentiobiose
Ácido D-Glucónico	$\alpha$ -D-Glucose	m-Inositol	$\alpha$ -D-Lactose	Lactulose
Maltose	Maltotriose	D-Manitol	D-Manose	D-Melezitose
D-Melibiose	$\alpha$ -Metil-D- Galactosídeo	$\beta$ -Metil-D- Galactosídeo	3-Metil Glucose	$\alpha$ -Metil-D- Glucosídeo
B-Metil-D- glucosídeo	$\alpha$ -Metil-D- Manosídeo	Palatinose	D-Psicose	D-Rafinose
L-Ramnose	D-Ribose	Salicina	Sedo- heptulosano	D-Sorbitol
Estaquiiose	Sacarose	D-Tagatose	D-Trealose	Turanose
Xilitol	D-Xilose	Ácido Acético	Ácido $\alpha$ - Hidroxibutírico	Ácido $\beta$ - Hidroxibutírico
Ácido $\gamma$ - Hidroxibutírico	Ácido p-Hidroxil- Fenil-Acético	Ácido $\alpha$ -Keto- Glutárico	Ácido $\alpha$ -Keto- Valérico	Lactamida
Metil-Éster de Ácido D-Láctico	Ácido L-Láctico	Ácido D-Málico	Ácido L-Málico	Metil-Piruvato
Mono-Metil- Succinato	Ácido Propiónico	Ácido Pirúvico	Ácido Succinamico	Ácido Succínico
Ácido N-Acetil L- Glutâmico	L-Alaninamida	D-Alanina	L-Alanina	L-Alanil-Glicina
L-Asparagina	Ácido L-Glutâmico	Ácido Glicil-L- Glutâmico	Ácido L- Piroglutâmico	L-Serina
Putrescina	2,3-Butanodiol	Glicerol	Adenosina	2'-Deoxi- Adenosina
Inosina	Timidina	Uridina	Adenosina-5'- Monofosfato	Timidina-5'- Monofosfato
Uridina-5'- Monofosfato	Frutose-6-Fosfato	Glucose-1-Fosfato	Glucose-6- Fosfato	D-L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato

## 2.8. Relação entre densidade óptica e biomassa

O aumento de biomassa das culturas de enriquecimento obtidas a pH 4,7 foi avaliado por espectrofotometria a 610 nm, sendo que para determinar a relação entre a densidade óptica e a biomassa das culturas, estas foram crescidas em meio mínimo com uma concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico. No final do crescimento centrifugaram-se e lavaram-se as culturas a 10 000 rpm durante 10 minutos (8°C) (centrífuga *Beckman, Avanti<sup>TM</sup> centrifuge, rotor JA 14*). Depois de desperdiçado o sobrenadante, diluiu-se a suspensão em 100 mL de salina e leu-se a D.O.<sub>610 nm</sub>. Prepararam-se 5 diluições, em duplicado, com D.O.<sub>610 nm</sub> que variavam entre 0,0 e 0,3 na cultura de enriquecimento M 4,7 e entre 0,0 e 0,25 na cultura de enriquecimento T 4,7. Em seguida filtraram-se todas as suspensões com auxílio de uma bomba de vácuo *GE Motors-M112X* através de filtros estéreis *ALBET – Cellulose nitrate membrane filters; diâmetro 47 mm e porosidade 0,45 µm*. Os filtros, que já tinham sido previamente levados a peso constante, foram colocados a 100 °C numa estufa (*P selecta, mod. 210*) de modo a secar a massa celular. Este procedimento permitiu traçar as curvas de calibração (Figuras 7 e 8) entre a massa seca das culturas de enriquecimento de M 4,7 e T 4,7 e a densidade óptica correspondente.



**Figura 7.** Recta de calibração obtida para a cultura mesofílica M 4,7.



**Figura 8.** Recta de calibração obtida para a cultura termofílica T 4,7.

A cultura mesofílica apresenta valores de biomassa muito superiores aos apresentados pela cultura termofílica para densidades ópticas semelhantes. Isto deve-se ao facto dos polifenóis, nomeadamente o ácido tânico, oxidarem ao longo do tempo e desenvolverem uma coloração amarela que interfere com a leitura da densidade óptica a 610 nm, aumentando o seu valor.

## 2.9. Estudo cinético de degradação de ácido tânico a 25 °C e a 50 °C a pH 4,7

### 2.9.1. Preparação do pré-inóculo

Cada uma das culturas de enriquecimento (M 4,7 e T 4,7) foi inoculada num matraz de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral com 170 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico, de modo a obter uma D.O.<sub>610 nm</sub> inicial de 0,08. As culturas incubaram respectivamente a 25 °C e a 50 °C, respectivamente, com agitação orbital de 120 rpm e no final do período de incubação (2 dias para a cultura mesófila e 5 dias para a cultura termófila) preparou-se o inóculo. Para o efeito, lavaram-se as células, duas vezes, com solução salina estéril por forma a retirar algum ácido tânico ou seus metabolitos que ainda estivessem em solução e inoculou-se o meio destinado aos estudos cinéticos, de forma a ter uma D.O.<sub>610 nm</sub> de aproximadamente 0,05.

## 2.9.2. Estudo cinético de degradação de ácido tânico

As culturas utilizadas nos estudos cinéticos incubaram durante 5 dias, tendo-se retirado amostras ao longo do tempo. Estes ensaios foram realizados em duplicado, sendo que em cada tempo de amostragem se retiraram 3 mL de cultura para tubos tipo *Eppendorf*. Leu-se a D.O.  $_{610\text{nm}}$  e em seguida centrifugaram-se os tubos a 14 000 rpm durante 10 minutos (*Eppendorf Centrifuge 5410*). Transferiu-se o sobrenadante para novos tubos *Eppendorf*, que se guardaram a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  até se proceder à análise dos polifenóis e de COD (Carbono Orgânico Dissolvido) conforme procedimento descrito nas secções 2.14.1.1. e 2.2. Este procedimento foi repetido ao longo do tempo de forma a registar os perfis de crescimento e de degradação de ácido tânico.

### 2.9.2.1. Determinação das velocidades específicas de crescimento e de degradação de polifenóis pelas culturas de enriquecimento.

A velocidade específica de crescimento das culturas de enriquecimento foi calculada durante a fase exponencial. O consumo de polifenóis pode ser expresso como

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{X_0 \cdot \mu}{Y} e^{\mu t} \quad (3)$$

sendo S a concentração de polifenóis,  $\mu$  a velocidade específica de crescimento, Y o rendimento biológico e  $X_0$  a concentração de biomassa no tempo zero. Integrando esta equação entre  $t = 0$  e  $t$  ( $S=S_0$  para  $t = 0$ ) obtém-se:

$$S = S_0 - \frac{X_0}{Y} (e^{\mu t} - 1) \quad (4)$$

Esta expressão foi ajustada aos dados experimentais e através de um programa de computador derivou-se S em ordem a t, de forma a obter a velocidade de degradação de polifenóis  $-\frac{dS}{dt}$ . A velocidade específica de degradação de polifenóis foi calculada pela seguinte expressão:

$$\frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right) \quad (5),$$

sendo X a concentração de biomassa no tempo t.

## **2.10. Crescimento a 25 °C da cultura de enriquecimento termofílica T 4,7**

A cultura de enriquecimento isolada a 50 °C, T 4,7, foi inoculada, em duplicado, num matraz de 100 mL contendo 20 mL de meio mineral com 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico, de modo a que a D.O.<sub>610nm</sub> inicial fosse aproximadamente 0,08 e incubada a 25 °C. Como controlo abiótico utilizou-se meio mineral com uma concentração de 200 mgL<sup>-1</sup> de ácido tânico, sem ser inoculado.

Retiraram-se amostras para análise de polifenóis por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) aos tempos 0 e 7 dias. Estas amostras foram tratadas e conservadas como se referiu na secção 2.9.2.

## **2.11. Biodegradação de polifenóis de água de cozedura de cortiça em reactor fechado**

O estudo da biodegradação dos polifenóis existentes na água de cozedura de cortiça processou-se num reactor do tipo *batch* dotado de um sistema de agitação onde as culturas de enriquecimento M 4,7 e T 7,2 foram inoculadas.

Os reactores utilizados apresentavam um volume útil de 500 mL, com 300 mL de água de cozedura de cortiça. Este recipiente era revestido por uma camisa por onde se fez passar água a uma temperatura controlada de 25 °C por um banho termostaticado (*Medingen K10 E1*). O reactor possuía ainda um difusor de vidro imerso na água de cozedura de cortiça para entrada de ar e uma saída para gases de exaustão equipadas com um filtro de esterilização *Gelman Laboratory- ACRO 50 Vent Device; 0,2 μm, PTFE P/N 4251* e uma saída com um vedante de borracha para amostragem. O arejamento utilizado foi de 0,2 vvm [volume de ar / (volume meio\*minuto)], que era regulado por um rotâmetro *Omega 14651* e fornecido por uma bomba de aquário *Elite 800 Aquarium*. A agitação foi realizada com uma barra magnética e promovida por uma

placa de agitação (*Heidolph MR 3000*) a uma velocidade de 300 rpm. Ao reactor adicionou-se ainda o anti-espumante *Sicolox A 200* e o inóculo cultivado como se refere na secção 2.10.1. de modo a ter uma D.O.<sub>610nm</sub> inicial a pH 7,2 de 0,08 e a pH 4,7 de 0,25. Como controlo foi utilizado um outro reactor não inoculado, operando nas mesmas condições. A instalação completa do reactor e respectivo controlo encontra-se apresentada na Figura 9.



**Figura 9.** Instalação dos reactores *batch* para biodegradação dos polifenóis da água de cozedura de cortiça.

Retiram-se amostras uma vez por dia para análise de pH, COD e polifenóis. A análise de pH foi imediata, enquanto as restantes análises foram realizadas posteriormente, pelo que as amostras foram tratadas e guardadas a -30 °C (*Sanyo Medical Freezer*) até serem analisadas.

Num estudo de biodegradação posterior a pH 4,7 a água de cozedura de cortiça foi ainda suplementada com cloreto de amónio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,25 g.L<sup>-1</sup> e di-hidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 20 mM.

## **2.12. Ensaio de degradação de polifenóis com *resting cells* das culturas de enriquecimento de M 4,7 e T 4,7**

As bactérias isoladas a 25 °C e a 50 °C (pH 4,7) foram cultivadas em meio LA durante 24-48 horas. A massa celular foi removida do agar e ressuspendida em solução

salina, seguindo-se a lavagem das células, duas vezes, por centrifugação como descrito na secção 2.9.1. Efectuou-se a mistura das culturas puras mesofílicas de modo a obter uma proporção de 90 % da estirpe M9 para 10 % da estirpe M10, de forma a simular as culturas de enriquecimento isoladas a pH 4,7.

Num matraz de 100 mL foram colocados 10 mL de água de cozedura de cortiça previamente centrifugada (10 minutos, 10 000 rpm) que foram inoculados de modo a obter o correspondente a uma D.O.<sub>610 nm</sub> inicial de 10. Como controlo utilizou-se água de cozedura de cortiça não inoculada e soluções tampão de fosfato com concentrações de 200 e 1000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico e ainda as mesmas soluções inoculadas.

Retiraram-se amostras para análise de polifenóis aos tempos 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 5 horas. Estas amostras foram tratadas e conservadas como se referiu na secção 2.9.2.

### **2.13. Crescimento da cultura de enriquecimento M 4,7 em água de cozedura de cortiça suplementada com ácido tânico e ácido gálico**

A água de cozedura de cortiça utilizada para este ensaio foi previamente centrifugada a 10 000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado através de papel de filtro *Whatman Filter Paper 42 – Slow filter speed* seguindo-se uma filtração em sistema de vácuo com uma membrana *ALBET – Cellulose nitrate membrane filters; diâmetro 47 mm e porosidade 0,45 µm*. Após este tratamento a água foi distribuída por dois frascos *Schott*, sendo uma parte suplementada com de ácido gálico e a outra com ácido tânico, de modo a obter uma concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>.

A cultura de enriquecimento M 4,7 foi inoculada num matraz de 100 mL contendo 20 mL de água de cozedura de cortiça previamente suplementada com ácido tânico ou ácido gálico, de modo a que a D.O.<sub>610 nm</sub> inicial fosse aproximadamente 0,1. Nos respectivos controlos mantiveram-se todas as condições excepto a adição de inóculo. Retiraram-se amostras para análise de polifenóis por HPLC aos tempos 0 e 7 dias. Estas amostras foram tratadas e conservadas como se referiu na secção 2.9.2.

## 2.14. Métodos Analíticos

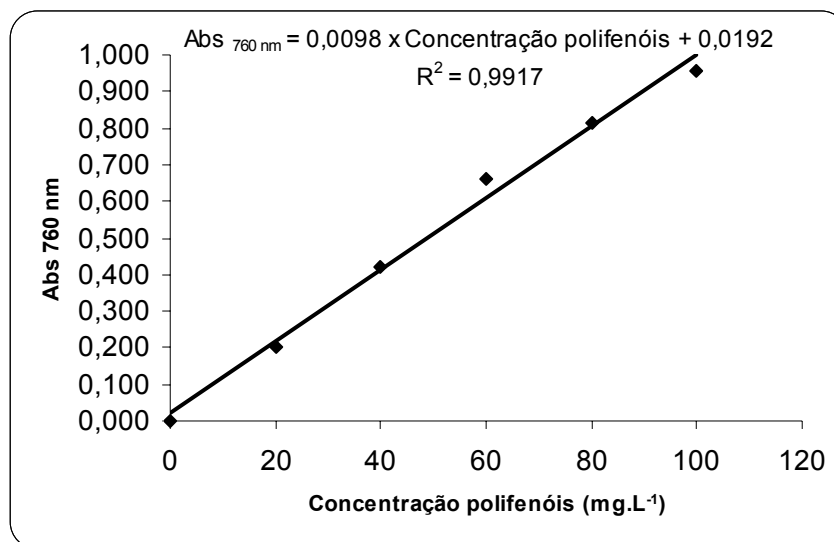
### 2.14.1. Quantificação de polifenóis

A determinação da concentração de polifenóis foi efectuada recorrendo a dois métodos analíticos, um espectrofotométrico (colorimétrico) e um cromatográfico (cromatografia líquida de alta resolução).

#### 2.14.1.1. Método Colorimétrico

A concentração de polifenóis foi determinada utilizando o método de Folin-Denis (AOAC, 1984; Davies, 2003) que quantifica os fenóis totais, baseando-se nas reacções de oxi-redução entre compostos fenólicos e iões metálicos. A reacção consiste na redução em meio alcalino do fosfomolibdato-fosfotungstato a molibdénio, com desenvolvimento de cor azul. Deste modo, um aumento da absorvância da solução ( $\lambda=760$  nm) é proporcional à concentração de grupos fenólicos.

O procedimento utilizado consistiu em colocar 3,75 mL de água destilada ou meio mínimo em cada tubo de centrífuga de 15 mL, ao qual se adicionou 0,5 mL de amostra (com diluição adequada) e 0,25 mL de reagente de Folin-Denis (Fluka). Deixou-se repousar durante 5 minutos e em seguida adicionou-se 0,5 mL de solução de carbonato de sódio (Fluka) a 20 % (p/v). Homogeneizou-se esta solução com auxílio de um vórtex e esperou-se 1 hora para que a reacção se completasse. O reagente de Folin-Denis que tinha cor amarela desenvolveu cor azul por reacção com os polifenóis. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas (*Beckam, Avanti<sup>TM</sup> centrifuge, rotor JA 25.15*) a uma velocidade de 10 000 rpm durante 10 minutos, tendo-se lido a absorvância a 760 nm dos sobrenadantes. As absorvâncias foram correlacionadas com a concentração de polifenóis através de curvas de calibração (Figura 10) obtidas a partir de soluções-padrão de ácido tânico (Riedel-de Haën) (utilizado como substância de referência) com concentrações variáveis entre 0 e 100 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 10.** Curva de calibração de ácido tânico obtida através do método de Folin-Denis.

Para preparar os referidos padrões pipetaram-se alíquotas de 100 a 500  $\mu\text{L}$  da solução-mãe  $1 \text{ g.L}^{-1}$  para tubos de centrifuga contendo 3,75 mL de água destilada ou meio mineral. Seguiu-se o procedimento utilizado para as amostras, sendo que após adição do carbonato de cálcio se adicionou meio mineral ou água destilada de forma a perfazer os 5 mL.

#### 2.14.1.2. Método Cromatográfico

Utilizou-se a cromatografia líquida de fase reversa para a determinação de polifenóis tendo por base o procedimento experimental descrito por Zhu *et al.* (1992). O ácido tânico foi identificado através do seu tempo de retenção e quantificado através da área do eluído, por interpolação a uma curva de calibração. A área de integração foi relacionada com a concentração de ácido tânico através da curva de calibração (Figura 11) obtida a partir de soluções padrão de ácido tânico com concentrações entre 0 e 100  $\text{mg.L}^{-1}$ .

##### 2.14.1.2.1. Preparação do eluente e do solvente de lavagem

O eluente utilizado para análise dos polifenóis era composto por uma solução de ácido fosfórico 0,025 % em metanol (A) (*Riedel-de Haën CHROMASOLV*® para

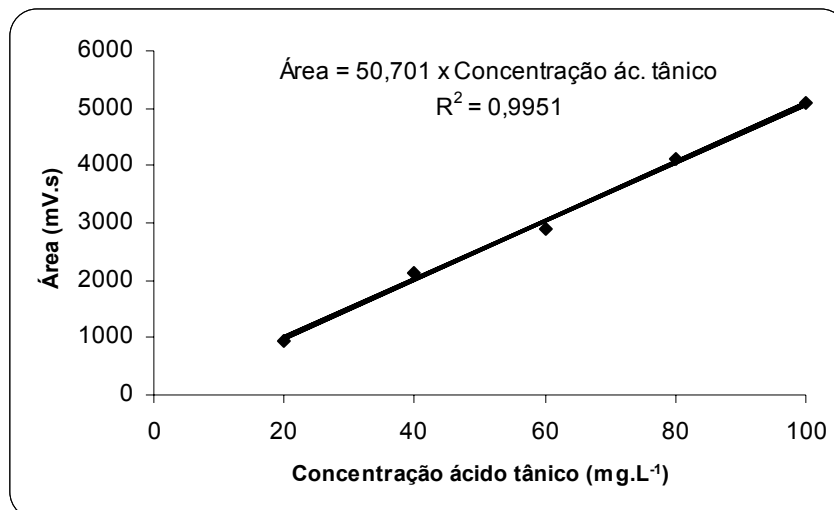
HPLC) e por uma solução aquosa de ácido fosfórico a 0,025 % (B). Estas soluções foram filtradas por vácuo através de um filtro *Schleicher & Schuell – membrane filter NL 17*; diâmetro 50 mm e porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ . Como solvente de lavagem da coluna utilizou-se metanol. Antes de serem utilizados, o eluente e o solvente de lavagem foram desgaseificados fazendo-se borbulhar hélio (*Praxair*, pureza 99,995 %) durante 5 minutos.

#### **2.14.1.2.2. Condições de operação do cromatógrafo**

Utilizou-se um cromatógrafo *Knauer HPLC Pump K100* com detector *UV Knauer K2501*. Este cromatógrafo estava equipado com uma coluna de fase reversa *LichoCART 250-4 HPLC Cartige*; enchimento *Supersphere<sup>®</sup> 100 RP-18e*, com partículas de 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro com pré-coluna (Merck). Para separação dos compostos a analisar utilizou-se um gradiente de eluição. Iniciou-se com 10 % de solução B que foi aumentando gradualmente até atingir os 64 % aos 18 minutos. Aos 18 minutos o gradiente foi novamente aumentado de modo a atingir 100 % de solução B ao fim de 20 minutos. A partir dos 20 minutos reduziu-se o gradiente da solução B de modo a atingir os 10 % ao fim de 28 minutos. O caudal de eluente utilizado foi de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e o detector programado para um comprimento de onda de 280 nm.

#### **2.14.1.2.3. Preparação das soluções padrão de ácido tânico**

As soluções padrão de ácido tânico foram preparadas a partir de uma solução-mãe de ácido tânico com uma concentração de 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . As soluções padrão apresentavam uma concentração entre 0 e 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , que permitiu traçar as curvas de calibração (Figura 11). Injectaram-se 20  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções padrão.



**Figura 11.** Curva de calibração para doseamento do ácido tânico por HPLC.

### 2.14.2. Cálculo dos limites de detecção

O limite de detecção (LD) das curvas de calibração para determinação dos polifenóis (métodos colorimétrico e cromatográfico) foi calculado utilizando a seguinte expressão (Miller, 2000):

$$LD = a + 3 \times S_a \quad (6)$$

sendo  $\underline{a}$  o valor da ordenada na origem do ajuste e  $\underline{S}_a$  o valor do desvio de  $\underline{a}$ ,

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i (x_i)^2}{n \cdot \sum_i (x_i - x_{\text{médio}})^2}} \quad (7)$$

em que  $\underline{x}_i$  é o valor da concentração do padrão,  $\underline{x}_{\text{médio}}$  é o valor médio de todas as concentrações dos padrões,  $\underline{n}$  é o número de pontos experimentais e  $\underline{S}_{y/x}$  é o valor dos erros aleatórios na direcção y e é calculado pela seguinte expressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{\text{médio}})^2}{n - 2}} \quad (8)$$

O valor do limite de detecção das rectas de calibração de ácido tânico utilizando o método colorimétrico variou entre 11 e 21 mg.L<sup>-1</sup>, visto terem sido efectuadas calibrações diárias. Devido a estas oscilações fixou-se o limite de detecção correspondente à concentração do padrão mais diluído da curva de calibração, ou seja, 20 mg.L<sup>-1</sup>.

No caso do método cromatográfico, o limite de detecção das rectas de calibração de ácido tânico variou entre 8,5 e 8,7 mg.L<sup>-1</sup>, pelo que se fixou o seu valor em 9 mg.L<sup>-1</sup>.

## CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização físico-química da água de cozedura de cortiça

A água de cozedura de cortiça recolhida em três amostragens foi analisada para os parâmetros físico-químicos Carência Bioquímica de Oxigénio (CQO), Carência Biológica de Oxigénio (CBO<sub>5</sub>), Carbono Orgânico Total (COT), pH e Concentração de Polifenóis (Tabela 13).

**Tabela 13.** Caracterização físico-química da água de cozedura de cortiça.

Parâmetros analisados	12 Dezembro	29 Abril	25 Novembro
	2002	2003	2004*
CQO (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	4207,0	2303,0	4594,0
CBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> )	612,5	486,9	735,3
COT (mg.L <sup>-1</sup> )	1991,0	1246,2	1224,0
pH	4,68	5,69	5,02
Biodegradabilidade (CBO <sub>5</sub> /CQO)	0,146	0,211	0,160
Polifenóis (mg ácido tânico.L <sup>-1</sup> )	780,7	774,0	661,6

\* Esta amostra não foi utilizada em qualquer ensaio apresentado nesta dissertação.

As três amostras de água de cozedura de cortiça apresentam valores semelhantes de concentração em polifenóis e de pH. Os valores de CQO, CBO<sub>5</sub>, COT registados para as amostras de 12 de Dezembro de 2002 e de 25 de Novembro de 2004 foram mais elevados do que os da amostra de 29 de Abril de 2003, no entanto a biodegradabilidade foi semelhante em todas as amostras.

Comparando estes resultados com os que se encontram na literatura e os referidos na secção 1.2.1., verifica-se que as amostras se apresentam dentro da gama média de valores para os parâmetros analisados, com excepção das análises de COT das duas últimas análises e da CQO da amostra de 29 de Abril de 2003 (Guedes *et al.*, 2003; Minhalma & Pinho, 2001; Peres *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). O carbono orgânico total das amostras de 29 de Abril de 2003 e 25 de Novembro de 2004 é inferior ao referido por Silva *et al.* (2004), 1890 mg.L<sup>-1</sup>. Relativamente ao valor obtido para a CQO da amostra de 29 de Abril, este é

aproximadamente metade do que tem sido descrito noutros estudos, em que se referem valores superiores a  $4200 \text{ mg O}_2\text{.L}^{-1}$  (Peres *et al.*, 2004).

Relativamente à biodegradabilidade das amostras analisadas, esta ronda os 0,2, que é o valor também referido na literatura (Guedes *et al.*, 2003; Peres *et al.*). Portanto, estes valores atestaram a baixa biodegradabilidade destas águas, uma vez que um efluente é considerado facilmente biodegradável quando este valor é maior ou igual a 0,3 e recalcitrante se for menor do que 0,1 (Yu *et al.*, 1998, Chun & Yizhong, 1999; Monje-Ramirez & Velásquez, 2004).

### 3.2. Enumeração dos microrganismos heterotróficos totais a 25 °C e a 50 °C presentes na água de cozedura de cortiça

Procedeu-se à contagem dos microrganismos heterotróficos totais presentes na água de cozedura de cortiça a 25 °C e a 50 °C, por espalhamento e incorporação, após um período de incubação de 48 horas (Tabela 14).

**Tabela 14.** Contagens dos microrganismos heterotróficos presentes na água de cozedura de cortiça utilizando a técnica de espalhamento e incorporação.

<b>Espalhamento</b>	<b>25 °C</b>	<b>50 °C</b>
Amostra 12 Dezembro (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$1,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$
Amostra 29 Abril (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$1,8 \times 10^7$	$<1,0 \times 10^0$
Amostra 25 Novembro (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$3,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
<b>Incorporação</b>	<b>25 °C</b>	<b>50 °C</b>
Amostra 12 Dezembro (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$4,9 \times 10^5$	$<1,0 \times 10^0$
Amostra 29 Abril (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^1$
Amostra 25 Novembro (UFC.mL <sup>-1</sup> )	$1,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$

O número de unidades formadoras de colónias de microrganismos heterotróficos cultivados a 25 °C é superior na segunda amostra (29 de Abril), tanto pelo método de espalhamento como pelo de incorporação. Já no caso da contagem dos microrganismos heterotróficos presentes na água de cozedura de cortiça a 50 °C, o número de unidades formadoras de colónias é muito reduzido nas duas primeiras amostras, mas na última amostra, de 25 de Novembro de 2004, apresenta valores mais próximos dos obtidos a 25 °C. Estes

resultados indiciam que a composição microbiana das águas de cozedura de cortiça é muito variável ou que foram analisadas a diferentes tempos após o início do arrefecimento.

### 3.3. Enriquecimento e caracterização das culturas

As culturas de enriquecimento foram obtidas a partir de amostras de água de cozedura de cortiça, utilizando ácido tânico (1 g.L<sup>-1</sup>) como fonte de carbono. Utilizaram-se três condições distintas: 25 °C, pH 4,7 (cultura M 4,7); 25 °C, pH 7,2 (cultura M 7,2) e 50 °C, pH 4,7 (cultura T 4,7). As bactérias cultiváveis presentes em cada cultura de enriquecimento foram purificadas.

Os isolados bacterianos obtidos a partir da cultura de enriquecimento M 7,2 foram designados por M1, M4, M6, M7 e M8. Da cultura de enriquecimento M 4,7 obtiveram-se os isolados M9 e M10 e da cultura de enriquecimento T 4,7 isolaram-se M12 e M13. Recorrendo a testes fenotípicos, bioquímicos (API 20NE, API 20 E e BIOLOG), crescimento em fontes únicas de carbono e à análise da sequência do gene 16S do rRNA caracterizaram-se os isolados das culturas de enriquecimento (Tabela 15).

Os isolados M1, M4 e M6 foram identificados como pertencentes ao género *Klebsiella*, sendo que o isolado M1 apresenta uma similaridade de 93,6 % com a sequência do gene rRNA 16S de uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae*, o isolado M4 de 99,0 % com uma estirpe de *Klebsiella planticola* e o isolado M6 de 94,9 % com uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae*. O isolado M7 foi identificado como pertencente ao género *Pseudomonas*, apresentando uma similaridade de 98,7 % com uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens* e o isolado M8 foi identificado recorrendo apenas a testes bioquímicos, API 20 NE, uma vez que este teste pôde identificar este organismo com um grau de confiança de identificação de 99,9 % com a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*.

O isolado M9 foi identificado como pertencente ao género *Burkholderia*, apresentando uma similaridade de rDNA 16S de 99,9 % com uma estirpe de *Burkholderia tropicalis* e o isolado M10 pertence ao género *Klebsiella* apresentando uma similaridade de 99,4 % com uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae*.

Da cultura de enriquecimento T 4,7 identificaram-se dois isolados, M12 e M13. O isolado M12 foi identificado como pertencente ao género *Bacillus*, apresentando uma similaridade de cerca de 98 % com o gene rRNA 16S de membros da espécie "*Bacillus*

*acidogenesis*” e o isolado M13 pertence ao género *Bacillus* apresentando uma similaridade de cerca de 93 % com membros da espécie *Bacillus licheniformis*.

Comparando estes resultados com os descritos por Deschamps *et al.* (1980), que isolaram estirpes bacterianas degradadoras de ácido tânico pertencentes aos géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Klebsiella*, verifica-se que os géneros das estirpes M1, M4, M6 e M10 (género *Klebsiella*) e os isolados M12 e M13 (género *Bacillus*) já tinham sido referenciados como apresentando estirpes que degradam ácido tânico. Mondal & Pati (2000) referiram também que estirpes da espécie *Bacillus licheniformis*, à qual pertence o isolado M13 e estirpes da espécie *Klebsiella pneumoniae*, à qual pertencem os isolados M1, M6 e M10 são degradadoras de taninos hidrolisados, nomeadamente ácido tânico. Relativamente aos géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* não se encontraram na literatura referências a estirpes destes géneros que degradassem ácido tânico.

**Tabela 15.** Caracterização dos isolados bacterianos obtidos nos enriquecimentos.

Cultura	Isolado bacteriano	Morfologia colonial	Morfologia celular e coloração de Gram	Teste citocromo oxidase	Teste catalase	API 20 NE	API 20 E	Isolado filogeneticamente mais próximo (rRNA 16S)
M 7,2	M1	creme, brilhante, circular, convexa	bastonetes Gram -	-	+	Código 5667743 (não existe identificação)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> 99,8%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPY17656 93,6 %
	M4	creme, brilhante, circular, convexa	bastonetes Gram -	-	+	Código 5667541 (não existe identificação)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> 99,8%	<i>Klebsiella planticola</i> KPY17663 99,0 %
	M6	creme, brilhante, circular, convexa	bastonetes Gram -	-	+	Código 5667543 (não existe identificação)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> 99,8%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPY17657 94,9 %
	M7	alaranjada, translúcida, circular, convexa	bastonetes Gram -	+	+	Código 4157757 (não existe identificação)	—	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PFL 278812 98,7 %
	M8	amarelada, translúcida, circular, convexa	bastonetes Gram -	-	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	—	—
M 4,7	M9	laranja, circular, convexa, pequena, translúcida	bastonetes Gram -	-	+	Código 1067773 (não existe identificação)	—	<i>Burkholderia tropicalis</i> AY128104 99,9%
	M10	creme, circular, convexa, grande, brilhante	bastonetes Gram -	-	+	Código 5667743 (não existe identificação)	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AF453251 99,4%
T 4,7	M12	creme, forma de limão, rugosa	bastonetes Gram + formam endósporos	+	+	—	—	<i>Bacillus acidogenesis</i> AF547209 98,3%
	M13	creme, rugosa, com "bolhas", grande, circular, erudida	bastonetes Gram + formam endósporos	-	+	—	—	<i>Bacillus licheniformis</i> AY296812 92,6%

### 3.3.1. Versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 e respectivos isolados

#### 3.3.1.1. Testes de crescimento em fontes únicas de carbono

Para avaliar a versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento mesofílica M 4,7 e termofílica T 4,7 foram realizados estudos de crescimento em vários compostos fenólicos, cujos resultados se apresentam nas Tabelas 16 e 17. Alguns dos compostos fenólicos seleccionados são descritos como estando presentes na água de cozedura de cortiça (Benitez *et al.*, 2003, Minhalma & Pinho, 2001), nomeadamente o ácido gálico, o ácido ferúlico, o ácido vanílico, o ácido elágico, o ácido benzóico, o fenol, o ácido tânico, o ácido salicílico, o ácido p-cumárico, o ácido cafeico e a catequina.

**Tabela 16.** Versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 a compostos fenólicos (200 mg.L<sup>-1</sup>).

Compostos fenólicos	Cultura de enriquecimento	
	M 4,7	T 4,7
Fenol	+/-	-
Ácido tânico	+	+
Ácido salicílico	-	-
Ácido ferúlico	-	-
Ácido p-cumárico	++	-
Ácido gálico	+	-
Ácido benzóico	+	-
Ácido vanílico	-	-
Ácido cafeico	+/-	+
Ácido elágico	-	-
Catequina	+/-	-

Ao analisarmos os resultados da Tabela 16 constatamos que a cultura de enriquecimento M 4,7 pode utilizar sete dos onze compostos fenólicos analisados, enquanto a cultura T 4,7 apenas usa dois. Assim, para além de ácido tânico, a cultura de enriquecimento T 4,7 apenas é capaz de degradar um composto derivado de um ácido hidroxicinâmico, enquanto que a cultura de enriquecimento M 4,7 degrada compostos derivados de ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos.

**Tabela 17.** Versatilidade nutricional dos isolados de 25 °C e 50 °C (pH 4,7) a compostos fenólicos (200 mg.L<sup>-1</sup>).

Compostos fenólicos	Estirpe bacteriana			
	25 °C pH 4,7		50 °C pH 4,7	
	M9	M10	M12	M13
Fenol	+	-	-	-
Ácido tânico	+	+	+/-	+/-
Ácido salicílico	-	-	-	-
Ácido ferúlico	-	-	-	-
Ácido p-cumárico	-	-	-	-
Ácido gálico	+/-	+	-	-
Ácido benzóico	+	-	-	-
Ácido vanílico	-	-	-	-
Ácido cafeico	+	+	+/-	-
Ácido elágico	+/-	+/-	+/-	-
Catequina	+	-	++	-

Este estudo permitiu-nos avaliar quais das estirpes isoladas nos enriquecimentos estão envolvidas na degradação destes compostos fenólicos.

Dos isolados obtidos dos enriquecimentos a 25 e 50 °C e a pH 4,7, o isolado mesofílico M9, identificado como pertencente à espécie *Burkholderia tropicalis*, foi o que apresentou maior versatilidade em relação aos compostos fenólicos em estudo. Pelo contrário, o menos versátil foi o isolado termofílico M13, identificado como pertencente à espécie *Bacillus licheniformis*.

Tal como a cultura de enriquecimento M 4,7, o isolado M9, da espécie *Burkholderia tropicalis* também cresce em fenol, ácido tânico, ácido gálico, ácido benzóico, ácido cafeico e catequina e consegue ainda crescer em ácido elágico, mas não cresceu em ácido p-cumárico. Já o isolado M10, identificado como pertencente à espécie *Klebsiella pneumoniae*, cresce em ácido tânico, ácido gálico, ácido cafeico, tal como a cultura de enriquecimento M 4,7 e ainda em ácido elágico. Apesar da cultura de enriquecimento M 4,7 não conseguir crescer em ácido elágico, cada um dos seus isolados tem essa capacidade, o que aparentemente parece contraditório. No entanto, este facto pode estar relacionado com a proporção de cada um dos isolados que se encontra na cultura de enriquecimento. Relativamente ao ácido p-cumárico a cultura de enriquecimento M 4,7 consegue crescer neste composto, mas os seus isolados não. Isto pode estar relacionado com o facto de apenas a acção conjunta dos metabolismos dos dois organismos permitir a utilização deste composto.

Relativamente aos isolados termofílicos, o isolado M12, identificado como pertencente à espécie "*Bacillus acidogenesis*", conseguiu crescer em ácido tânico e ácido

cafeico, tal como a cultura de enriquecimento termofílica, e ainda em ácido elágico e catequina, sendo que o isolado da espécie *Bacillus licheniformis* apenas consegue crescer em ácido tânico.

### ***3.3.1.2. Testes de assimilação dos isolados noutras fontes de carbono: compostos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e bases***

Para além da versatilidade nutricional em compostos fenólicos, testou-se a capacidade de cada um dos isolados das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 assimilarem noventa e cinco fontes de carbono, nomeadamente compostos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e bases nitrogenadas, utilizando o sistema Biolog. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 a diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Estirpe bacteriana			
	25 °C pH 4,7		50 °C pH 4,7	
	M9	M10	M12	M13
$\alpha$ - Ciclodextrina	-	-	-	-
$\beta$ - Ciclodextrina	-	-	-	-
Dextrina	+	+	-	+/-
Glicogénio	+	+	-	+/-
Inulina	+/-	-	-	+/-
Manose	+/-	+/-	-	+/-
Tween 40	++	+	-	+
Tween 80	++	+	-	+
N-Acetil-D-glucosamina	+	+	-	+
N-Acetil-D-manosamina	+/-	+	-	-
Amigdalina	+/-	+/-	-	+/-
L-Arabinose	+/-	+/-	-	-
D-Arabitól	+	+	-	-
Arbutina	+/-	+	-	+/-
D-Celobiose	+	+	-	+/-
D-Frutose	+	+	-	+/-
L-Fucose	+	+/-	-	+/-
D-Galactose	+	+	-	-
Ácido D-galacturónico	+	+	-	-
Gentiobiose	+/-	+	-	-
Ácido D-glucónico	+	+	-	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	+	-	+/-
m-Inositol	+	+	-	-
$\alpha$ -D-Lactose	-	-	-	+/-
Lactulose	-	-	-	+/-
Maltose	+/-	+	-	+
Maltotriose	-	+	-	+/-
D-Manitol	+	+	-	-
D-Manose	+	+	-	+/-
D-Melezitose	-	-	-	+/-
D-Melobiose	-	+	-	-
$\alpha$ -Metil-D-galactosídeo	-	+/-	-	-
$\beta$ -Metil-D-galactosídeo	-	+	-	-
3-Metil glucose	+	+	-	+/-
$\alpha$ -Metil-D-glucosídeo	+/-	+/-	-	-
$\beta$ -Metil-D-glucosídeo	+/-	+	-	+/-
$\alpha$ -Metil-D-manosídeo	-	-	-	-
Palatinose	+/-	+	-	+/-
D-Psicose	+/-	+	-	+/-
D-Rafinose	-	+	-	+/-
L-Raminose	+	+	-	+/-
D-Ribose	+/-	+/-	-	-
Salicina	-	+	-	+
Sedo-heptulosano	-	-	-	+/-
D-Sorbitol	+/-	+	-	+/-
Estaquiiose	-	-	-	-
Sacarose	+/-	+/-	-	+

**Tabela 18.** Versatilidade nutricional dos isolados das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 a diferentes fontes de carbono (continuação).

Fonte de carbono	Estirpe bacteriana			
	M9	M10	M12	M13
D-Tagatose	+	+	-	-
D-Trealose	+	+	-	+/-
Turanose	+/-	-	-	+/-
Xilitol	+/-	-	-	-
D-Xilose	-	+/-	-	-
Ácido acético	++	++	-	+/-
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	+	-	-	-
Ácido $\beta$ -hidroxibutírico	++	+/-	-	-
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	+	-	-	-
Ácido p-hidroxifenil-acético	+/-	+/-	-	-
Ácido $\alpha$ -ceto-glutárico	+	-	-	+
Ácido $\alpha$ -ceto-valérico	+/-	-	-	+/-
Lactamida	+/-	-	-	+/-
Metil-éster de ácido D-láctico	+/-	-	-	-
Ácido L-láctico	+	+	-	-
Ácido D-málico	-	+/-	-	-
Ácido L-málico	++	+	-	+/-
Metil-piruvato	+/-	+/-	-	+/-
Mono-metil-succinato	++	+/-	-	+/-
Ácido propiónico	++	-	-	-
Ácido pirúvico	++	+	-	-
Ácido succinâmico	+	+/-	-	+/-
Ácido succínico	+	+	-	+/-
Ácido N-acetil L-glutâmico	+/-	+/-	-	+
L-Alaninamida	+	+/-	-	+/-
D-Alanina	+	+	-	+/-
L-Alanina	+	+	-	-
L-Alanil-glicina	+	+	-	-
L-Asparagina	+	+	-	+/-
Ácido L-glutâmico	+	+	-	+/-
Ácido glicil-L-glutâmico	+/-	+	-	+/-
Ácido L-piroglutâmico	-	-	-	+/-
L-Serina	+	++	-	-
Putrescina	-	+/-	-	-
2,3-Butanodiol	+/-	-	-	+/-
Glicerol	-	+	-	+/-
Adenosina	+/-	+	-	+/-
2'-Deoxi-adenosina	+/-	+	-	+/-
Inosina	+/-	+	-	+/-
Timidina	+/-	+	-	+/-
Uridina	+/-	+	-	+/-
Adenosina-5'-monofosfato	-	+	-	+/-
Timidina-5'-monofosfato	-	+/-	-	-
Uridina-5'-monofosfato	-	+	-	-
Frutose-6-fosfato	-	+	-	-
Glucose-1-fosfato	-	+	-	-
Glucose-6-fosfato	+/-	+	-	-
D-L- $\alpha$ -Glicerol fosfato	+/-	+	-	-

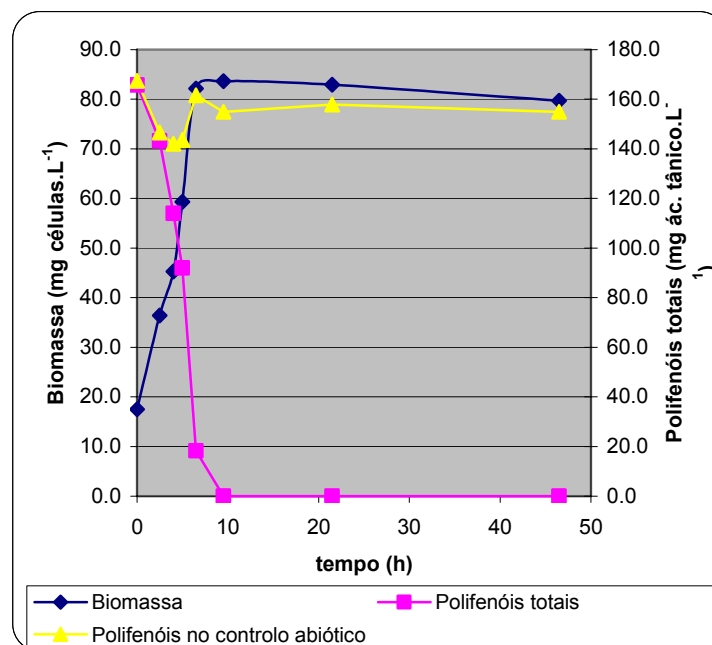
Analisando os resultados relativos ao crescimento dos isolados em diferentes fontes de carbono verifica-se que o isolado da espécie *Klebsiella pneumoniae* consegue assimilar 71 dessas fontes, enquanto que o isolado da espécie *Burkholderia tropicalis* assimila apenas 33, o isolado *Bacillus licheniformis* assimila 56 fontes e o isolado “*Bacillus acidogenesis*” não assimila nenhum dos compostos. Ou seja, no que concerne a estas fontes de carbono, o isolado M10, da espécie *Klebsiella pneumoniae* é o mais versátil, crescendo em 79 % das fontes de carbono testadas. Pelo contrário, o isolado M12, da espécie “*Bacillus acidogenesis*” é muito pouco versátil, embora se tenha testado nas mesmas condições dos outros isolados e em condições de pH ótimas para o seu crescimento. Ou seja, alterou-se o procedimento inicial recomendado pelo Sistema Biolog Microplate preparando-se a suspensão do isolado em solução salina que se encontrava a pH 4,7.

Comparando os resultados com a bibliografia, verifica-se que a espécie *Klebsiella pneumoniae*, é referenciada na literatura (Brenner, 1984) como tendo capacidade para assimilar as fontes de carbono L-arabinose, D-arabitol, D-celobiose, m-inositol, maltose, D-manitol, D-manose, L-raminose, D-sorbitol, sacarose,  $\alpha$ - D-glucose, D-rafinose e D-sorbitol e não assimilando inulina. Estes dados estão de acordo com os que se obtiveram, com exceção da D-rafinose, uma vez que o isolado M9 pertencente a esta espécie não a consegue assimilar. Já no caso do isolado pertencente à espécie *Burkholderia tropicalis*, esta trata-se de uma espécie nova, descrita há pouco tempo, pelo que ainda não existem muitos estudos sobre ela. Sabe-se, no entanto, que tem sido encontrada em bananeiras e abacaxieiros e que é fixadora de azoto (Cruz *et al.*, 2001 e Coenye & Vandamme, 2003).

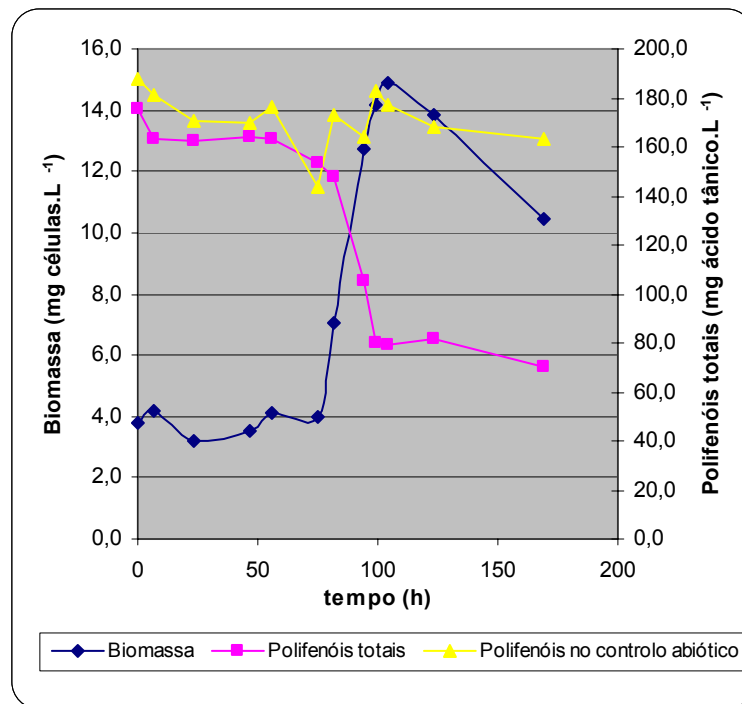
Relativamente aos isolados obtidos a 50 °C, o pertencente à espécie *Bacillus licheniformis* tem sido descrito como capaz de assimilar  $\alpha$ - D-glucose, L-arabinose, D-xilose, D-manitol e Tween 80 (Orskov,1984). No entanto observando os resultados obtidos verificamos que a estirpe isolada não consegue assimilar L-arabinose, D-xilose e D-manitol. Quanto ao isolado pertencente à espécie “*Bacillus acidogenesis*”, trata-se de uma espécie que ainda não foi validada, pelo que não existem estudos sobre a sua versatilidade nutricional.

### 3.4. Estudo cinético de crescimento e degradação de polifenóis pelas culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7

As cinéticas de crescimento e de degradação de ácido tânico, substrato usado nos enriquecimentos, pelas culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 foram estudadas em meio mineral suplementado com o referido polifenol. Este estudo não foi realizado para a cultura de enriquecimento M 7,2, uma vez que para pH's ligeiramente básicos, os polifenóis (ácido tânico) oxidam mais facilmente devido à libertação dos grupos hidroxilo, formando quinonas que conferem uma coloração amarela/acastanhada ao meio mineral (Dangles, *et al.*, 2000), não permitindo avaliar o aumento da biomassa através da densidade óptica a 610 nm. Os perfis de crescimento e degradação de polifenóis pelas culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7, que foram realizados em duplicado, são apresentados nas Figuras 12 e 13 (dados experimentais no Anexo A).



**Figura 12.** Perfis de crescimento e degradação para a cultura de enriquecimento M 4,7 em meio mineral contendo 170 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico.



**Figura 13.** Perfis de crescimento e degradação para a cultura de enriquecimento T 4,7 em meio mineral contendo 170 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico.

Analisando os perfis de crescimento e de degradação de polifenóis das duas culturas de enriquecimento verifica-se que existe uma associação entre o crescimento celular e o decréscimo de polifenóis, ou seja, a fase exponencial é coincidente com o consumo de polifenóis. Por outro lado, não se observa degradação de polifenóis nos controles abióticos. Estes factos parecem indicar que o ácido tânico é utilizado como fonte de carbono e energia.

A cultura mesofílica, M 4,7, conseguiu degradar os polifenóis abaixo do limite de detecção (20 mg.L<sup>-1</sup>), enquanto que a termofílica T 4,7 apenas os reduziu em 60 %. A cultura termofílica T 4,7 apresentou uma fase de adaptação (fase *lag*) muito extensa (que pode atingir as 75 horas), pelo que, nas condições utilizadas, necessitou de aproximadamente 100 horas para remover 120 mg.L<sup>-1</sup> de polifenóis, enquanto que a cultura mesofílica M 4,7 iniciou de imediato o crescimento exponencial e removeu os polifenóis abaixo do limite de detecção em apenas 9,5 horas. A duração da fase de adaptação da cultura termofílica pode estar dependente da quantidade de biomassa inicial, bem como do estado fisiológico das células que foram utilizadas.

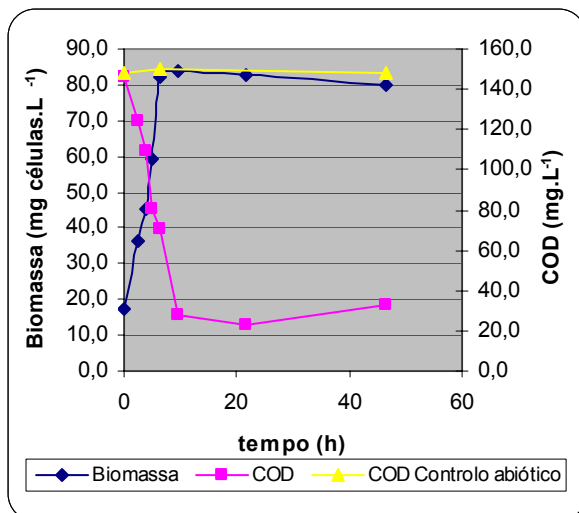
Estes resultados são evidenciados pelas velocidades de crescimento e de degradação de polifenóis das culturas de enriquecimento, 0,224 h<sup>-1</sup> e 1,4 mg polifenóis.g<sup>-1</sup>células. h<sup>-1</sup> para a cultura mesofílica e 0,055 h<sup>-1</sup> e 1,2 mg polifenóis.g<sup>-1</sup>células. h<sup>-1</sup> para a cultura termofílica. A

cultura de enriquecimento M 4,7 apresenta uma taxa de crescimento cerca de quatro vezes superior à da cultura de enriquecimento T 4,7 e apresentam velocidades específicas de degradação de polifenóis semelhantes.

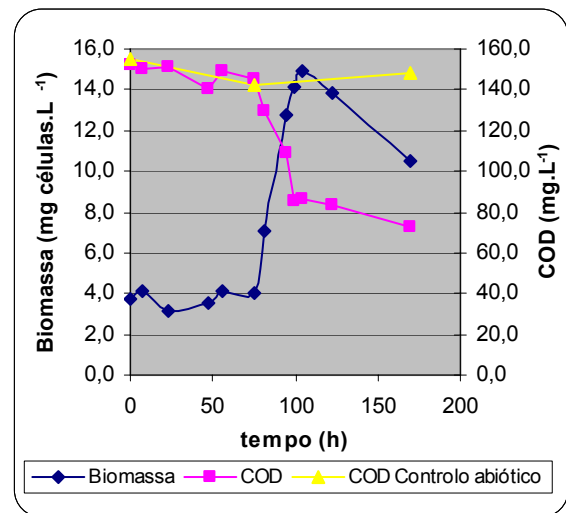
Embora a cultura de enriquecimento M 4,7 seja mais eficiente na remoção de polifenóis, a cultura de enriquecimento T 4,7 produz menos biomassa para degradar a mesma quantidade de substrato, o que pode representar uma vantagem na implementação de um sistema de tratamento.

Cunha-Santino *et al.* (2002) realizaram estudos de degradação de ácido tânico em amostras de água de consumo do reservatório de Monjolinho e verificaram que a velocidade máxima de crescimento de ácido tânico em condições aeróbias era de  $0,015 \text{ h}^{-1}$ . Ou seja, os microrganismos desta água eram muito mais lentos do que os isolados neste estudo a degradar ácido tânico. No entanto aos microrganismos da água do reservatório não se apresentavam sobre as mesmas condições de crescimento, em termos de micronutrientes, macronutrientes e pH que foram fornecidas às culturas isoladas neste estudo.

Para além da remoção de polifenóis também se realizou o estudo da remoção de carbono orgânico dissolvido ao longo do crescimento das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7, apresentando-se os perfis de crescimento e redução de COD nas Figuras 14 e 15 (dados experimentais no Anexo A) para cada uma das culturas de enriquecimento.



**Figura 14.** Perfil de crescimento e remoção de COD pela cultura mesofílica M 4,7.



**Figura 15.** Perfil de crescimento e remoção de COD pela cultura termofílica T 4,7.

Não se comparou o decréscimo de carbono orgânico dissolvido ao longo do crescimento com a evolução teórica de carbono orgânico total, uma vez que os polifenóis não são a única fonte de carbono para os microrganismos, o meio também contém extracto de levedura. No entanto podemos calcular o  $COT_{teórico}$  no tempo inicial e compará-lo com o obtido experimentalmente. Uma mole de ácido tânico (1701,28 g) possui 76 átomos de carbono (912,8 g de carbono orgânico). Assim a concentração de  $COT_{teórico}$  inicial, correspondente à concentração inicial do carbono dos polifenóis e à concentração do carbono presente no extracto de levedura, cujo valor, determinado experimentalmente, é de 59,0  $mg.L^{-1}$  pode ser obtida pela seguinte expressão:

$$COD_{teórico} (mg.L^{-1}) = \left( \frac{C_{polifenóis} * 912,8}{1701,3} \right) + 59,0 \quad (9)$$

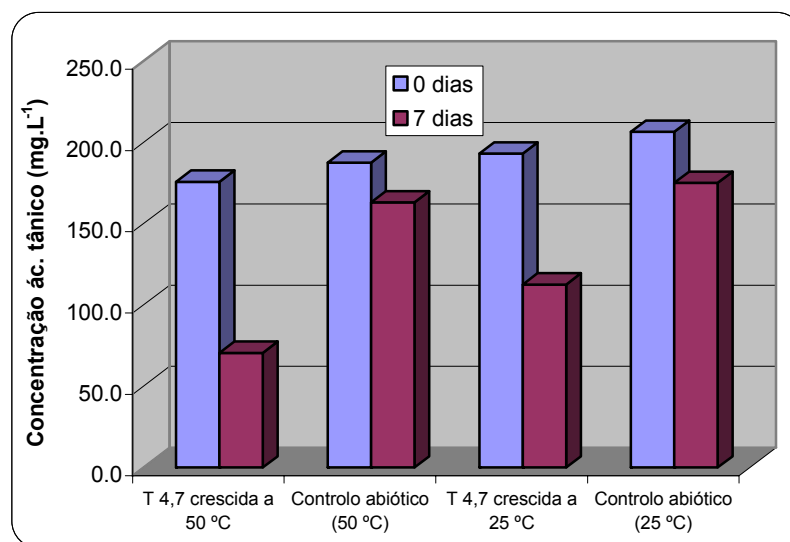
sendo assim a concentração de  $COT_{teórico}$  no tempo inicial (170  $mg.L^{-1}$  de ácido tânico) é de 150,2  $mg.L^{-1}$ . Este valor é semelhante ao obtido experimentalmente, que ronda os 150  $mg.L^{-1}$ .

Analisando as Figuras 14 e 15 constata-se que houve uma maior redução do carbono orgânico dissolvido pela cultura mesofílica M 4,7. A cultura mesofílica M 4,7 conseguiu remover 77,4 % de carbono orgânico dissolvido, enquanto que a cultura termofílica T 4,7 apenas removeu 52,3 %. Apesar de a cultura mesofílica M 4,7 conseguir degradar os polifenóis abaixo do limite de detecção, a remoção de carbono orgânico dissolvido não foi de 100 %. Tal pode ter ficado a dever-se ao facto de no final do crescimento microbiano, a cultura ter entrado em fase estacionária e/ou de morte, devido ao esgotamento dos substratos e/ou à acumulação de produtos de degradação que inibem o crescimento celular. Pode ter acontecido que após cessar o crescimento microbiano, algumas células lisam, libertando compostos orgânicos para o meio, fazendo aumentar o valor de COD. O facto de a cultura termofílica apresentar uma taxa de remoção de polifenóis inferior a 100 % (60 %) pode indicar a formação de um composto intermediário, eventualmente inibidor do crescimento, ou o esgotamento do substrato metabolizável (por exemplo ácido tânico ou glucose), havendo acumulação de polifenóis não metabolizáveis (por exemplo ácido gálico). Qualquer um destes factos poderá explicar o elevado valor de COD observado no final do crescimento, no entanto, o mais plausível é a acumulação de ácido gálico, uma vez que constatámos que esta cultura não consegue crescer na presença de ácido gálico.

A cultura M 4,7 consegue degradar o ácido tânico em ácido gálico e provavelmente transformar este em pirogalol, sendo que a cultura T 4,7 termina processo após o ácido tânico passar a ácido gálico. Se assim é, então podemos concluir que a cultura M 4,7 consegue mineralizar o ácido tânico, enquanto a cultura T 4,7 apenas o degrada parcialmente.

### 3.5. Crescimento e degradação da cultura de enriquecimento T 4,7 à temperatura de 25 °C

A cultura de enriquecimento termofílica T 4,7 revelou-se muito menos eficiente na remoção de polifenóis do que a cultura de enriquecimento mesofílica M 4,7. Uma das hipóteses que se colocou foi a de que a temperatura poderia influenciar negativamente a degradação de polifenóis. Assim, para avaliar se a capacidade de degradação de polifenóis da cultura de enriquecimento T 4,7 poderia ser melhorada e esta apresentaria um crescimento óptimo a uma temperatura mesofílica realizaram-se ensaios a 25 °C. Estes ensaios consistiram na quantificação da concentração de ácido tânico (pelo método cromatográfico) no tempo inicial e no tempo final (7 dias) (Figura 16).



**Figura 16.** Evolução da concentração de ácido tânico no ensaio de crescimento da cultura de enriquecimento T 4,7 a 25 °C e a 50 °C.

A cultura de enriquecimento T 4,7 inoculada a 25 °C apresentava uma concentração inicial de biomassa correspondente a uma densidade óptica a 610 nm de aproximadamente

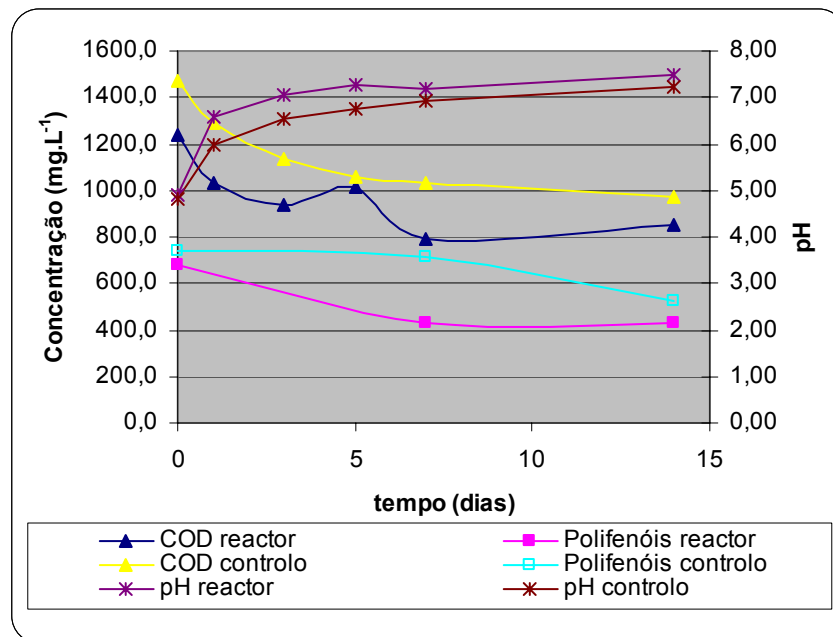
0,08, de modo a ter a garantia de que existia inóculo suficiente para a degradação do ácido tânico. Embora a cultura de enriquecimento T 4,7 não tenha apresentado crescimento a 25 °C, quando se analisam os sobrenadantes da cultura de enriquecimento verificou-se uma redução de 41,7 % da concentração de ácido tânico, sendo de 15,2 % no controlo abiótico. Assim, embora a cultura de enriquecimento T 4,7 consiga degradar ácido tânico a 25 °C, a sua capacidade é muito superior quando o crescimento ocorre a 50 °C e em nenhum dos casos atinge a da cultura de enriquecimento M 4,7. Estes resultados demonstram que os membros das culturas termofílicas não apresentam crescimento óptico na gama de temperaturas mesofílicas.

### **3.6. Biodegradação de polifenóis de água de cozedura de cortiça em reactor fechado pelas culturas de enriquecimento M 7,2 e M 4,7**

As culturas de enriquecimento obtidas a partir da água de cozedura de cortiça apresentam capacidade de degradar ácido tânico em meio mineral, sendo que as culturas mesofílicas são muito mais eficientes na remoção de polifenóis, conseguindo atingir valores abaixo do limite de detecção do método colorimétrico usado. Por outro lado, as águas de cozedura de cortiça são complexas misturas de extractos vegetais, que apresentam uma grande variedade de polifenóis. Estes factos encaminham para a necessidade de avaliar a capacidade degradativa das culturas de enriquecimento em condições próximas das reais, ou seja, em água de cozedura de cortiça.

Como estes ensaios não foram realizados em condições assépticas, efectuaram-se controlos que consistiam em água de cozedura de cortiça ou em água de cozedura de cortiça corrigida com cloreto de amónio e di-hidrogenofosfato de sódio, mas sem adição de inóculo.

Os perfis de degradação de polifenóis da água de cozedura de cortiça pelas culturas de enriquecimento mesofílicas, bem como a redução de COD e variação de pH, são apresentados nas Figuras 17 e 18 (dados experimentais no Anexo B).



**Figura 17.** Variação dos parâmetros polifenóis, COD e pH em água de cozedura de cortiça inoculada com a cultura de enriquecimento M 7,2 e no respectivo controlo não inoculado.

Analisando a Figura 17 referente à degradação de polifenóis pela cultura de enriquecimento M 7,2 verifica-se que ao fim de sete dias existiu uma remoção de polifenóis de 36,6 %, sendo que no controlo abiótico apenas houve uma variação de 3,4 %. Ao fim dos catorze dias de incubação, a percentagem de remoção de polifenóis no reactor é de 36,8 %, semelhante à obtida ao sétimo dia. O controlo ao décimo quarto dia apresenta uma redução de 28,8 % relativamente à concentração inicial de polifenóis, que pode ter-se ficado a dever à auto-oxidação dos polifenóis a pH's na gama de neutralidade, ou à actividade bacteriana ou enzimática eventualmente existente na água testada.

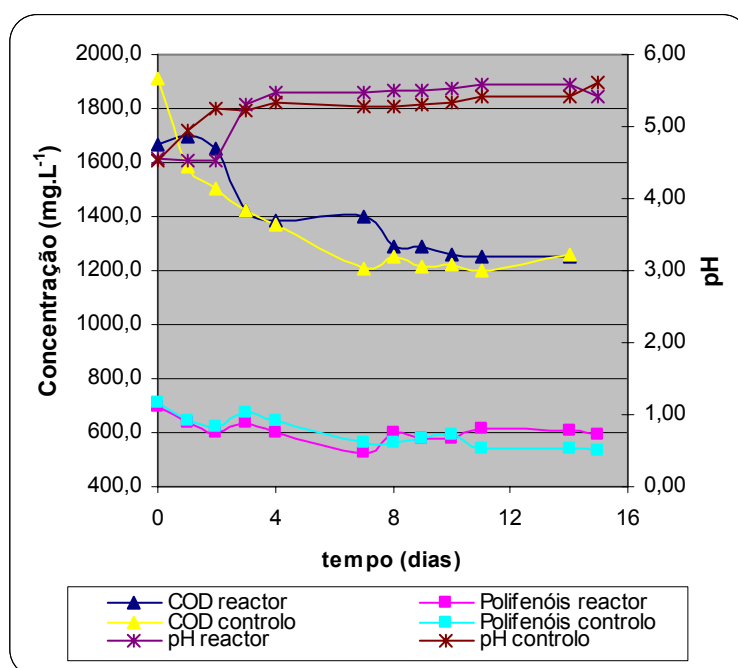
Após o sétimo dia não existia remoção aparente de polifenóis no reactor o que pode ter ficado a dever-se ao facto de a cultura de enriquecimento M 7,2 não conseguir prosseguir a biodegradação por ter sido inibida por metabolitos formados ou por não ter capacidade para metabolizar os compostos remanescentes. Além disso é importante referir que como o método de Folin-Denis apenas quantifica os polifenóis totais, o processo de degradação poderá ter continuado a ocorrer, embora não tenha havido diminuição do número de grupos funcionais.

Relativamente à concentração de COD, o controlo apresentou uma concentração inicial superior à do reactor inoculado com a cultura de enriquecimento M 7,2. Esta discrepância pode estar associada ao facto de a água de cozedura de cortiça ter sofrido

diluição quando inoculada com a cultura de enriquecimento. Ambas as curvas apresentaram a mesma tendência e uma percentagem de remoção de carbono orgânico dissolvido semelhante que rondou os 30 % no final da experiência.

As curvas de variação de pH do reactor inoculado e do controlo abiótico apresentaram a mesma tendência. O valor inicial de pH foi de 4,8, subindo até estabilizar por volta dos 7,2.

Fazendo uma análise global a estes resultados verificou-se que no fim dos catorze dias de ensaio a cultura de enriquecimento, não apresentou diferenças relevantes relativamente ao controlo no que refere à remoção de polifenóis e de carbono orgânico. A baixa capacidade biodegradativa da cultura de enriquecimento poderá estar relacionada com limitações de crescimento e/ou de actividade degradativa, devido à ausência de factores promotores ou à acumulação de inibidores importantes para a multiplicação celular ou para a actividade enzimática.



**Figura 18.** Perfil de degradação de polifenóis, remoção de COD e variação de pH em água de cozedura de cortiça corrigida e inoculada com a cultura de enriquecimento M 4,7.

Assim, considerou-se que a correcção da água de cozedura de cortiça poderia auxiliar a degradação dos polifenóis. A água de cozedura de cortiça foi suplementada com cloreto de amónio (NH<sub>4</sub>Cl) 0,25 g.L<sup>-1</sup> e di-hidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 20 mM. Para além de suplementar a água substituiu-se a cultura de enriquecimento M 7,2 pela M 4,7 para poder manter o pH a valores suficientemente baixos de modo a evitar a oxidação dos polifenóis.

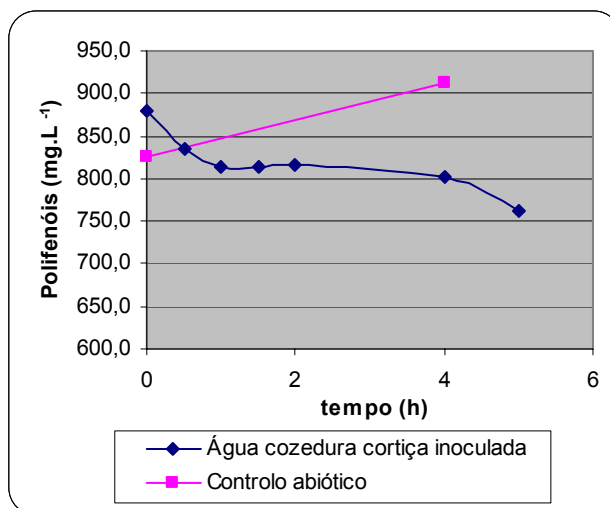
Por análise da Figura 18 constata-se que a correcção efectuada não melhorou os resultados, já que a cultura de enriquecimento M 4,7 não conseguiu degradar os polifenóis nem remover o carbono orgânico da água de cozedura de cortiça. As curvas do perfil de degradação de polifenóis do reactor inoculado e do controlo estão praticamente sobrepostas. As curvas de remoção de COD, no reactor inoculado e no controlo, são muito semelhantes. As curvas de variação de pH do reactor inoculado e do controlo abiótico apresentam a mesma tendência. O valor de pH inicial foi de 4,5, subindo até estabilizar por volta dos 5,5.

Sendo assim, não foi suficiente suplementar a água de cozedura de cortiça com os referidos sais. Eventualmente, outro tipo de correcção seria necessária. Outra hipótese é que a água de cozedura de cortiça pode apresentar compostos que inibem a degradação dos polifenóis pelas culturas de enriquecimento e, nesse caso será necessário realizar um pré-tratamento da água de cozedura de cortiça para melhorar a eficiência do processo de degradação.

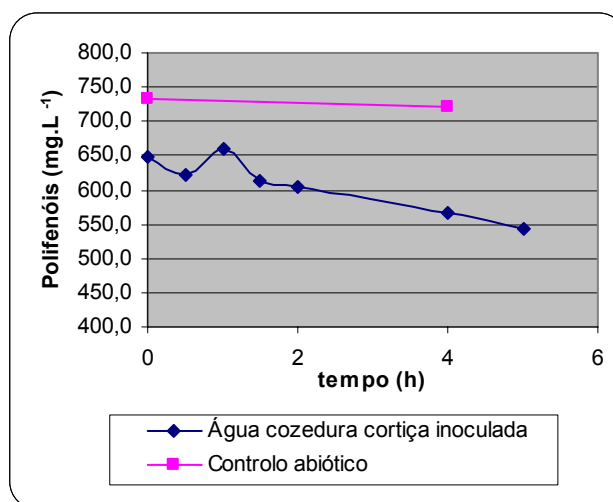
Embora o tratamento biológico de águas residuais com elevada concentração de polifenóis seja prática corrente, no caso das águas de cozedura de cortiça apenas é referenciado por Mendonça *et al.* (2004). Segundo estes autores, a biodegradação destes efluentes pode ser realizada por várias estirpes de fungos das espécies *Sporothrix* sp., *Trichoderma koningii*, *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, *Fusarium flocciferum* e *Phanerochaete chrysosporium*. Não se conhecem estudos sobre o tratamento deste tipo de águas usando estirpes bacterianas.

### **3.7. Ensaios de degradação de polifenóis por *resting cells* das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7**

Tendo em consideração que a inibição do crescimento bacteriano pode estar a impedir a degradação de polifenóis, testou-se a capacidade das culturas de enriquecimento obtidas pH 4,7 para degradar polifenóis em água de cozedura de cortiça, utilizando uma concentração de biomassa muito superior, que promovesse a actividade celular, 4,9 g células.L<sup>-1</sup> e 1,6 g células.L<sup>-1</sup> para as culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7, respectivamente. Na Figura 19 e 20 (dados experimentais no Anexo C) apresentam-se os perfis de degradação dos polifenóis em água de cozedura de cortiça resultantes dos ensaios de *resting cells*.



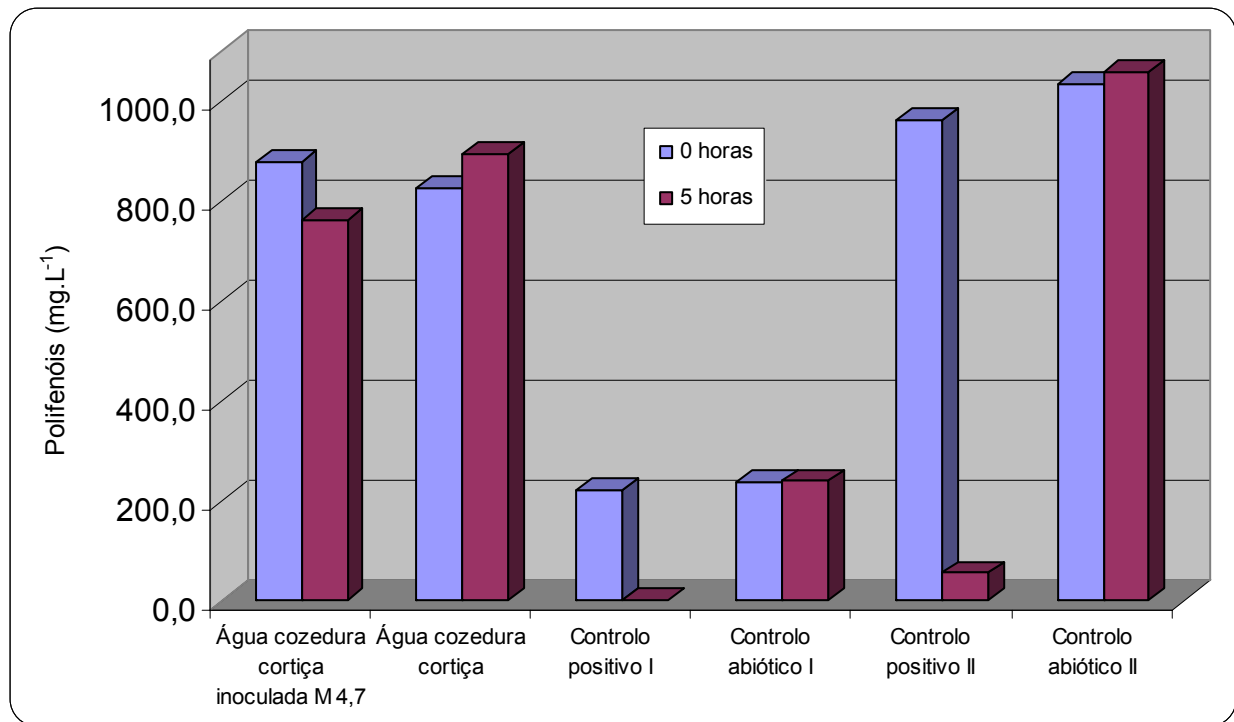
**Figura 19.** Ensaio com *resting cells* da cultura mesofílica M 4,7 em água de cozedura de cortiça.



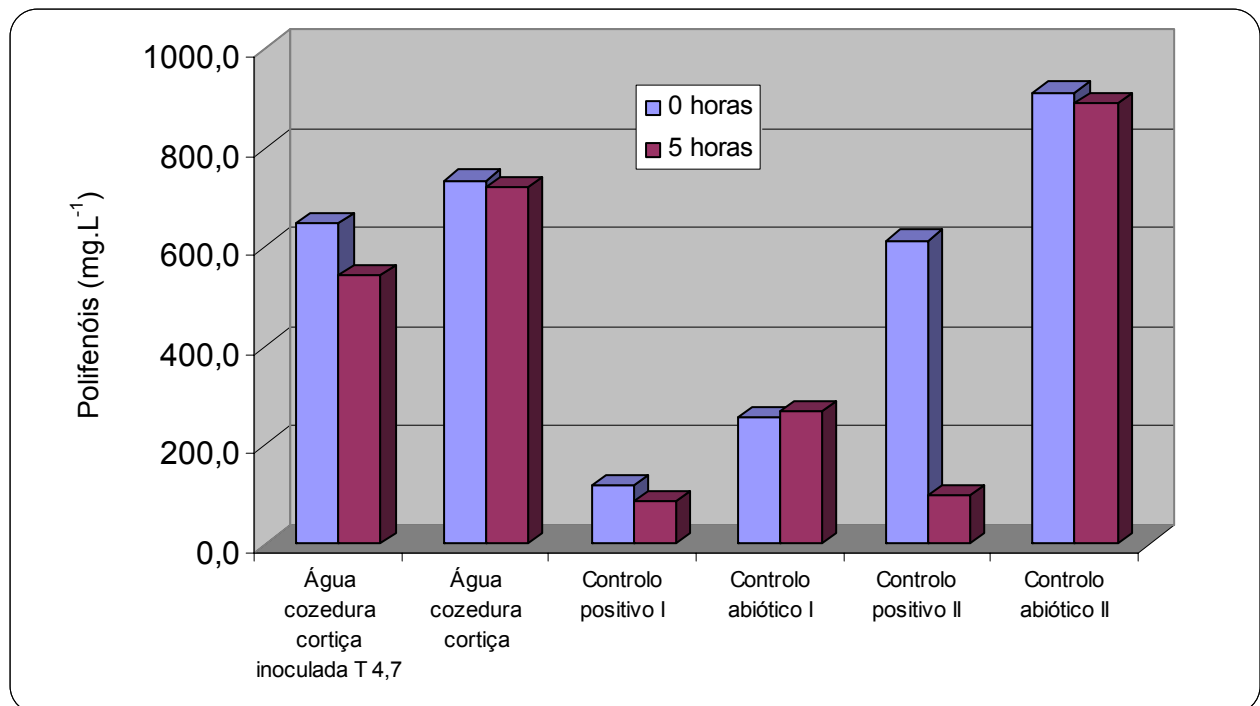
**Figura 20.** Ensaio com *resting cells* da cultura termofílica T 4,7 em água de cozedura de cortiça.

Analisando os resultados dos ensaios de *resting cells* em água de cozedura de cortiça verifica-se que ao fim de 5 horas de incubação a percentagem de remoção média de polifenóis foi de 13,5 % para a cultura M 4,7 e de 16,1 % para a cultura T 4,7.

Atendendo ao facto de a água de cozedura de cortiça apresentar concentrações elevadas de polifenóis ( $600\text{-}1000\text{ mg.L}^{-1}$ ) e de as culturas terem sido enriquecidas com concentrações cerca de quatro a cinco vezes inferiores, testou-se se concentrações mais elevadas de polifenóis poderiam ser inibitórias. Para o efeito prepararam-se dois controlos positivos que consistiam em inocular as culturas em tampão fosfato com uma concentração  $200\text{ mg.L}^{-1}$  (Controlo I) e  $1000\text{ mg.L}^{-1}$  (Controlo II) de ácido tânico (Figuras 21 e 22).



**Figura 21.** Ensaio com *resting cells* da cultura de enriquecimento M 4,7 a 25 °C (água de cozedura de cortiça e controlos positivos).



**Figura 22.** Ensaio com *resting cells* da cultura de enriquecimento T 4,7 a 50 °C (água de cozedura de cortiça e controlos positivos).

Observando as Figuras 21 e 22 relativas aos controlos positivos constata-se que a cultura de enriquecimento M 4,7, ao fim de 5 horas, conseguiu remover, abaixo do limite de detecção, os polifenóis totais do controlo positivo que apresenta uma concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup> e 94,3 % do tampão fosfato com 1000 mg.L<sup>-1</sup>. A cultura de enriquecimento T 4,7 apenas removeu 28,5 % da concentração de polifenóis totais do controlo positivo com 200 mg.L<sup>-1</sup>. Seria de prever que a percentagem de remoção de polifenóis totais fosse próxima da obtida para o crescimento da cultura em meio mineral com 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico como fonte de carbono e energia, aproximadamente 60 %. A concentração inicial de polifenóis no controlo positivo era aproximadamente metade da do controlo abiótico, no entanto ela deveria ser a mesma. Esta variação pode ter ficado a dever-se à existência de muita biomassa que logo que foi adicionada ao meio iniciou a degradação dos polifenóis, sendo que o tempo necessário para retirar a amostra foi suficiente para haver degradação. Considerando que a concentração inicial de polifenóis totais no controlo positivo era a mesma que no controlo abiótico, ou seja, de 255 mg.L<sup>-1</sup>, a percentagem de remoção de polifenóis totais foi de 66,7 %, o que está de acordo com o que se constata quando crescemos a cultura T 4,7 em meio mineral. Relativamente ao controlo positivo com 1000 mg.L<sup>-1</sup> de polifenóis totais, a cultura de enriquecimento T 4,7 conseguiu remover 89,3 % deste composto ao fim de 5 horas. Este valor encontra-se muito próximo da percentagem de remoção atingida pela cultura de enriquecimento mesofílica M 4,7. Independente da concentração inicial, 200 ou 1000 mg.L<sup>-1</sup>, os polifenóis remanescentes na cultura T 4,7 rondaram sempre os 80 mg.L<sup>-1</sup>.

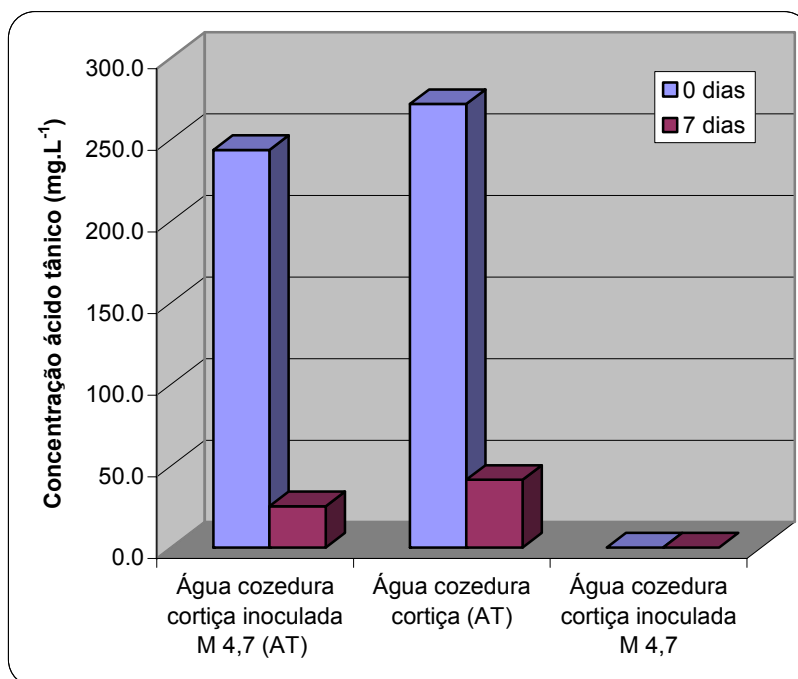
Da análise global destes resultados conclui-se que a percentagem de remoção de polifenóis da água de cozedura de cortiça pelas culturas de enriquecimento mesofílica M 4,7 e termofílica T 4,7 é reduzida e apresenta um valor semelhante, 16,9 % e 16,1 % respectivamente. No entanto, verificou-se que uma concentração elevada de ácido tânico 1000 mg.L<sup>-1</sup> não inibe a biodegradação deste composto. Pode-se então concluir que as culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 não conseguem degradar os polifenóis presentes na água de cozedura de cortiça ou que esses mesmos polifenóis inibem a actividade das culturas.

Para verificar se existem compostos presentes na água de cozedura de cortiça que inibem o crescimento da cultura de enriquecimento M 4,7 (a mais eficiente em termos de remoção de ácido tânico) ou se esta cultura não os consegue degradar, avaliou-se a sua capacidade para degradar ácido tânico e ácido gálico na água.

### **3.8. Avaliação da capacidade de degradação de ácido tânico e de ácido gálico em água de cozedura de cortiça pela cultura de enriquecimento M 4,7**

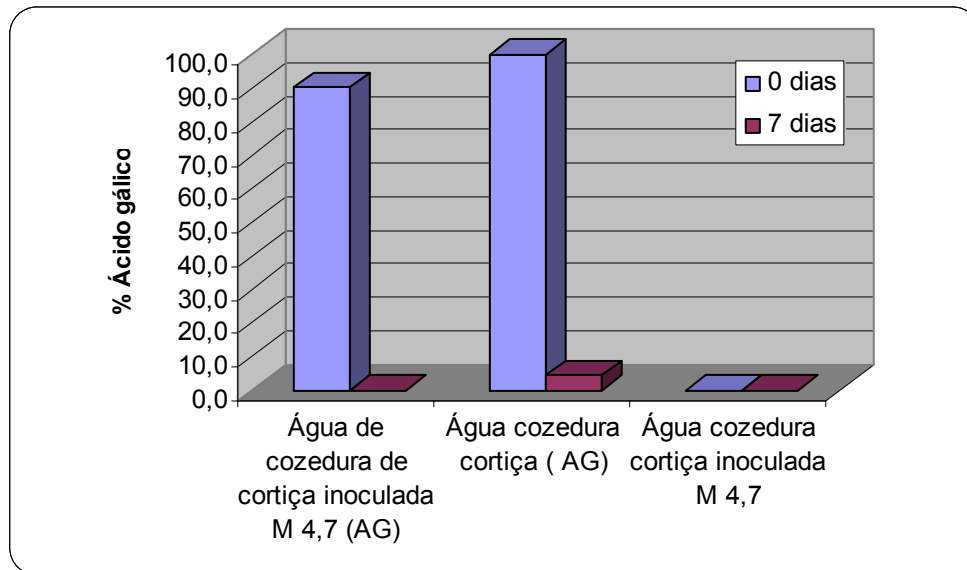
Atendendo à fraca capacidade que a cultura M 4,7 demonstrou para degradar os polifenóis da água de cozedura de cortiça, quer em crescimento ou em *resting cells*, optou-se por testar se havia inibição da actividade degradativa promovida por componentes da água. Com este intuito, suplementou-se água de cozedura de cortiça com ácido tânico e gálico e seguiu-se a sua degradação.

A análise da água de cozedura de cortiça por HPLC permitiu-nos constatar que estas apresentam concentrações reduzidas de ácido tânico e de ácido gálico (inferiores ao limite de detecção do HPLC) pelo que foi necessário adicionar-lhes estes compostos numa concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Não se operou em condições assépticas uma vez que não se conseguiu esterilizar a água por filtração através de membranas com 0,22 µm de porosidade e não se pôde esterilizar por autoclavagem pois, segundo Haslam (1966), a temperaturas superiores a 60 °C o calor altera os polifenóis, originando a sua polimerização. Nestas condições de operação a água de cozedura de cortiça poderia conter microrganismos autóctones que influenciassem o processo de biodegradação, pelo que se realizaram controlos não inoculados. Estes consistiam em água de cozedura de cortiça suplementada com ácido tânico ou com ácido gálico mas sem ser inoculada. Realizou-se ainda um controlo biótico que continha apenas água de cozedura de cortiça sem suplementos e inoculado com a cultura de enriquecimento M 4,7. Este controlo permitiu verificar se a cultura era capaz de degradar algum composto que não fosse detectado pelo método de Folin-Denis. As amostras resultantes do estudo de degradação de ácido tânico e de ácido gálico foram analisadas por HPLC e os resultados obtidos encontram-se apresentados nas Figuras 23 e 24, respectivamente.



**Figura 23.** Degradação de ácido tânico em água de cozedura de cortiça pela cultura de enriquecimento M 4,7 (AT- suplementada com ácido tânico).

Analisando a Figura 23 relativa à degradação biológica de ácido tânico de água de cozedura de cortiça pela cultura de enriquecimento mesofílica isolada a pH 4,7 verifica-se uma redução de 89,6 % no final da experiência. No entanto o controlo não inoculado também sofre uma redução de 84,7 %. Perante estes resultados não se pode concluir que a cultura de enriquecimento mesofílica pH 4,7 seja capaz de degradar ácido tânico de água de cozedura de cortiça. Provavelmente a microflora natural da água de cozedura de cortiça foi também capaz de degradar ácido tânico e de competir com a cultura de enriquecimento. Não se pôde constatar se de facto isto acontecia, uma vez que não foi possível esterilizar a água de cozedura de cortiça. Outra explicação para a redução de ácido tânico no controlo não inoculado pode ser a formação de complexos do ácido tânico com compostos presentes na água de cozedura de cortiça. Para verificar esta hipótese, efectuaram-se controlos não inoculados com glucose, que no fim do período de incubação apresentaram uma redução de COD semelhante aos controlos não inoculados com ácido tânico. Sendo assim, nada se pôde concluir quanto à formação de complexos na água de cozedura de cortiça.



**Figura 24.** Degradação de ácido gálico em água de cozedura de cortiça pela cultura de enriquecimento M 4,7 (AG- suplementada com ácido gálico).

A redução de ácido gálico foi praticamente total, quer na água inoculada, quer no controlo. Tal pode dever-se ao facto de o ácido gálico ser fotossensível e degradar-se ao longo do tempo de incubação ou à microflora natural da água de cozedura de cortiça que também consegue degradar este composto. Perante estes resultados não se pode concluir que a cultura de enriquecimento M 4,7 seja capaz de degradar ácido gálico adicionado à água de cozedura de cortiça.

A água de cozedura de cortiça não contém ácido tânico, embora as culturas de enriquecimento mesofílicas e termofílicas sejam capazes de o degradar. Por outro lado, estas culturas não conseguem degradar os polifenóis presentes na água de cozedura, pelo que não podem ser usadas para o tratamento destes resíduos.

## CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

### 4.1. Conclusões

Para obter populações microbianas com capacidade para remover polifenóis de águas de cozedura de cortiça realizaram-se enriquecimentos dessa água com ácido tânico a 25 e 50 °C e pH 4,7 e 7,2. Destes enriquecimentos obtiveram-se 3 culturas de enriquecimento designadas de M 4,7; M 7,2 e T 4,7.

A cultura de enriquecimento M 7,2 era composta por cinco isolados bacterianos identificados como pertencentes às espécies *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae* (2 isolados), *Pseudomonas fluorescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*.

A cultura de enriquecimento M 4,7 era composta por dois isolados bacterianos identificados como pertencentes às espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Burkholderia tropicalis*.

A cultura de enriquecimento T 4,7 era também constituída por dois isolados bacterianos identificados como pertencentes às espécies “*Bacillus acidogenesis*” e *Bacillus licheniformis*.

Uma vez que a pH 7,2 os polifenóis oxidavam o meio de cultura, o que não permitia medir o crescimento de biomassa, os estudos de degradação de ácido tânico (composto modelo) foram apenas realizados para as culturas de enriquecimento obtidas a pH 4,7. As culturas termofílica e mesofílica obtidas a pH 4,7 eram capazes de degradar o ácido tânico usando-o como fonte de carbono e energia, sendo que a cultura mesofílica apresenta uma taxa máxima de crescimento e uma velocidade específica de degradação de polifenóis [ $0,224 \text{ h}^{-1}$  e  $1,4 \text{ mg polifenóis.g}^{-1}\text{células. h}^{-1}$ ] superiores às da cultura de enriquecimento T 4,7 [ $0,055 \text{ h}^{-1}$  e  $1,2 \text{ mg polifenóis.g}^{-1}\text{células. h}^{-1}$ ].

Dos estudos das cinéticas de crescimento e degradação de ácido tânico concluiu-se que a cultura de enriquecimento M 4,7 cresce e remove mais rapidamente os polifenóis do que a cultura de enriquecimento T 4,7. Por outro lado para degradar a mesma quantidade de substrato, a cultura de enriquecimento T 4,7 produz menor quantidade de biomassa.

A cultura de enriquecimento M 4,7 apresenta ainda maior redução de COD do que a cultura de enriquecimento T 4,7. A primeira consegue remover 77,4 % de carbono orgânico dissolvido, enquanto que a segunda apenas remove 52,3 %.

A simultânea redução de polifenóis e de carbono orgânico dissolvido revela que as culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7 são capazes de degradar ácido tânico quando crescidas em meio mineral com 200 mg.L<sup>-1</sup> deste composto.

Os estudos de versatilidade nutricional das culturas de enriquecimento em compostos fenólicos mostraram que a cultura de enriquecimento M 4,7 é mais versátil do que a cultura de enriquecimento T 4,7. Apenas a cultura M 4,7 consegue crescer num dos principais metabolitos resultantes da degradação biológica do ácido tânico, o ácido gálico. Este resultado explica o facto da cultura M 4,7 ser mais eficiente na degradação de ácido tânico. A cultura M 4,7 consegue degradar o ácido tânico em ácido gálico e provavelmente transformar este em pirogalol, sendo que a cultura T 4,7 termina processo após o ácido tânico passar a ácido gálico. Se assim é, então podemos concluir que a cultura M 4,7 consegue mineralizar o ácido tânico, enquanto a cultura T 4,7 apenas o degrada parcialmente.

Já no caso dos isolados, o que apresenta maior versatilidade nutricional em relação aos compostos fenólicos testados é o M9 (*Burkholderia tropicalis*), sendo que os isolados termofílicos M12 e M13 ("*Bacillus acidogenesis*" e *Bacillus licheniformis*, respectivamente) apresentam baixa versatilidade. Apenas os isolados mesofílicos M9 e M10 (*Klebsiella pneumoniae*) conseguem degradar um dos principais metabolitos de degradação de ácido tânico, o ácido gálico.

Relativamente a outras fontes de carbono, nomeadamente, compostos orgânicos, aminoácidos e bases, o isolado M10 (*Klebsiella pneumoniae*) é o mais versátil, sendo que o isolado M12 ("*Bacillus acidogenesis*") nas condições testadas não conseguiu metabolizar nenhum dos compostos. Sendo assim, os isolados mesofílicos apresentam maior capacidade para degradar outros compostos que existam nas águas de cozedura de cortiça.

Dos estudos de degradação de polifenóis em água de cozedura de cortiça verifica-se que as culturas mesofílicas M 7,2 e M 4,7 não os conseguem remover nas condições testadas.

## 4.2. Trabalho futuro

Os resultados obtidos permitiram concluir que as culturas de enriquecimento isoladas de acordo com o procedimento descrito na secção 2.5. eram bastante eficientes a degradar ácido tânico, mas aparentemente ineficazes para tratar água de cozedura de cortiça. Assim sugere-se que num trabalho futuro sejam realizados novos enriquecimentos utilizando como nutriente, não um composto modelo, como foi o caso do ácido tânico, mas a própria água de cozedura de cortiça.

Utilizando as culturas obtidas poderia ainda ser vantajoso utilizar métodos químicos que permitam aumentar a biodegradabilidade dos polifenóis e eventualmente melhorar a eficiência do tratamento biológico. Um dos pré-tratamentos já testados para água de cozedura de cortiça é a oxidação química com reagente de Fenton. Segundo Guedes *et al.* (2003), com este tratamento consegue-se aumentar a biodegradabilidade destas águas de 0,27 para 0,63. A utilização de um pré-tratamento por oxidação química seguido de tratamento biológico poderá aumentar a eficiência do tratamento comparativamente com a eficiência de cada um destes processos individualmente. Esta será uma abordagem a testar proximamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acamovic, T., C. S. Stewart. 1999. Plant phenolic compounds and gastrointestinal microorganisms. Proceedings of the International Workshop on tannins in animal and human nutrition, Adelaide, Australia.
- Akiyama, H., K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono e K. Iwatsuki. 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, p. 487-491.
- Álvarez-Rodríguez, M. L., C. Belloch, M. Villa, F. Uruburu, G. Larriba e J. J. R. Coque. 2003. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. FEMS Microbiology Letters, 220, p. 49-55.
- AOAC. 1984. Official methods of analysis (14<sup>a</sup>. edição). Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA.
- Associação Empresarial Portuguesa. 2000. Indústria da Cortiça – Manual de Boas Práticas Ambientais e Energéticas.
- Aoki, K., R. Shinke e H. Nishira. 1976 (a). Purification and some properties of yeast tannase. Agricultural and Biological Chemistry, 40, p. 79-85.
- Aoki, K., R. Shinke e H. Nishira. 1976 (b). Chemical composition and molecular weight of yeast tannase. Agricultural and Biological Chemistry, 40, p. 297-302.
- Barreiros, L., B. Nogales, C. Manaia, A. Ferreira, D. Pieper, M. Reis, O. Nunes. 2003. A novel pathway for mineralization on the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. Environmental Microbiology, 5 (10), p. 944-953.

- Benitez, F. J., J. L. Acero, J. Garcia, A. I. Leal. 2003. Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research*, 37, p. 4081-4090.
- Bhat, T. k., B. Singh e O. P. Sharma. 1998. Microbial degradation of tannins- a current perspective. *Biodegradation*, 9, p. 343-357.
- Bhat, T. K., H. P. S. Makkar e B. Singh. 1997. Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger van* Tieghem MTCC 2425. *Letters Applied Microbiology*, 25, p. 22-23.
- Brenner, D. J. 1984. Family I. Enterobacteriaceae Rahn 1937, (Effective publication: Nom. Fam. Cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958, 73; Ewing, Farmer and Brenner 1980, 674; Judicial Comission 1981, 104): *In* Sneath, P. H.A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.) *Bergey's manual of systematics bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Brune, A. e B. Schink. 1990. Pyrogallol conversion and other hydroxyl-transfer reactions catalyzed by cell extracts of *Pelobacter acidigallici*. *Journal of Bacteriology*, 172 (2), p. 1070-1076.
- Chun, H. e W. Yizong. 1999. Decolorization and biodegradability of photocatalytic treated azo dyes and wool textile wastewater. *Chemosphere*, 39 (12), p. 2107-2115.
- Chung, K., T. Y. Wong, C. Wei, Y. Huange Y. Lin. 1998. Tannins and human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, p. 421-424.
- Civolani, C., P. Barghini, A. R. Roncetti, M. Ruzzi e A. Schiesser. 2000. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6), p. 2311-2317.

- Clesceri, L. S., A. E. Greenberg, A. D. Eaton. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20ª. Edição. American Public Health Association.
- Coenye, T. e P. Vandamme. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology*, 5 (9), p. 719-729.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), p. 564-582.
- Cruz, L., E. Souza, O. Weber, J. Baldani, J. Döbereiner e F. Pedrosa. 2001. 16 S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria from banana and pineapple. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5), p. 2375-2379.
- Cunha-Santino, M. B., J. L. Bianchini e L. E. Serrano. 2002. Aerobic and anaerobic degradation of tannic acid on water samples from Monjolinho reservoir (São Carlos, SP, Brasil). *Brazilian Journal of Biology*, 62 (4A), p.585-590.
- Dangles, O., G. Fargeix e C. Dufour. 2000. Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3', 4', 7-trihydroxyflavylium ion. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions*, 2, 1653-1663.
- Davies, L. T. 2003. Valorização da água ruça como fertilizante orgânico por recurso a polímeros absorventes. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.
- Darveau, R. e R. Hancock. 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. p. 831-838. In Gerhardt, P., R. Murray, W. Wood e N. Krieg. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, U.S.A.

- Deschamps, A. M., G. Mohudeau, M. Conti e J.M. Lebeault. 1980. Bacterial degrading tannic acid and related compounds. *Journal of Fermentation Technology*, 61, p.55-59.
- Deschamps, A. M. 1989. Microbial degrading of tannins and related compounds. American Chemical Society, Washington DC, p. 559-566.
- Di Gioia, D., F. Fava, L.Bertin e L. Marchetti. 2001. Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two mixed aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, p. 619-626.
- Easterbrook, K. 1989. Spinate-bacteria. p. 1991-1993. *In* Gerhardt, P., R. Murray, W. Wood e N. Krieg. *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, U.S.A.
- Ettayebi, K., F. Errachidi, L. Jamai, M. Tahri-Jouti, K. Sendide e M. Ettayebi. 2003. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiology Letters*, 223, p. 215-219.
- Flouri, F., Pasetti, L., Galli, E. 1996. Fertility-promotion metabolites produced by *Azotobacter vinelandii* grown on olive mill wastewaters. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38, p. 165-167.
- Galvez, J. M. G., B. Riedl e A. H. Conner. 1997. Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung*, 51, p. 235-243.
- Ganga, P.S., S.C. Nandy e M. Santappa. 1977. Effect of environmental factors on production of fungal tannase. *Leather Science*, 24, p. 8-16.
- Guedes, A. M. F. M., L. M. P. Madeira, R. A. R. Boaventura e C. A. V. Costa. 2003. Fenton oxidation of cork cooking wastewater- overall kinetic analysis. *Water Research*, 37, p. 3061-3069.

- Haddock, J. e J. Ferry. 1989. Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxireducens* G-41. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (8), p. 4423-4427.
- Haslam, E. e R.J.N. Stangroom. 1966. The esterase and depside activities of the tannase. *Biochemistry Journal*, 99, p. 28-31.
- Hagerman. A. E., C. T. Robbins, Y. Weerasuriya, T. C. Wilson e C. Mcarthur. 1992. *Journal of Range Management*, 45, p. 57-62.
- Hooper, W. e A. Mahadevan. 1997. Degradation of catechin by *Bradyrhizobium japonicum*. *Biodegradation*, 8, p. 159-165.
- Isenburg, J., D. Simionescu e N. Vyavahau. 2004. Elastin stabilization in cardiovascular implants improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. *Biomaterials*, 25, p. 3293-3302.
- Kar, B., R. Banerjee e B. C. Bhattacharyya. 1999. Microbial production of gallic acid by modified solid state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23, p. 173-177.
- King, R. A. 1999. The role of polyphenols in human health. CSIRO-Human Nutrition, Adelaide, Australia, p. 85-91.
- Kumar, R. A., P. Gunasekaran e M. Lakshmanan. 1999. Biodegradation of tannic acid by *Citrobacter freundii* isolated from tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology*, 39, p. 161-168.
- Lagemaat, J. 2004. Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production. *Process Biochemistry*, 87 (7), p. 924-929.

- Lewis, J.A. e R.L. Starkey. 1969. Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Science*, 107, p. 235-241.
- Ma, L., M. Nakazono, Y. Ohba e K. Zaitso. 2002. Determination of polyphenols with HPLC-sensitized chemiluminescence. *Analytical Sciences*, 18, p. 1163-1165.
- Makkar, H. P. S. e K. Becker. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? *Agroforestry Systems*, 40, p. 59-68.
- Mämmelä, P., H. Savolainen, L. Lindroos, J. Kangas e T. Vartiainen. 2000. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatography A*, 891, p. 75-83.
- Marienfeld, C., L. Tadlock, Y. Yamagiwa e T. Patel. 2003. Inhibition of cholangiocarcinoma growth by tannic acid. *Hepatology*, 37, p. 1097-1104.
- Mendonça, E., A. Martins e A. M. Anselmo. 2004. Biodegradation of natural phenolic compounds as single and mixed substrates by *Fusarium flocciferum*. *Environmental Biotechnology*, 7 (1), p. 30-37.
- Miller, J. e J. Miller. 2000. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Pearson Edition, p.107-147.
- Minhalma, M. e M. N. Pinho. 2001. Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22-23, p. 479-488.
- Mokoboki, H. K., L. R. Ndlovu e K. K. Ayisi. 2002. Chemical and physical parameters of forage legume species introduced in the Capricorn region of Limpopo province, South Africa. *South African Journal of Animal Science*, 32 (4), p. 247-255.

- Mondal, K. e B. Pati. 2000. Studies on extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR. *Journal of Basic Microbiology*. 40 (4), p. 223-232.
- Monje-Ramirez, I., M. Velásquez. 2004. Removal and transformation of recalcitrant organic matter from stabilized saline landfill leachates by coagulation-ozonation coupling processes. *Water Research*, 38, p. 2359-2367.
- Naczki, M. e F. Shahidi. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, p. 95-111.
- Nelson, K., P. Schofield, S. Zinder. 1995. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, p. 3293-3298.
- Nishitani, Y. e R. Osawa. 2003. A novel colorimetric method to quantify tannase activity of viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 54, p. 281-284.
- Nogales, B., E.R.B. Moore, E. Llobet-Brossa, R. Rossello-Mora, R. Amann e K.N. Timmis. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, p. 1874-1884.
- Norton, B. W. 1999. The significance of tannins in tropical animal production. *Internacional ACIAR Workshop*, Adelaide, Australia p.14-22.
- Nozella, E. F. 2001. Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Dissertação de Mestrado. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.
- O'Donovan, L. e J. D. Brooker. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147, p. 1025-1033.

- Orskov, I. 1984. Genus V. *Klebsiella* Trevisan 1885, 105<sup>AL</sup>, (Effective publication: Schroeter 1886, Trevisan 1887, 94) p. 461-465. *In* Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.) *Bergey's manual of systematics bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Otuk, G. e A.M. Deschamps. 1983. Degradation of condensed tannin by several types of yeasts. *Mycopathologia*, 83, p.17-111.
- Peng, X., N. Misawa e Shigeaki Harayama. 2002. Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric and ferulic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3), p. 1417-1427.
- Peres, J. A., J. B. Heredia, J. R. Domínguez. 2004. Integrated Fenton's reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials B*, 107, p. 115-121.
- Reed, J. D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73, p. 1516-1528.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, p. 3875-3883.
- Schink, B., B. Philipp e J. Müller. 2000. Anaerobic degradation of phenolic compounds. *Naturwissenschaften*, 87, p. 12-23.
- Schoefer, L., R. Mohan, A. Schwiertz, A. Braune e M. Blaut. 2003. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10), p. 5849-5854.
- Seth, M., C. Subhash. 2000. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awanori*- optimisation of process parameters. *Process Biochemistry*, 36, p. 39-40.

- Silva, C. A., L. M. Madeira, R. A. Boaventura e C. A. Costa. 2004. Photo-oxidation of cork manufacturing wastewater. *Chemosphere*, 55, p. 19-26.
- Simão, A. e L. Marcelino. 2001. Tratamento não biológico de águas de cozedura de cortiça. Trabalho de Fim de Curso. Instituto Superior Técnico de Lisboa.
- Smibert, R. e N. Krieg. 1981. General characterization. p. 411-442. *In* Gerhardt, P., R. Murray, R. Costilow, E. Nester, W. Wood, N. Krieg e G. Phillips. *Manual methods for general microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Smith, A. H., J. A. Imlay e R.I. Mackie. 2003. Increasing the oxidative stress response allows *Escherichia coli* to overcome inhibitory effects of condensed tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), p. 3406-3411.
- Spencer, C.M., Y. Cai, R. Martin, S.H. Gaffney, P.N. Goulding, D. Magnolato, T. H. Lilley e E. Haslam. 1988. Polyphenol complexation – some thoughts and observations. *Phytochemistry*, 27, p. 2397-2409.
- Sterbová, D., D. Matejick, J. Vlcek, V. Kubán. 2004. Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant material. *Analytica Chimica Acta*, 513, p. 435-444.
- Szafranski, B. M. 1996. *The Merck Index of chemicals and drugs*. 12<sup>a</sup>.edição. Merck & CO., Inc.
- Takechi, M., Y. Tanaka, M. Takehara, G. Noneka, I. Nishioka. 1985. Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochemistry*, 24, p. 2245-2250.
- Turley, D. J., M. T. Kelly e M. R. Smyth. 1990. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of tanning capacity of tannic acid batches used in the manufacture of pregnancy testing kits. *Journal of Chromatography*, 513, p. 263-269.

- Vennat, B., A. Pourrat e H. Pourrat. 1986. Production of a depolymerized tannin extract using a strain of *Saccharomyces roxii*. *Journal of Fermentation Technology*, 64, p. 227-232.
- Yu, G., W. Zhu, Z. Yang. 1998. Pretreatment and biodegradability enhancement of DSD-acid manufacturing wastewater. *Chemosphere*, 37 (3), p. 487-494.
- Zheida, M., M. Wieser, T. Yoshida, T. Sugio e T. Nagasawa. 1998. Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12), p. 4743-4747.
- Zhu, J., J. Ng, L. J. Filippich. 1992. Determination of tannic acid and its phenolic metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 577, p. 77-85.

## ANEXO A – Dados experimentais dos perfis de crescimento e degradação das culturas de enriquecimento em ácido tânico

Tabela A1 – Dados experimentais de concentração de biomassa, concentração de ácido tânico e COD para os perfis de crescimento e de degradação da cultura de enriquecimento M 4,7 em meio mineral com 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico.

Tempo (h)	Biomassa (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido tânico (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido tânico CA (mg.L <sup>-1</sup> )	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	COD CA (mg.L <sup>-1</sup> )
0,0	17,5	165,8	167,3	145,8	148,0
2,5	36,4	143,2	146,5	124,3	
4,0	45,3	114,0	142,1	108,9	
5,0	59,3	92,0	143,6	81,0	
6,5	82,2	24,8	161,7	70,8	149,6
9,5	83,7	0,0	154,9	27,5	
21,5	82,9	0,0	157,9	22,4	
46,5	79,7	0,0	154,9	33,0	148,0

Tabela A2 – Dados experimentais de concentração de biomassa, concentração de ácido tânico e COD para os perfis de crescimento e de degradação da cultura de enriquecimento de T 4,7 em meio mineral com 200 mg.L<sup>-1</sup> de ácido tânico.

Tempo (h)	Biomassa (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido tânico (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido tânico CA (mg.L <sup>-1</sup> )	COD (mg.L <sup>-1</sup> )	COD CA (mg.L <sup>-1</sup> )
0,0	3,8	175,6	187,3	152,6	155,2
7,0	4,2	163,2	180,8	149,8	
23,0	3,2	162,5	170,4	151,0	
47,0	3,5	164,2	170,2	139,9	
55,5	4,1	163,1	176,0	149,1	
75,0	4,0	153,2	143,7	145,7	142,6
81,5	7,0	147,7	173,4	130,0	
94,5	12,8	105,6	164,1	109,0	
99,5	14,1	80,2	182,8	85,6	
104,0	14,9	79,2	177,3	86,6	
123,0	13,8	82,0	168,4	83,4	
169,5	10,5	70,5	163,0	72,8	148,7

## ANEXO B – Dados experimentais dos ensaios em reactor fechado com as culturas de enriquecimento M 7,2 e M 4,7

Tabela B1 – Dados experimentais da variação da concentração de polifenóis ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), COD ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e pH em água de cozedura de cortiça inoculada com a cultura de enriquecimento mesofílica isolada a pH 7,2 (R- reactor inoculado; C- reactor não inoculado (controlo)).

tempo (dias)	COD R	Polifenóis R	COD C	Polifenóis C	pH R	pH C
0	1241,8	683,6	1472,4	742,5	4,89	4,81
1	1028,7		1288,7		6,60	5,97
3	936,0		1133,7		7,06	6,53
5	1014,7		1060,7		7,28	6,75
7	788,5	433,6	1029,7	717,1	7,19	6,91
14	854,8	431,9	975,8	528,4	7,50	7,21

Tabela B2 – Dados experimentais da variação da concentração de polifenóis ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), COD ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e pH em água de cozedura de cortiça inoculada com a cultura de enriquecimento mesofílica isolada a pH 4,7 (R- reactor inoculado; C- reactor não inoculado (controlo)).

tempo (dias)	COD R	Polifenóis R	COD C	Polifenóis C	pH R	pH C
0	1665,6	696,9	1914,2	710,9	4,55	4,53
1	1697,2	639,9	1587,0	640,8	4,53	4,94
2	1652,2	596,9	1502,2	621,1	4,52	5,24
3	1422,0	639,0	1424,2	671,7	5,30	5,21
4	1382,0	601,6	1367,2	644,6	5,46	5,33
7	1396,6	529,6	1205,2	564,2	5,48	5,29
8	1291,8	603,5	1249,0	566,1	5,49	5,28
9	1292,4	578,2	1218,4	580,1	5,49	5,30
10	1259,8	577,3	1220,4	596,0	5,53	5,34
11	1249,2	611,9	1198,6	539,0	5,59	5,43
14	1251,4	607,2	1257,0	540,8	5,59	5,42
15		596,0		532,4	5,43	5,62

## ANEXO C – Dados experimentais dos ensaios de *resting cells* das culturas de enriquecimento M 4,7 e T 4,7

Tabela C1 – Dados experimentais da variação da concentração de polifenóis nos ensaios com *resting cells* da cultura de enriquecimento M 4,7.

tempo (h)	ACC		Tampão 200 mg.L <sup>-1</sup> AT		Tampão 1000 mg. L <sup>-1</sup> AT	
	ACC inoculada	ACC não inoculada	Inoculado M 4,7	Controlo abiótico	Inoculado M 4,7	Controlo abiótico
0	879,8	825,3	219,5	236,6	962,5	1035,7
5	761,1	912,1	0,0	239,1	54,5	1060,4

Tabela C2 – Dados experimentais da variação da concentração de polifenóis nos ensaios com *resting cells* da cultura de enriquecimento T 4,7.

tempo (h)	ACC		Tampão 200 mg.L <sup>-1</sup> AT		Tampão 1000 mg.L <sup>-1</sup> AT	
	ACC inoculada	ACC não inoculada	Inoculado T 4,7	Controlo abiótico	Inoculado T 4,7	Controlo abiótico
0	647,1	733,6	118,5	254,9	612,5	912,0
5	542,6	720,6	84,8	267,2	97,7	889,1