



Daniela Alexandra Oliveira Martins

Valorização de resíduos da indústria do azeite: análise do potencial da recuperação de antioxidantes e de água

Dissertação submetida ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientada pelo Professor Doutor Rui Carlos Cardoso Martins e pela Professora Doutora Mara Elga Medeiros Braga para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Setembro, 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Alexandra Oliveira Martins

Valorização de resíduos da indústria do azeite: análise do potencial da recuperação de antioxidantes e de água

Dissertação submetida ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientada pelo Professor Doutor Rui Carlos Cardoso Martins e pela Professora Doutora Mara Elga Medeiros Braga para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Supervisores:

Professor Doutor Rui Carlos Cardoso Martins

Professora Doutora Mara Elga Medeiros Braga

Coimbra, Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

Ao Professor Doutor Rui Martins e à Professora Doutora Mara Braga, meus orientadores, por toda a confiança, disponibilidade, competência, compreensão e apoio imprescindíveis, que ao longo deste trabalho, me concederam.

Ao Professor Doutor Hermínio Sousa, à Professora Doutora Inês Seabra e à Professora Doutora Ana Dias pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Doutor Nuno Amaral pela ajuda concedida.

Aos meus colegas de laboratório Sofia, Rita, Luísa, Akel, Rafael, Bárbara, Sylvia, Sara, André, João Gouveia, Ana Sofia, Cátia, Inês, Patrícia, Daniela Lopes, Daniela Gomes, Michael, João Baeta e João por toda a ajuda que me deram sempre que necessitei e pela simpatia que me transmitiram ao longo destes meses. Em especial, ao Akel por ter sido uma das pessoas mais presentes ao longo deste percurso, sabendo sempre qual a melhor palavra ou atitude a me transmitir, para que pudesse prosseguir sempre e ao Michael que, tal como ele, também esteve sempre presente.

Á Eng. Maria João, à D. Rosa, à D. Dulce e ao Sr. José pelo auxílio que me deram no que esteve ao seu alcance.

Ao Sr. Manuel Olaia e ao lagar Mourão a oportunidade que me concederam de ir conhecer o processo de produção de azeite e a geração dos resíduos a si associados.

Aos meus pais, por tudo o que fizeram para que pudesse chegar até aqui e por sempre me terem acompanhado ao longo da vida, dando-me o seu amor.

Aos meus avós que tiveram ao meu lado e me auxiliaram naquilo que precisei. Em especial aos maternos, a quem foi, dado à sua história de vida, muitas vezes buscar a força necessária para ultrapassar as dificuldades encontradas.

Aos meus primos, Guilherme, Miguel, Ângela e Filipa por serem como irmãos para mim, acompanhando-me sempre ao longo da vida. Ao Duarte por me dar a alegria duma criança.

Á restante família, apenas àqueles que acreditaram que tudo era possível.

Ao meu namorado, João, por toda a amizade, apoio e paciência nos momentos mais difíceis, apesar de nestes últimos tempos eu não ter sido a pessoa mais presente na sua vida.

A todos os meus amigos que sempre estiveram comigo, especialmente nos momentos mais difíceis.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

Resumo

Nos últimos anos, tem existido uma grande preocupação na procura de estratégias de valorização dos resíduos gerados pela atividade humana. Entre estes, os obtidos durante a produção de azeite virgem têm recebido especial atenção devido à sua composição potencialmente tóxica, que origina efeitos nefastos para os ecossistemas em grandes concentrações. Dentro destes, salientam-se as águas ruças e o bagaço de azeitona húmido que são fontes de compostos fenólicos e antioxidantes, que dificultam o seu eficiente tratamento, tendo potencial para serem usados noutras indústrias. Atendendo a estes aspetos, o objetivo deste trabalho passa por avaliar a recuperação de compostos antioxidantes do bagaço de azeitona húmido e das águas ruças através de extração sequencial. Assim como, avaliar o potencial de recuperação de água, através do processo de Fenton, a partir dos efluentes de lagares de azeite que passaram ou não por recuperação de compostos antioxidantes.

Foram selecionados dois tipos de águas ruças provenientes do sistema tradicional de prensas e do sistema de centrifugação de duas fases, e foi realizada uma extração líquido-líquido sequencial usando três solventes diferentes a 40°C com duração de 7 horas para cada etapa. Ao bagaço de azeitona húmido foi realizada uma extração sólido-líquido sequencial nas mesmas condições.

O processo de Fenton foi aplicado, sob várias condições operacionais, às águas residuais dos processos de separação e às águas ruças selecionadas que não passaram por estes processos. Os resultados obtidos mostraram que através dos processos de separação foram adquiridas frações, que pelo método de DPPH, conseguem, em determinadas concentrações, alcançar valores de atividade antioxidante interessantes. Dentro destas destacam-se as frações obtidas com recurso a acetato de etilo, a partir dos três resíduos, sendo a referente ao efluente do sistema de centrifugação de duas fases a que apresenta maior capacidade antioxidante. Por outro lado, algumas das frações adquiridas apresentam importante capacidade de proteger um substrato lipídico da oxidação, como é o caso das referentes ao efluente proveniente do sistema de prensas, obtidas com n-hexano e diclorometano, que apresentam percentagens de inibição de oxidação semelhantes aos antioxidantes de referência e, de todas as frações referentes ao outro efluente que apresentam percentagens de inibição um pouco menores.

Após a aplicação do processo de Fenton, apesar deste atingir percentagens de remoção de matéria orgânica interessantes, concluiu-se que este por si só ou integrado com a recuperação de antioxidantes não é suficiente para garantir um efluente final com as características legalmente necessárias para a descarga nos cursos naturais de água.

Abstract

In recent years, there has been a major concern in seeking recovery strategies for the wastes generated by human activity. Among these residues, those coming from olive oil production are of special concern due to their potentially toxic composition, which causes adverse effects to ecosystems in large concentrations. Within these, the olive mill wastewater and the wet pomace should be stressed as sources of phenolics and antioxidants, which hinder their effective treatment. These compounds, show high potential to be used in other industries. Considering these aspects, the aim of this work is to assess the recovery of antioxidant compounds from wet pomace and vegetable water through a sequential extraction. The other purpose is to assess the potential of recovering water, via Fenton process. Thus, this treatment was applied, on the oil mill effluent which has gone through (or not) a recovery process of antioxidant compounds.

Two types of vegetable water were selected coming from two different olive oil extraction methodologies (traditional presses and centrifugal two-phase systems). A sequential liquid-liquid extraction was performed by using three different solvents at 40°C. Each step lasted hours. The wet pomace was subjected to a sequential solid-liquid extraction under the same conditions.

Fenton process was applied, under various operating conditions, to the raw and after liquid-liquid extraction wastewaters. The results showed that fractions obtained through the separation processes have interesting antioxidant activity values (measured by the DPPH method). Among these, the best were those obtained by using the ethyl acetate. It should be stressed that the fraction related to the effluent of a two-phase centrifugation system presents the greatest antioxidant capacity. On the other hand, some of the fractions have a significant ability to protect a lipid substrate from oxidation, such as those related to the effluent from the press system, obtained with n-hexane and dichloromethane. These samples presented percentages of oxidation inhibition similar to reference antioxidants.

After the application of the Fenton process, even if high organic charge removal was attained, it was found that either by itself or integrated with the extraction process, it is not sufficient to guarantee a final effluent with the legally required characteristics for a discharge into natural watercourses.

Índice

Motivação e objetivos.....	1
Estrutura da tese.....	2
I. Introdução	
I.1. Produção de azeite na bacia do Mediterrâneo.....	3
I.2. Principais sistemas de extração de azeite	4
I.3. Resíduos	
I.3.1. Águas ruças	7
I.3.2. Bagaço de azeitona húmido.....	11
I.4. Valorização dos resíduos da indústria do azeite: realidade e potencial	12
I.5. Processos integrados de tratamento de efluentes e valorização de resíduos.....	16
II. Materiais e Métodos	
II.1. Matérias-primas.....	19
II.2. Reagentes	19
II.3. Procedimento experimental da extração sequencial	20
II.4. Procedimento do processo de Fenton.....	23
II.5. Caracterização das frações dos resíduos da indústria do azeite	
II.5.1. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)	24
II.5.2. Cromatografia em fase gasosa (CG)	25
II.5.3. Cromatografia em camada fina (TLC)	26
II.5.4. Atividade antioxidante	26
II.6. Caracterização das amostras líquidas	
II.6.1. Carência química de oxigénio (CQO)	28
II.6.2. Teor de fenóis (TPh)	29
II.6.3. Carência bioquímica de oxigénio (CBO ₅)	29
II.6.4. Fitotoxicidade.....	31
III. Resultados e Discussões	
III.1. Análise do efeito do solvente da extração sequencial na composição das frações obtidas.....	33
III.2. Análise dos rendimentos das frações obtidos nos processos de extração sequencial .	35
III.3. Identificação e quantificação de compostos por HPLC.....	38
III.4. Identificação e quantificação de compostos através de GC.....	44
III.5. Atividade antioxidante	45

III.6. Eficiência do processo de Fenton.....	56
III.7. Biodegradabilidade.....	60
III.8. Fitotoxicidade.....	61
IV. Conclusões e propostas de trabalhos futuros	
IV.1. Conclusões	65
IV.2. Propostas de trabalho futuro	66
V. Referências Bibliográficas.....	67
Anexos	71

Índice de Figuras

Figura 1 - <i>Decanters</i> de um processo de extração de duas fases	7
Figura 2 - Diagrama do processo de extração sequencial	21
Figura 3 - Efeito do solvente na extração fracionada para as diferentes matérias-primas perante o primeiro passo do processo de extração sequencial, em pequena escala: EP, EE, RE	34
Figura 4 - Efeito do solvente dos três passos de extração fracionada nas frações obtidas, realizada na maior escala, para as diferentes matérias-primas (EP, EE e RE)	35
Figura 5 - Rendimentos das diferentes frações obtidas a partir das várias matérias-primas usadas (% mássica). ●Hexano, ●Diclorometano ●Acetato de etilo.....	36
Figura 6 - A) Recuperação de água residual no final dos processos de extração líquido-líquido sequencial. B) Aumento do CQO nos efluentes, causado pelo processo de extração líquido-líquido sequencial. C) Remoção dos compostos fenólicos presentes nos efluentes pelo processo de extração líquido-líquido sequencial	37
Figura 7 - Cromatogramas obtidos por HPLC nos comprimentos de onda de 215 nm e 254 nm das várias frações do efluente português e da água residual portuguesa (A); do efluente espanhol e da água residual espanhola (B) e do resíduo sólido espanhol (C)	42
Figura 8 - Cromatogramas obtidos por GC, das várias frações do: A) efluente português; B) efluente espanhol; C) resíduo sólido	49
Figura 9 - Ensaio experimental de atividade antioxidante realizado para diferentes frações: A) fração de n-hexano, B) fração de diclorometano e C) fração de acetato de etilo	51
Figura 10 - Atividade antioxidante (AA) das frações obtidas para os diferentes lotes de matérias-primas e para os antioxidantes padrão, em função da concentração. BHT♦, Ácido ascórbico♦, BHA ♦; (A) Efluente Português: H ●, D ●, A ○; (B) Efluente Espanhol: H▲, D▲, A Δ (C); Resíduo Sólido Espanhol (RE): H ■, D ■ e A □. Atividade antioxidante dos efluentes usados e das respetivas águas residuais: (D) Efluente Português●, Água residual portuguesa ○; (E) Efluente Espanhol▲, Água residual espanhola Δ.....	53
Figura 11 - Capacidade de inibição da oxidação das frações obtidas dos diferentes lotes de efluentes líquidos e resíduo sólido, ao longo do tempo, bem como a dos antioxidantes de referência (A): EP-H♦, EP-D●, EP-A▲; EE-H♦, EE-D●, EE-A▲; RE-H♦, RE-D●, RE-A▲; ácido ascórbico♦, BHA●, BHT▲. Capacidade de inibição da oxidação dos efluentes e das	

águas residuais resultantes dos processos de extração, em função do tempo (B): EP♦, AREP◇; EE♦, AREE◇54

Figura 12 - Remoção do TPh dos efluentes iniciais e das águas residuais provenientes do processo de extração depois de submetidos ao processo de Fenton, sob várias condições: A) $H_2O_2/CQO=1,75$ (m/m); B) $H_2O_2/CQO=2,5$ (m/m); C) $H_2O_2/Fe^{2+}=7,5$ (mol/mol); D) $H_2O_2/Fe^{2+}=22,5$ (mol/mol). ● EP ● AREP ● EE ● AREE57

Figura 13 - Remoção do CQO dos efluentes iniciais e das águas residuais provenientes do processo de extração depois de submetidos ao processo de Fenton, sob várias condições: A) $H_2O_2/CQO=1,75$ (m/m); B) $H_2O_2/CQO=2,5$ (m/m); C) $H_2O_2/Fe^{2+}=7,5$ (mol/mol); D) $H_2O_2/Fe^{2+}=22,5$ (mol/mol). ● EP ● AREP ● EE ● ARRE59

Figura 14 - Fitotoxicidade dos efluentes antes e após o processo de extração líquido-líquido sequencial e/ou processo de Fenton63

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Condições usadas em cada uma das reações de Fenton efetuadas a cada efluente e a cada água residual24

Tabela 2 - Fases móveis testadas26

Tabela 3 - Características dos efluentes34

Tabela 4 - Identificação de compostos nas frações (do H-hexano, D-diclorometano e Acetato de etilo) obtidas a partir dos dois efluentes e do resíduo sólido, bem como nas águas residuais, através de HPLC39

Tabela 5 - Quantificação de compostos presentes nas frações obtidas dos dois efluentes e do resíduo sólido, através de HPLC44

Tabela 6 - Composição das frações obtidas das várias matérias-primas usadas46

Tabela 7 - Quantificação, efetuada por GC-FID, de dois dos compostos presentes nas frações obtidas dos dois efluentes e do resíduo sólido50

Tabela 8 - Biodegradabilidade dos efluentes e águas residuais61

Abreviaturas

A - Acetato de etilo;

AA - Atividade antioxidante;

AREE - Água residual do efluente espanhol resultante do processo de extração sequencial;

AREEF - Água residual do efluente espanhol resultante do processo de extração sequencial que foi depois sujeita a um processo de Fenton;

AREP - Água residual do efluente português resultante do processo de extração sequencial;

AREPF - Água residual do efluente português resultante do processo de extração sequencial que foi depois sujeita a um processo de Fenton;

BHA- Butylated hydroxytolueneo;

BHT- Butylated hydroxyanisole;

CBO - Carência bioquímica de oxigénio;

CBO₅ - Carência bioquímica de oxigénio após 5 dias;

CQO - Carência química de oxigénio;

D - Diclorometano;

DPPH - 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

DAD - Detetor de díodos;

EE - Efluente espanhol;

EEF - Efluente espanhol que passou apenas pelo processo de Fenton;

EP - Efluente português;

EPF - Efluente português que passou apenas pelo processo de Fenton;

FID - Detetor de ionização de chama;

GC - Cromatografia em fase gasosa;

GI – Índice de germinação;

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho;

H - Hexano;

HKP - Hidrogenoftalato de potássio

L_R - Comprimento média das raízes (cm)

N_{SG} - Número de sementes germinadas em cada uma das caixas;

MS - Detetor de espectrometria de massa;

POAs - Processos de oxidação avançada;

RE - Resíduo sólido espanhol;

RRG - percentagem relativa de comprimento de raízes;

RSG - percentagem relativa de germinação de sementes

TPh- Teor de fenóis;

Motivação e objetivos

O aumento do consumo de azeite virgem, face aos comprovados benefícios a nível de saúde que este óleo vegetal apresenta, tem aumentado na última década a sua produção, que registou um aumento de 40% em todo o mundo, e conseqüentemente a geração de resíduos originados durante o seu fabrico.

As águas ruças são um resíduo prejudicial quando descarregado no meio ambiente devido à sua composição tóxica. A composição deste resíduo varia de acordo com o sistema de extração de azeite usado, variedade e grau de maturação das azeitonas, entre outros fatores. As águas ruças são as principais responsáveis pelos problemas ambientais causados pela indústria da produção de azeite, uma vez que as formas de tratamento não são eficientes ou economicamente viáveis, acabando por serem descarregadas no meio ambiente.

Além das águas ruças, o bagaço de azeitona húmido originado no novo sistema de extração de azeite, sistema de centrifugação de duas fases, também não possui tratamento adequado, aumentando a carga de resíduos poluentes gerados por esta indústria.

Os problemas ambientais e económicos que se tem vindo a sentir nos últimos tempos têm cada vez mais levado a uma particular preocupação na procura de estratégias de valorização destes dois resíduos. Uma forma de valorização interessante que tem vindo a ser estudada passa pela recuperação de compostos antioxidantes neles presentes que têm potencial para serem usados na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica, podendo vir a acrescentar desta forma valor económico à indústria do azeite. No entanto, no caso das águas ruças esta forma de valorização não é apenas suficiente para resolver os problemas a si associados, pelo que uma integração de um processo de recuperação de compostos antioxidantes com um processo de tratamento poderá vir a constituir uma solução eficaz e economicamente viável de resolver os problemas ambientais gerados por este resíduo e combater a escassez de água que o mundo enfrenta. Uma vez que, a recuperação de compostos com alto valor acrescentado leva a uma diminuição da carga orgânica poluente que é responsável por dificultar o eficiente tratamento deste efluente através dos processos de tratamento até então estudados.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a recuperação de compostos antioxidantes presentes nas águas ruças provenientes de dois sistemas de extração de azeite e no bagaço de azeitona húmido pela aplicação de um processo de extração sequencial, usando três solventes diferentes. Assim como, avaliar o potencial de recuperação das águas que

passaram por um processo de tratamento (processo de Fenton) e que antes foram ou não sujeitas a uma recuperação de compostos antioxidantes.

Estrutura da tese

Nesta secção apresenta-se a forma como esta tese se encontra organizada. Inicialmente apresenta-se a motivação e os objetivos, de seguida apresenta-se uma breve introdução onde é feito um enquadramento teórico sobre os resíduos da indústria de azeite, a sua produção na região do mediterrâneo, os principais sistemas de extração de azeite existentes e as principais características destes resíduos, bem como as suas formas de tratamento e/ou valorização até agora encontradas na literatura. Posteriormente exhibe-se os materiais e procedimentos experimentais usados no decorrer deste trabalho e a discussão dos resultados obtidos. Por fim, expõe-se as principais conclusões e as propostas de trabalhos futuros e exhibe-se a bibliografia consultada durante a sua realização.

I. Introdução

I. 1. Produção de azeite na bacia do Mediterrâneo

A produção de azeite é uma atividade agroindustrial de vital importância económica nos países do mediterrâneo (Papaphilippoua *et al.*, 2013).

As azeitonas sãs e em perfeitas condições de maturação dão origem ao azeite virgem, um óleo vegetal há muito incorporado na dieta mediterrânea e, hoje em dia, muito apreciado pelo resto do mundo, pelas suas propriedades organoléticas e nutricionais (Aires, 2007). Os seus comprovados benefícios a nível de saúde, no que respeita ao tratamento e prevenção de algumas doenças tem aumentado cada vez mais o seu consumo e, por isso, a sua produção, registou na última década um aumento de aproximadamente 40% em todo o mundo (Aires, 2007; Aggouna *et al.*, 2016)

Associada à produção do azeite virgem está a geração de grandes quantidades de resíduos originados durante o seu fabrico, o bagaço de azeitona e as águas ruças, que apresentam uma composição potencialmente tóxica e com efeitos nefastos para os ecossistemas quando descarregados indevidamente para o meio ambiente, potenciando assim graves problemas ecológicos nos países produtores deste óleo, especialmente nos países do mediterrâneo, onde cerca de 97% do azeite mundial é produzido (Dermeche *et al.*, 2013; Aggouna *et al.*, 2016).

Dentro destes resíduos as águas ruças, que registam uma produção de cerca de 30 milhões de m³ por ano (Gebreyohannesa *et al.*, 2016) são os que apresentam maiores problemas para a indústria do azeite nesta região, uma vez que ainda não existe uma solução eficiente e economicamente viável de valorizar/tratar este efluente que acaba por ser descarregado no meio ambiente.

No que diz respeito ao bagaço de azeitona, já são conhecidas formas de valorização viáveis, no entanto, nos últimos anos devido às alterações que têm ocorrido nos processos de extração de azeite em alguns lagares que têm dado lugar a um sistema de extração mais recente denominado de contínuo de duas fases, têm surgido algumas dificuldades (como o aparecimento de problemas operacionais na secagem e o encarecimento deste processo) na aplicação das tecnologias de valorização que não se mostram muito eficientes para as características do resíduo sólido gerado por esta via. (Ruiz-Méndez, 2013; Ferraz, 2012).

Atendendo a estes fatores é cada vez mais importante a procura por estratégias de valorização e/ou tratamento das águas ruças e do bagaço de azeitona húmido, para que estes possam

deixar de constituir um problema para o meio ambiente, e se possível acrescentarem valor económico à indústria do azeite.

I. 2. Principais sistemas de extração de azeite

O azeite virgem é um óleo vegetal extraído das azeitonas que pode ser produzido por um processo descontínuo, sistema tradicional de prensas, ou contínuo, sistema de centrifugação de três fases ou de duas fases.

Independentemente do processo utilizado para a sua obtenção, existe uma fase inicial que é comum a todos e que compreende a limpeza, lavagem, moenda das azeitonas e a termobatedura das massas. Pelo que, é na extração propriamente dita que residem as diferenças entre os vários processos. (Aparício e Harwood, 2013; Boskou, 2008)

Assim, a produção de azeite virgem é iniciada com a etapa de limpeza das azeitonas, na qual a matéria-prima ao chegar ao lagar é descarregada sobre uma grelha, onde os ramos e pedras maiores são removidos, sendo depois enviada para um equipamento onde fica sujeita a uma corrente de ar que elimina as folhas, pela diferença de densidade (Aires, 2007).

A lavagem dos frutos é a etapa que se segue, sendo realizada com água fria, para eliminar terra e pequenas pedras, deixando a matéria-prima pronta para o próximo passo, a moenda dos frutos. Nesta etapa, as azeitonas são moídas em moinhos metálicos, de forma a promover o seu rompimento e permitir a libertação das gotas de azeite que se encontram na polpa destes frutos, resultando daqui uma pasta que segue para o próximo passo do processo, a termobatedura das massas. Aqui ocorre um batimento contínuo e lento da pasta, acompanhado por um aquecimento (30°C) simultâneo, com o objetivo de aumentar a percentagem de azeite disponível, uma vez que a coalescência de pequenas gotas de óleo em gotas de maiores dimensões é favorecida, facilitando a separação da fase oleosa da aquosa (água presente na composição das azeitonas) (Aparício e Harwood, 2013; Kapellakis *et al.*, 2008).

De seguida, a pasta está pronta a sofrer uma separação de fases, pelo que é nesta altura que os processos de extração de azeite se diferenciam, pois, todos eles apresentam uma forma diferente de efetuarem esta separação. De seguida encontra-se uma breve descrição dos três sistemas de extração existentes onde se poderá verificar quais são as diferenças entre estes.

Sistema tradicional de prensas - É o método mais antigo e difundido para o processamento de azeite. Neste, a pasta preparada nas operações anteriores é espalhada em camadas finas

sobre capachos (discos de material filtrante), que são colados uns sobre os outros formando uma pilha.

A pilha é depois comprimida numa prensa hidráulica facilitando assim a separação da fração sólida (bagaço de azeitona), que fica retida nos capachos da fração líquida (mosto oleoso composto por azeite e água de composição das azeitonas) que é drenada e enviada para a fase seguinte do processo, onde por decantação ou centrifugação se dá a separação do azeite da água (Aparício e Harwood, 2013; Dermeche *et al.*, 2013).

Ao sistema é necessário fornecer alguma água para ajudar a separar o azeite virgem da fração sólida e da água de vegetação (água de composição das azeitonas). O que leva a que no final do processo se obtenha o azeite virgem (produto principal), o bagaço das azeitonas seco e as águas ruças, que são compostas pela água usada na etapa de lavagem dos frutos, água de vegetação e água adicionada ao processo para facilitar a separação de fases (Aires, 2007).

O sistema tradicional de prensas apresenta algumas vantagens, tais como: o baixo consumo de energia e a baixa humidade do bagaço de azeitona (35%), tendo como desvantagens o fato do processo ser descontínuo, requerer muita mão de obra e ser difícil manter uma correta higiene ao longo do processo. (Aparício e Harwood, 2013; Dermeche *et al.*, 2013).

Sistema de centrifugação de três fases - O sistema de centrifugação de três fases foi desenvolvido no início dos anos 70, do século XX, e desde então tem vindo a substituir o método de extração tradicional. Este, como o nome indica é um sistema na qual a extração de azeite é realizada por centrifugação, resultando no final três frações: o azeite virgem, o bagaço de azeitona seco e as águas ruças (compostas pela: água usada na etapa de lavagem dos frutos, água de vegetação e água adicionada ao processo para facilitar a separação de fases) (Zbakh *et al.*, 2012).

Assim, neste sistema, a pasta da azeitona resultante da termobatedura das massas, vai dar entrada numa centrifugadora horizontal, designada *decanter*. Aqui ocorre uma centrifugação a alta velocidade, que devido às diferentes densidades dos componentes da pasta, provoca uma separação da fração sólida (bagaço da azeitona) da líquida (água e azeite). A separação anterior é facilitada pela adição de água morna (20-25°C) ao *decanter*, que deve ser feita numa proporção de massa/água entre 1:0,4 e 1:0,7 (m/m), de modo a não comprometer o rendimento de extração nem o teor fenólico do produto final (Aparicio e Harwood, 2013; Niaounakis e Halvadakis, 2006). A fase líquida que resulta da centrifugação realizada vai depois para outra centrifugadora onde se realiza a separação do azeite da água.

O presente sistema produz cerca de 1,0 a 1,2 m³ de águas ruças por tonelada de azeitona laborada, o que é uma quantidade bastante maior comparativamente com o processo tradicional de prensas que origina cerca de 0,4 a 0,6 m³ de água-ruça por tonelada de azeitona laborada (Azbar, *et al.* 2004). Para além desta desvantagem este sistema apresenta também outros inconvenientes como maiores consumos de água e energia; perda de componentes antioxidantes para a fase da água; e um maior custo de investimento que o processo de extração tradicional. Tendo também vantagens a si associadas como é o caso de ocupar menor área e necessitar de menos mão de obra que o sistema tradicional de prensas e apresentar elevada capacidade de laboração (Aires, 2007; Roig *et al.*, 2006).

Sistema de centrifugação de duas fases - Nos anos 90 do século XX, surgiu o sistema de extração contínuo de duas fases, também designado de sistema ecológico, que tem vindo a substituir os processos de extração tradicional de prensas e o contínuo de três fases, devido às reduzidas quantidades de águas residuais que produz (0,2 m³ de efluente líquido por tonelada de azeitona) (Albuquerque *et al.*, 2004).

Neste novo sistema a pasta da azeitona é enviada para um *decanter* de duas fases, como um dos apresentados na Figura 1, onde ocorre uma centrifugação. A fase líquida (azeite e alguma água) é então separada da fase sólida (bagaço de azeitona húmido), sem que seja necessário fornecer água ao processo (ou então apenas uma quantidade mínima). De seguida, a fração que é composta por azeite e água é sujeita a outra centrifugação para separar estes dois componentes, obtendo-se assim no final do processo o azeite virgem, o bagaço húmido e uma reduzida quantidade de água residual (que é quase só composta pela água de lavagem das azeitonas) (Roig *et al.*, 2006; Aparicio e Harwood, 2013).

Desta forma, o presente sistema tem como principal vantagem a reduzida quantidade de águas ruças que se produz comparativamente com os outros dois sistemas de extração apresentados, tendo também benefícios como a produção de azeite com maior teor de antioxidantes, necessidade de pouca mão-de-obra e elevadas capacidades de laboração. Sendo, as suas desvantagens a necessidade de ter pessoal especializado e a produção de maiores quantidades de bagaço de azeitona (800 kg por tonelada de azeitona laborada) que o sistema contínuo de três fases (500-600 kg por tonelada de azeitona laborada) e do que o sistema tradicional de prensas (400 kg por tonelada de azeitona laborada). É caracterizado por apresentar resíduo com um elevado teor de humidade, sendo assim designado de bagaço de azeitona húmido. O qual é responsável por trazer problemas aos lagares de azeite que operam com este sistema (Aires, 2007; Albuquerque *et al.*, 2004).

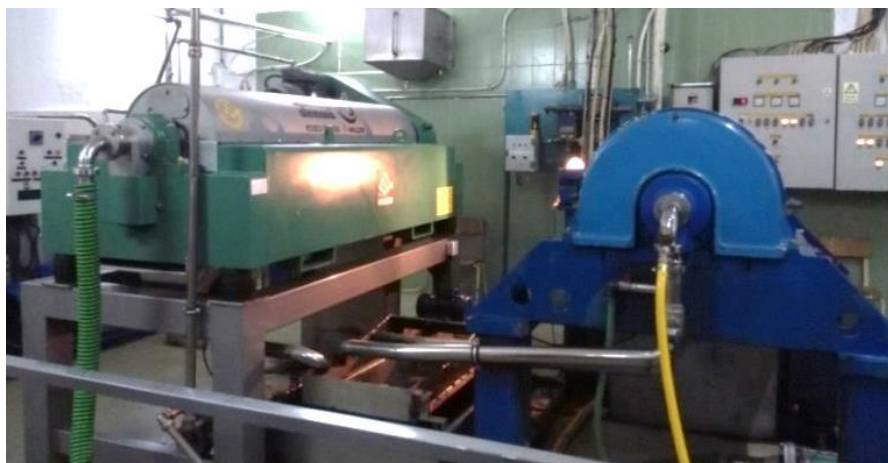


Figura 1 - Decanters de um processo de extração de duas fases.

(Fotografia retirada no lagar Mourão no distrito de Coimbra, Portugal)

I. 3. Resíduos

I. 3.1. Águas ruças

As águas ruças correspondem às águas residuais geradas durante o processo de produção de azeite e são caracterizadas por serem um efluente de cor escura, que contém diversas substâncias dissolvidas e em suspensão (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

A sua composição é extremamente variável sendo influenciada por diversos fatores, como a variedade e grau de maturação das azeitonas, as condições climáticas, as práticas de cultivo, a duração do armazenamento e o processo de extração de azeite usado (Paraskeva e Diamadopoulos, 2006; Rodrigues *et al.*, 2015).

Assim, as águas ruças apresentam uma grande heterogeneidade no que respeita à sua composição, embora se possa dizer que, em geral, é um efluente ácido, composto por água (83 a 94%), matéria orgânica (4 a 18%) e sais minerais (0,4 a 2,5%), sendo os seus principais constituintes orgânicos os lípidos, os açúcares, os poliálcoois, os polifenóis, os ácidos voláteis e as pectinas (Lafka *et al.*, 2011; Rima *et al.*, 2004; Rahmanian *et al.*, 2014).

Dentro das substâncias orgânicas presentes nas águas ruças há que salientar os compostos fenólicos, que apresentam propriedades antioxidantes, sendo responsáveis pela toxicidade destes efluentes contra microrganismos e plantas (Kapellakis *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010).

A elevada carga orgânica (valores de carência química de oxigénio, CQO, que podem ir até cerca de 200 g.L⁻¹ e carência bioquímica de oxigénio, CBO, que pode ir até cerca de 100 g.L⁻¹) e o carácter ácido desta água residual fazem dele um poderoso poluente, que quando descarregado diretamente em cursos de água ou em solos leva a graves danos ambientais que vão desde a ameaça à vida aquática, poluição das águas superficiais e subterrâneas, maus odores, fitotoxicidade e alterações na qualidade do solo (Mert *et al.*, 2010).

Neste sentido e devido à escassez de água que o mundo tem vindo a enfrentar, vários estudos têm sido realizados de forma a encontrar maneiras de tratar este efluente, que normalmente acaba por ser descarregado em lagoas de evaporação ou nos solos, originando graves problemas ecológicos nos países produtores de azeite (El-Gohary *et al.*, 2009).

Processos de tratamento das águas ruças

Nos estudos até então realizados vários processos de tratamento foram encontrados para as águas ruças, sendo estes classificados em térmicos, físicos, biológicos e físico-químicos (Rahmanian *et al.*, 2014).

No que diz respeito aos processos de tratamento térmicos como a evaporação e combustão, que tem como objetivo a redução ou a eliminação total do efluente, estes mostram-se ineficazes para o tratamento das águas ruças devido aos elevados custos de funcionamento e à possível libertação de gases tóxicos para o ambiente (Rahmanian *et al.*, 2014). Já no que respeita aos processos biológicos (processos anaeróbicos e aeróbicos) que tem por base a utilização de microrganismos que se desenvolvem no seio das águas ruças, estes apresentam-se também como ineficazes no tratamento deste efluente, uma vez que este apresenta um carácter sazonal (produzido entre Novembro e Fevereiro) sendo rico em compostos fenólicos que são recalcitrantes à biodegradação e tóxicos para os microrganismos (Brito e Rangel, 2008; Tsagaraki *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010).

Relativamente aos processos físicos, como a sedimentação, centrifugação, etc., estes são apenas usados como metodologias de pré-tratamento comuns, com o objetivo de remover total ou parcialmente os sólidos (Rahmanian *et al.*, 2014). Entre os métodos físicos encontram-se também as tecnologias de filtração de membranas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa) que tem vindo a ser muito usadas no tratamento destes efluentes. No entanto, estas tecnologias são afetadas por incrustações que se desenvolvem na membrana (*fouling*) resultando numa perda de fluxo e de eficiência de operação, tornando o processo

dispendioso devido aos custos de manutenção a si associados (Rahmanian *et al.*, 2014; Gebreyohannesa *et al.*, 2016)

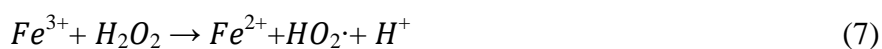
No que respeita aos métodos físico-químicos, como a neutralização, precipitação, etc., que são processos de tratamento relativamente baratos, estes exigem uma continuação do tratamento na medida em que o líquido tratado ainda tem uma elevada carga poluente havendo apenas 20 a 30% de diminuição dos valores de CQO iniciais (Rahmanian *et al.*, 2014). Dentro dos métodos físico-químicos encontram-se também os processos de oxidação avançada (POAs) que são caracterizados pela geração de radicais livres altamente reativos que, devido ao seu forte poder oxidante, são capazes de reagir com a maioria dos compostos orgânicos presentes nos efluentes de forma não seletiva, levando à sua destruição (Stasinakis, 2008). Estando por isso estes processos a ganhar aceitação no campo da remediação de águas residuais.

Entre os POAs existentes, o processo de Fenton é um dos métodos de tratamento de efluentes que tem vindo a ser estudado para possível aplicação nas águas ruças, uma vez que não necessita de altas pressões, altas temperaturas ou equipamentos complexos que encareçam o processo para degradar a matéria orgânica presentes nestes efluentes.

O processo de Fenton baseia-se então na geração de radicais hidroxilo (HO•) fortemente oxidantes provenientes da decomposição de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) na presença de iões de ferro em condições ácidas, de acordo com a equação 1, que vão reagir com a matéria orgânica degradando-a (Equação 2) (Martins *et al.*, 2010):



podendo ocorrer para além da reação principal (Equação 1), várias reações adicionais que competem com esta (Lucas e Peres, 2009):



O processo de Fenton é influenciado pela concentração de Fe²⁺ e de H₂O₂, pelo pH inicial do efluente e pela temperatura da reação.

Na literatura, são encontrados estudos sobre a aplicação deste método de tratamento em águas ruças podendo através destes se avaliarem as várias condições de operação usadas e as principais conclusões a que os vários autores chegaram.

No estudo realizado por Lucas e Peres (2009) analisou-se o efeito de diferentes condições operacionais do processo de Fenton na remoção de CQO das águas ruças. Apurando que para valores de pH superiores a 5 o desempenho da remoção de CQO diminui e para valores abaixo da gama ótima de temperatura (30-40°C) a remoção de CQO indica que a extensão da reação não está completa dentro de uma hora. Por outro lado, observou-se que o aumento da concentração de H_2O_2 (e proporcionalmente da concentração de Fe^{2+}) tem um efeito positivo na redução de CQO, mas a ausência de peróxido de hidrogénio ou de iões de ferro leva a remoções apenas de 0,5% e 5,6%, respetivamente. Concluindo-se que as condições operacionais que levaram a uma melhor remoção de CQO (70%) foram as de pH igual a 3.5, temperatura igual a 30°C, proporção molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ de 15 e proporção em peso $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CQO}$ de 1.75, durante uma hora de reação.

Martins *et al.* (2010) estudou o efeito das concentrações de peróxido de hidrogénio e de iões de ferro sobre a eficiência do processo de Fenton aplicado às águas ruças para reações a pH fixo de 3, durante uma hora. Verificando que o aumento da concentração de H_2O_2 leva a um aumento na remoção de CQO e de fenóis e que um aumento da concentração de Fe^{2+} de 0,4 para 30 mmol.L^{-1} origina um aumento significativo destas remoções, mas que uma elevação desta concentração para o dobro não regista aumentos significativos nas remoções de carência química de oxigénio e de compostos fenólicos. Este comportamento foi atribuído ao efeito “*scavenger*” mostrado pelo peróxido de hidrogénio e os iões ferro. De facto, ambos os reagentes quando em excesso competem com a matérias orgânica pelos radicais hidroxilo reduzindo a eficiência do processo de tratamento.

Mert *et al.* (2010) também estudou o efeito de diferentes condições operacionais do processo de Fenton, à temperatura ambiente, na remoção de carência química de oxigénio das águas ruças. Observando que o pH ótimo para o processo é de 3 verificando-se uma diminuição do potencial de oxidação dos radicais hidroxilo para valores de pH maiores. Por outro lado, a remoção de CQO e de compostos fenólicos nas águas ruças aumenta com o aumento da concentração de peróxido de hidrogénio até a um valor de 3500 mg.L^{-1} e de Fe^{2+} até 3000 mg.L^{-1} diminuindo para valores acima destes, pelo que as condições ótimas encontradas para o processo de Fenton foram de pH inicial igual a 3, concentração de peróxido de 3500 m.L^{-1} e concentração de iões de ferro de 3000 mg.L^{-1} dado que se obtém uma remoção de CQO de 81% e de fenóis de 86%.

A literatura indica então que um valor ótimo para o pH do processo de Fenton aplicado às águas ruças deve estar entre 2,5 e 3,5 (Martins *et al.*, 2010). Enquanto que a temperatura do processo deve estar entre 20°C e 40°C, não devendo assumir valores acima de 40°C dada a possibilidade de ser promovida a decomposição do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água (Castro, 2014).

Relativamente à concentração de iões de ferro neste processo esta é determinante na medida em que na ausência de ferro, a remoção de matéria orgânica é muito reduzida como concluiu Lucas e Peres (2009). Aumentando esta concentração deixando fixos os outros parâmetros as taxas de remoção aumentam até um determinado valor, mas um excesso deste composto pode levar a uma diminuição destas taxas, como se pode observar no estudo realizado por Mert *et al.* (2010).

A concentração de peróxido de hidrogénio inicial é um fator importante uma vez que se apresenta como fornecedor de radicais hidroxilo pelo que normalmente um aumento desta concentração leva a um aumento da degradação da matéria orgânica, como se pode ver nos estudos realizados por Martins *et al.* (2010), Mert *et al.* (2010) e Lucas e Peres (2009). Por outro lado um excesso deste reagente pode levar a que os radicais hidroxilo reajam atuando como “*scavenger*”, diminuindo, de forma significativa, a eficiência do processo oxidativo.

O processo de Fenton para além das vantagens que apresenta como um possível método a ser usado no tratamento das águas ruças não constitui por si só, assim como os vários métodos de tratamento anteriormente referidos, uma solução eficiente e economicamente viável de tratar estes fluentes (Rahmanian *et al.*, 2014)

I. 3.2. Bagaço de azeitona húmido

O bagaço de azeitona húmido, resultante do sistema de centrifugação de duas fases, é um resíduo semi-sólido, moderadamente ácido, formado por pedaços de caroço, polpa da azeitona e água de vegetação (Niaounakis e Halvadakis, 2006).

A sua composição varia de acordo com a variedade das azeitonas, estado de maturação dos frutos, condições climáticas e práticas de cultivo. Sendo que, em geral é constituído por elevadas quantidades de água (60-70%), azeite residual retido na polpa (2,5 a 3%), compostos inorgânicos e quantidades apreciáveis de lenhina, celulose e hemicelulose, bem como outra matéria orgânica que inclui proteínas, poliálcoois, ácidos gordos, açúcares, polifenóis e outros pigmentos (Rincón *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2014).

A carga orgânica que este resíduo apresenta, responsável pelo seu carácter fitotóxico e antimicrobiano, assim como o seu elevado teor de humidade, que torna difícil o seu manuseamento, armazenamento e transporte, são características que dificultam o tratamento/valorização deste resíduo (Hernández *et al.*, 2014; Niaounakis e Halvadakis, 2006).

Dentro das possíveis formas de tratamento/valorização encontradas para o bagaço de azeitona húmido existe uma que já é aplicada a nível industrial. Esta consiste na obtenção de óleo de bagaço de azeitona por um processo de extração usando n-hexano, seguida de cogeração de energia elétrica (Ruiz-Méndez, 2013). No entanto, devido às elevadas quantidades de água e de açúcares que este resíduo apresenta a sua secagem antes da extração enfrenta problemas operacionais, que em algumas empresas são combatidos pela mistura dos três tipos de bagaço de azeitona de forma a se obter um menor teor de humidade de bagaço a extrair (Ferraz *et al.*, 2012).

Porém, como a tendência é para substituir os sistemas de extração de azeite tradicionais e de três fases pelo moderno sistema de duas fases, é importante começar a desenvolver soluções para este resíduo para que não passe a constituir um problema maior para o meio ambiente.

I. 4. Valorização dos resíduos da indústria do azeite: realidade e potencial

Nos últimos anos muitos esforços têm sido realizados no sentido de encontrar uma forma de valorizar eficientemente as águas residuais dos lagares de azeite e o bagaço de azeitona húmido de modo a conseguir acrescentar valor comercial a estes resíduos.

Dentro das formas de valorização já estudadas pode-se referir a bioconversão destes resíduos em fertilizantes, a sua aplicação na produção de alimentos para animais, a sua utilização como substrato para a produção de bioetanol/biometano e biohidrogénio, e a sua bioconversão nalguns biopolímeros (como é o caso da goma de xantano) ou enzimas importantes para outras indústrias. No entanto, a maioria destas aplicações não são eficientes e em alguns casos nem estão ainda muito estudadas em laboratório (Dermeche *et al.*, 2013; Roig *et al.*, 2006).

Outra forma de valorização destes resíduos também encontrada na literatura científica passa pela recuperação de compostos antioxidantes naturais de elevado valor acrescentado neles presentes (como é o caso dos compostos fenólicos). Esta, pode constituir uma forma interessante de valorizar as águas ruças e o bagaço de azeitona, uma vez que os compostos antioxidantes naturais são compostos que, quando presentes em baixas concentrações em

comparação com as do substrato oxidável, atrasam significativamente, ou inibem a oxidação do referido substrato, sendo muito procurados por parte da indústria alimentar, cosmética e farmacêutica, na medida em que são capazes de impedir a oxidação lipídica em alimentos e inibir reações de oxidação nos sistemas biológicos prevenindo e tratando assim muitas doenças associadas com o *stress* oxidativo, como caso do cancro, doenças neurodegenerativas e outras (Niki, 2010; Soares, 2002; Leouifoudi *et al.*, 2015; Dermeche *et al.*, 2013).

Dentro dos estudos já realizados sobre a recuperação de compostos antioxidantes presentes nestes dois resíduos da extração de azeite verifica-se que o método mais usado para a sua obtenção nas águas ruças é o processo de extração líquido-líquido, devido sua à simplicidade e eficiência (Rahmanian *et al.*, 2014; Stalikas, 2007). Pelas mesmas razões o processo de extração sólido-líquido aplicado ao bagaço de azeitona húmido é também encontrado na literatura (Lafka *et al.*, 2011).

Nestes processos é preciso ter atenção a fatores como o pH, a temperatura, o tempo do processo, o fracionamento, o solvente usado e a proporção solvente/matéria-prima pois estes têm influência no rendimento final do processo. Allouche *et al.* (2004) estudou o efeito da variação de alguns destes parâmetros a quando da realização de extrações líquido-líquido descontínuas à temperatura ambiente com duração constante que tiveram por base a variação de todos os outros fatores, verificando que o coeficiente de distribuição dos compostos aumenta quando o pH diminui atingindo o seu máximo para pH igual a dois, sendo o rendimento de extração fracamente afetado para razões solvente/matéria-prima acima de dois. Conclui-se assim que as condições ótimas para a recuperação de compostos fenólicos é o uso de um processo de extração no qual se usa acetato de etilo como solvente, pH da amostra igual a dois, taxa de solvente/matéria-prima até dois e número de etapas de extração igual a três.

Kalogerakis *et al.* (2013) investigou o rendimento de recuperação de compostos, tais como o tirosol e hidroxitirosol, bem como o rendimento de recuperação de fenóis total obtidos em três extrações líquido-líquido realizadas com solventes diferentes, concluindo que o melhor desempenho foi obtido pela extração realizada com acetato de etilo, dada a seletividade deste solvente para com estes compostos, estimando que para 1 m³ de águas ruças com um teor fenólico inicial de 6000 mg/L se obtém 3,44 kg de fenóis, ou seja se atinge uma recuperação de 57% destes compostos.

Lafka *et al.* (2011) investigou as concentrações fenólicas e a atividade antioxidante das frações obtidas por um processo convencional de extração sólido-líquido, ao qual se variou

todos os fatores à exceção da temperatura de forma a encontrar as condições ótimas. Para tal usou um resíduo sólido, proveniente de um processo de extração contínuo de duas fases, que foi acidificado (para pH entre 2 e 5,8) e sujeito a uma extração com n-hexano para remover a gordura. De seguida, foi submetido a uma extração de forma contínua ou por etapas, usando diferentes solvente (metanol, etanol, mistura de etanol-água 1:1, n-propanol, isopropanol ou acetato de etilo) numa proporção solvente/sólido que varia de 2:1 a 7:1 (v/m), durante períodos de tempo que vão de 30 minutos a 24 horas, com o objetivo de recuperar os compostos fenólicos. A partir deste estudo concluiu que a extração usando metanol levou a um teor máximo de fenóis, mas dada à toxicidade que este solvente apresenta é o etanol que se revela o melhor solvente, alcançando um teor de fenóis de 1,23% (m/m). Para além disto, verificou que a solubilização dos compostos no solvente aumentou com a acidificação da amostra, pelo que o pH ótimo é 2 e o teor de fenóis dos extratos aumenta com o aumento do tempo de extração, atingindo o máximo ao fim de 3 horas, sendo uma extração realizada em dois passos a preferida.

O solvente usado nos processos de extração é dos fatores anteriormente apresentados aquele que influencia mais o rendimento do processo, uma vez que a afinidade para os vários compostos varia de solvente para solvente. Assim, nos estudos encontrados na literatura verifica-se que o n-hexano ou o éter de petróleo são os solventes mais usados para extrair os lípidos presentes nestes dois resíduos da extração de azeite. O acetato de etilo é um dos solventes mais usados na recuperação de compostos fenólicos nas águas ruças por processos de extração líquido-líquido, uma vez que é altamente seletivo para estes compostos (Araújo *et al.*, 2015; Lesage-Meessen *et al.*, 2001), tendo sido usado por Zbakh e El-Abbassi *et al.* (2012) e De Marco *et al.* (2007) após acidificação das águas e remoção de lípidos com n-hexano, e por Leouifoudi *et al.* (2015) apenas após remoção de lípidos com n-hexano a duas amostras de águas oriundas de duas regiões diferentes. Por outro lado, o etanol como se pode ver pelo estudo de Lafka *et al.* (2011) revela-se um melhor solvente para a recuperação de compostos fenólicos que o acetato de etilo em processos de extração sólido-líquido realizados ao bagaço de azeitona húmido.

Os extratos obtidos por estes processos são normalmente avaliados pelo seu conteúdo fenólico pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu e a identificação e a quantificação de compostos antioxidantes nestes presentes tem sido realizada por técnicas cromatográficas tais como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-DAD), fazendo uso de padrões que permitem a identificação destes compostos. Zbakh e El-Abbassi (2012), De Marco *et al.* (2007) e Lafka *et al.* (2011) verificaram por HPLC que o hidroxitirosol é o composto que se

encontrava em maior quantidade nestes extratos. Kalogerakis *et al.* (2013) verificou o mesmo, e para além disso apurou que o tirosol era o composto que de seguida se encontrava em maior quantidade em extratos obtidos a partir das águas ruças, pelo que conclui que 1 m³ de águas ruças poderia render 0,25 kg de hidroxitirosol e 0,062 kg de tirosol.

Leouifoudi *et al.* (2015) identificou também a presença destes compostos em quantidades interessantes nos extratos obtidos usando acetato de etilo a partir das águas ruças, confirmando também a presença de outros compostos como o ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, oleuropeína, 3,4,5-ácido trimetoxibenzoico, luteolina-7-glucoside, rutina, ácido 3,4-di-hidroximandélico, entre outros. Lafka *et al.*, (2011) para além da oleuropeína, do hidroxitirosol, do ácido p-cumárico e do ácido cafeico identificou nos extratos obtidos do bagaço de azeitona compostos como a catequina, luteolina, ácido trans-cinâmico, entre outros.

A determinação da atividade antioxidante de vários extratos obtidos das extrações líquido-líquido e sólido-líquido também tem sido realizada em vários estudos por diferentes métodos, como por exemplo o método de oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoleico ou o método de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Leouifoudi *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2015). Lafka *et al.* (2011) estudou esta propriedade nos seus extratos, pelo método de DPPH, e concluiu que estes têm atividade antioxidante sendo os extratos obtidos por metanol e etanol os que apresentam um maior valor para esta propriedade, o que está relacionado com a afinidade dos solventes usados na extração para com os compostos presentes na matriz. Lesage-Meessen *et al.* (2001) estudou também a atividades antioxidante de extratos obtidos por extração líquido-líquido usando acetato de etilo 1:1 (v/v), em dois passos de extração, a pH igual a 3, a partir de águas ruças provenientes de sistemas de extração de azeite de duas fases e de três fases, concluindo que os extratos que têm maior capacidade antioxidante são os extratos das águas provenientes do sistema de duas fases o que se relaciona com a composição da matriz.

A recuperação de compostos antioxidantes naturais presentes nos resíduos provenientes da extração de azeite tem cada vez mais sido alvo de estudos, uma vez que se mostra uma forma de valorização interessante na medida em permite acrescentar valor económico à indústria do azeite, dado ao elevado preço de mercado destes compostos e à sua procura por parte da indústria farmacêutica, alimentar e cosmética. Tendo por outro lado a vantagem de que permite uma diminuição destes compostos nas águas ruças e no bagaço de azeitona húmido levando a uma diminuição do seu carácter poluente (Kalogerakis *et al.*, 2013) e da sua biodegradabilidade, o que pode permitir um posterior tratamento biológico.

I. 5. Processos integrados de tratamento de efluentes e valorização de resíduos

Uma vez que as várias formas de tratamento estudadas até agora para as águas ruças não constituem por si só uma solução eficiente e economicamente viável de tratar este efluente, e já que os estudos sobre a recuperação de compostos antioxidantes presentes nas águas ruças se focam na sua grande maioria sobre o potencial de recuperação destes compostos, os problemas associados à geração destes efluentes ainda se encontram por resolver.

Na tentativa de encontrar uma estratégia capaz de solucionar estes problemas, Papaphilippou *et al.* estudaram em 2013 a integração do tratamento com uma forma de valorização das águas residuais dos lagares de azeite. Para tal, submeteu as águas a um processo de coagulação-floculação seguido de uma extração (que se mostrou ser melhor realizada com acetato de etilo) sob diferentes períodos de extração (de entre 0,25 e 24 horas, tendo atingido a equilíbrio a 15 minutos) e um rácio solvente/efluente de 100:50 (v/v), que foi seguido por um processo de foto-Fenton a 20°C, pH igual a três, 0,2 g.L⁻¹ Fe²⁺ e 5 g.L⁻¹ H₂O₂, cuja intensidade da radiação foi de 272,3 W.m⁻². Verificando com este estudo que com o processo de coagulação-floculação segundo as condições ótimas encontradas consegue alcançar uma remoção de carência química de oxigénio de ~72% e de fenóis totais de ~40%, aumentado o valor de CQO com a realização do processo de extração devido à difusão parcial do solvente orgânico no efluente, obtendo uma recuperação de fenóis de 36%, conseguindo depois com a aplicação de foto-Fenton reduzir o CQO e os fenóis ~73% e ~87%, respetivamente.

Deste modo, com este estudo, Papaphilippou *et al.* (2013) conseguiram recuperar alguns compostos fenólicos do efluente através do processo de extração e remover pelo processo foto-Fenton e coagulação-floculação matéria orgânica presente nas águas ruças reduzindo assim a quantidade de compostos poluentes nestas presentes. Contudo, pelo processo de coagulação-floculação acabou por remover 40% de compostos fenólicos que poderiam ter sido talvez recuperados por extração caso esta etapa de tratamento não se tivesse realizado.

O presente estudo foi então um dos poucos que se tem conhecimento, que lidam com a gestão integrada dos efluentes desta agro-indústria, de forma sustentável, pelo que mais estudos nesta área deverão ser realizados, na tentativa de se encontrar outras propostas de integração de estratégias de valorização e de tratamento das águas ruças que sejam capazes de solucionar de forma eficiente e economicamente viável os problemas ambientais causados por estes efluentes.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a recuperação de compostos antioxidantes presentes nas águas ruças provenientes de um sistema tradicional de prensas e de um sistema contínuo de duas fases e no bagaço de azeitona húmido pela aplicação de um processo de extração sequencial, em que são usados três solventes orgânicos diferentes. Avaliando também o potencial de recuperação das águas que passaram por um processo de Fenton e que antes foram ou não sujeitas a uma recuperação de compostos antioxidantes.

II. Materiais e Métodos

II. 1. Matérias-primas

As matérias-primas usadas neste trabalho foram as águas ruças provenientes de um processo de extração tradicional de prensas, recolhidas a 6 de novembro de 2015, no Distrito de Coimbra, Portugal; e as águas ruças e o bagaço de azeitona originários de um processo extrativo de duas fases (com possibilidade de 2 e meia) recolhidos a 16 de dezembro de 2015, na Província de Badajoz, Espanha. As quais foram nomeadas de efluente português (EP), efluente espanhol (EE) e resíduo sólido espanhol (RE) respetivamente para serem mais facilmente identificadas ao longo deste trabalho.

O resíduo sólido espanhol foi armazenado a -18°C e os efluentes foram separadamente homogeneizados durante 25 minutos a uma velocidade de 280 rpm com a ajuda de um homogeneizador (Heidolph Instruments, RZR1) que possui-a um impeler de pás curvas. Posteriormente foram colocados em garrafas de plástico devidamente identificadas e armazenadas a -18°C .

As águas residuais obtidas a partir dos efluentes anteriormente referidos (AREP e AREE), através de processos de extração sequencial realizados, foram também usadas como matérias-primas.

II. 2. Reagentes

Os procedimentos experimentais de extração sequencial foram realizados utilizando: n-hexano ($\geq 95\%$, Carlo erba reagents), diclorometano ($\geq 99,9\%$, Carlo erba reagents) e acetato de etilo ($\geq 99,9\%$, Carlo erba reagents). Os ensaios de atividade antioxidante foram efetuados usando: β -caroteno (Tipo I, -95% de UV, Sigma-Aldrich), Tween 40 (Sigma-Aldrich), ácido linolénico ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich), clorofórmio RPE - para análises-ISO-estabilizado etanol (99% , Carlo erba reagents), etanol ($\geq 99,8\%$, Sigma Aldrich), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma Aldrich) e água Milli-Q (obtida de interlab direct-pure EDI), usando o BHT (butylated hydroxytoluene, 99% , Acrōs organics), o BHA (butylated hydroxyanisole, $\geq 98.5\%$, Sigma-Aldrich) e o L-ácido ascórbico ($> 99\%$, Fisher Chemical) como antioxidantes padrão.

Nas técnicas de HPLC, GC-MS e TLC os produtos químicos usados foram o acetonitrilo ($\geq 99,9\%$, grau HPLC, Carlo erba reagents), ácido fosfórico (85% , Fluka), acetato de etilo ($99,8\%$, Panreac), etanol ($\geq 99,8\%$, Sigma Aldrich), n-hexano ($\geq 95\%$, Carlo erba reagents),

ácido fórmico (98-100%, Sigma-Aldrich), 1,4-dioxano (99,8%, Sigma-Aldrich), acetona (\geq 99,5%, Sigma-Aldrich), tolueno (\geq 99,7%, Sigma-Aldrich), 2 aminoethylphenylborinate (\geq 97,0%, Fluka), polyethyleneglycol (Fluka), metanol (\geq 99,9%, grau HPLC, Carlo erba reagents) e água Milli-Q (obtida de interlab direct-pure EDI).

Como padrões foram usados ácido gálico (\geq 98%, grau HPLC, Fluka), ácido p-cumárico (Sigma Aldrich), ácido trans-cinâmico ($>$ 99%, Sigma Aldrich), ácido vanílico ($>$ 98,5%, Acrōs organics), ácido siríngico ($>$ 98%, Alfa Aesar), 3,4-dihydroxybenzoic acid (\geq 99%, Acrōs organics), tirosol (\geq 99%, grau HPLC, Extrasynthese), hidroxitirosol (\geq 98%, grau HPLC, Extrasynthese), oleuropeína (\geq 98%, grau HPLC, Extrasynthese), ácido cafeico ($>$ 99%, grau HPLC, Sigma Aldrich), ácido mandélico (Sigma Aldrich) na análise por HPLC, sendo o esqualeno (\geq 98%, Sigma Aldrich), o ácido oleico (\geq 99%, Sigma Aldrich), o (R)-(+)-limoneno (Fluka), o β -cariofileno Kosher (\geq 98%, Sigma Aldrich) e o α -pineno (98%, Sigma Aldrich) utilizado como padrão no GC-MS.

No processo de Fenton os reagentes usados foram: catalase de fígado bovino (Sigma Aldrich), fosfato monossódico (99,95%, Sigma-Aldrich), fosfato dissódico (99%, Sigma-Aldrich) peróxido de hidrogénio (33% w/v (110 v), Panreac), sulfato de ferro heptahidratado (Acrōs organics) e ácido sulfúrico (95-97%, Sigma Aldrich).

Na determinação da carência química e bioquímica de oxigénio foram usados: dicromato de potássio (99,8%, Sigma Aldrich), sulfato de prata (Carlo erba reagents), ácido sulfúrico (95-97%, Sigma Aldrich), hidrogenoftalato de potássio (Panreac), sulfato de mercúrio (II) (Panreac), cloreto de cálcio anidro (Sigma Aldrich), cloreto de férrico hexahidratado (\geq 99%, Fluka), sulfato de magnésio (\geq 99,99%, Sigma Aldrich), dihidrogenofosfato de potássio (Sharlau), hidrogenofosfato de dipotássio (\geq 98%, Fluka), cloreto de amónia (99,8%, Merck), hidrogenofosfato disódico heptahidratado (98.0-102.0%, Fluka), D(+)-glucose anhydrous (Scharlau) e ácido glutâmico (99%, Alfa Aesar), pelo que na determinação do teor de fenóis foram usados: Folin-Ciocalteu (Applichem Panreac), carbonato de sódio (Sharlau) e ácido gálico (\geq 98%, grau HPLC, Fluka).

II. 3. Procedimento experimental da extração sequencial

Os efluentes usados neste trabalho foram sujeitos a um processo de extração líquido-líquido sequencial, como apresentado na Figura 2, em pequena escala, onde foram submetidos a três passos de extração em sequência. O primeiro solvente utilizado foi o n-hexano (H) para

extrair os lípidos, seguidamente foi usado o diclorometano (D) para extrair outros compostos de baixa polaridade (como ceras e esteróis) que ainda se encontram presentes na matriz, e por fim foi usado o acetato de etilo (A) para extrair os compostos fenólicos (Stalikas, 2007; Araújo *et al.*, 2015).

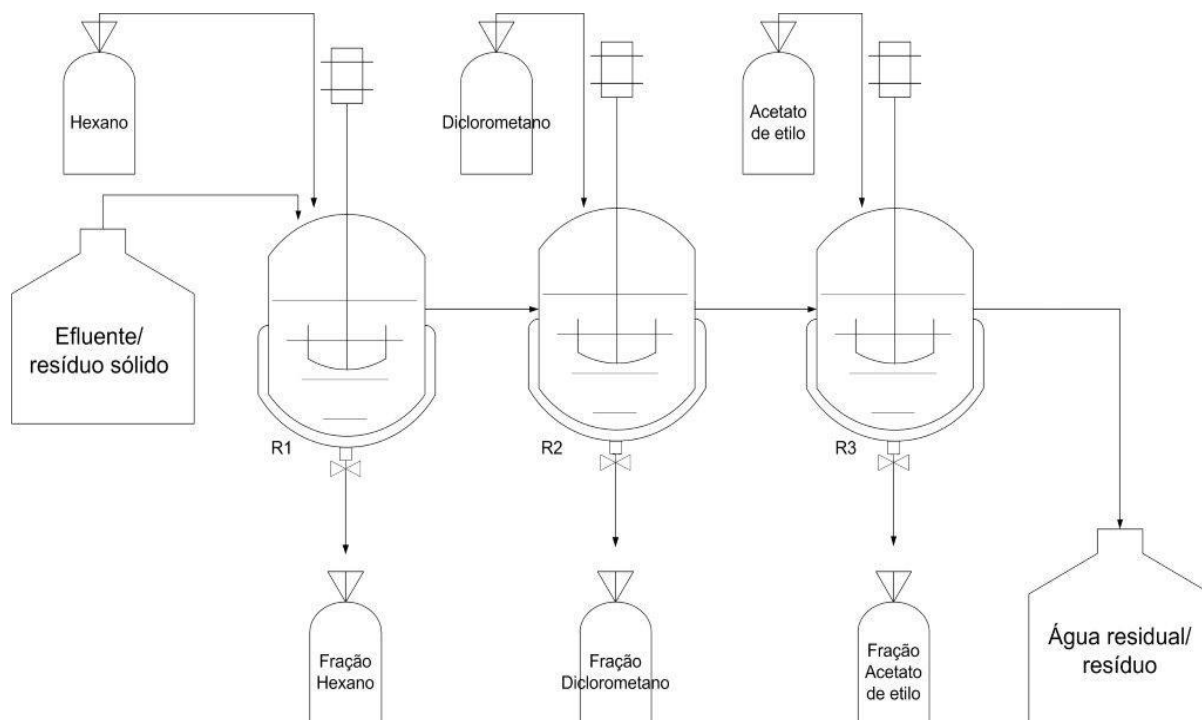


Figura 2 - Diagrama do processo de extração sequencial.

Assim, o efluente, previamente homogeneizado e filtrado (com um crivo) e o n-hexano foram colocados, numa proporção solvente/matéria-prima de 1:1 (v/v), numa ampola de decantação que durante um dia e meio ficou ao abrigo da luz, tendo sido agitada manualmente a cada duas horas. Ao fim deste período o n-hexano foi retirado da ampola de decantação e mais 50 mL de n-hexano foram adicionados ao efluente, de forma a continuar a extração com este solvente por mais duas horas, ao abrigo da luz, para remover o restante dos lípidos. No final deste tempo, o n-hexano foi retirado e adicionado ao anteriormente recolhido para posterior evaporação, num evaporador rotativo (Buchi, Rotavapor[®] R-210), de forma a se concentrar a fração.

Sequencialmente foi adicionado diclorometano ao efluente fracionado, que nas mesmas proporções e sob as mesmas condições operacionais do solvente anterior continuou o processo de extração, e finalmente o acetato de etilo foi utilizado da mesma forma para finalizar o processo sequencial de extração.

O resíduo sólido foi também sujeito a um processo de extração (sólido-líquido) sequencial, em pequena escala, o qual se diferiu do procedimento de extração líquido-líquido sequencial apenas no facto de em vez de se usar uma proporção solvente/matéria-prima de 1:1 (v/v) se usar uma proporção solvente/matéria-prima de 5:4 (v/m) e do processo ser realizado num *Erlenmeyer* com agitação permanente, tendo a cada duas horas sofrido uma agitação mais intensa.

Os procedimentos de extração sequencial, em pequena escala, foram efetuados em triplicado para os dois efluentes e para o resíduo sólido. E, tiveram como objetivo apenas analisar o comportamento do material perante o processo de extração sequencial usado, pelo que as frações obtidas foram apenas sujeitas a análises em TLC para treinamento e identificação dos solventes para boa separação. E, as águas que restaram destes processos foram liofilizadas (Snijders scientific type 2040), não tendo sido alvo de tratamento nem de análise.

A aplicação destes processos permitiu verificar que dada a natureza química das matérias-primas usadas ao se aplicar uma agitação manual ao processo ocorria a formação de emulsões.

Aumento da escala experimental - Os efluentes usados neste trabalho foram separadamente sujeitos a um processo de extração líquido-líquido sequencial, que foi realizado numa escala cinco vezes maior à apresentada anteriormente, com uma agitação permanente e um aquecimento simultâneo, num período de tempo mais reduzido.

Desta forma, o efluente, previamente homogeneizado e filtrado, e n-hexano foram adicionados, numa proporção solvente/matéria-prima de 1:1 (v/v) ao reator com capacidade total de 1 litro, em que apenas metade da sua capacidade foi usada. Este reator operou durante 7 horas, a 40°C, sob agitação e ao abrigo da luz. Ao fim desse tempo a agitação e o aquecimento foram parados e 30 minutos depois o n-hexano foi retirado para posterior evaporação dum evaporador rotativo de forma a concentrar a fração, sendo muitas vezes necessário colocar a mistura solvente/efluente no frio para facilitar a separação das duas fases. Sequencialmente foi colocado diclorometano e acetato de etilo numa proporção solvente/matéria-prima de 1:1 (v/v), no mesmo reator que sob as mesmas condições de operação, permitiu que o processo de extração continuasse e a extração fracionada fosse realizada.

O resíduo sólido foi também sujeito a um processo de extração sólido-líquido sequencial. Entretanto pela natureza do resíduo (bagaço de azeitona húmido) a proporção de solvente/matéria-prima foi alterada para 2,5:1 (v/m). Sólido e solvente foram homogeneizados

num ultra-torrax[®] (IKA[®] basic T 18) durante 2 minutos. De seguida, foram colocados no reator a 40°C, sob agitação e ao abrigo da luz, durante 7 horas. Ao fim desse tempo o solvente foi retirado para posterior evaporação dum evaporador rotativo e diclorometano e acetato de etilo foram sequencialmente adicionados ao reator (na mesma proporção solvente/matéria-prima) que sob as mesmas condições de operação permitiu que o processo de extração fracionada continuasse.

No que diz respeito à agitação usada é importante referir que esta foi efetuada no reator com um impeller de pás côncavas com a ajuda de um homogeneizador (Heidolph Instruments, RZR1). Sendo que no caso da extração líquido-líquido sequencial a velocidade de agitação no primeiro e segundo passo foi maior que no terceiro dado à maior viscosidade da mistura solvente/matéria-prima nestes dois passos. Na extração sólido-líquido sequencial a velocidade de agitação no primeiro passo foi maior que nos outros dois devido à mesma razão.

Os procedimentos de extração sequencial, em maior escala, foram realizados em duplicado para o resíduo sólido e para o efluente espanhol e em triplicado para o efluente português e todas as frações obtidas nestes processos foram armazenadas a -18°C para posterior análise, sendo as águas residuais do efluente português e espanhol (AREP e AREE, respetivamente) resultantes dos processos de extração líquido-líquido também armazenadas a -18°C para posterior tratamento, tendo-se separado 50 mL de cada uma destas para liofilização e posterior análise.

II. 4. Procedimento do Processo de Fenton

As águas residuais do efluente, português e espanhol, resultantes de um dos processos de extração líquido-líquido sequencial realizados e os efluentes português e espanhol que não passaram por estes processos foram separadamente sujeitos ao processo de Fenton. Estas reações foram realizadas para diferentes valores de rácio H_2O_2/CQO (m/m) e H_2O_2/Fe^{2+} (mol/mol), que se apresentam na Tabela 1. É importante referir que os valores dos rácios H_2O_2/CQO e H_2O_2/Fe^{2+} usados tiveram por base valores usados por Lucas e Peres (2009) no seu estudo.

Alguns dos ensaios foram realizados aleatoriamente em duplicado para avaliar a reprodutibilidade do processo tendo-se obtido um desvio-padrão máximo na remoção de carência química de oxigénio de 4,9%.

Tabela 1 - Condições usadas em cada uma das reações de Fenton efetuadas a cada efluente e a cada água residual.

Experiência	1	2	3	4
H ₂ O ₂ /CQO (m/m)	1,75	1,75	2,5	2,5
H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (mol/mol)	7,5	22,5	7,5	22,5

Cada uma das reações efetuadas contou com a adição de 20 mL de amostra (pH 3 corrigido com ácido sulfúrico) a um reator descontínuo ao qual se acrescentou as respectivas quantidades de Ferro (sob a forma de Sulfato de Ferro heptahidratado) e, de seguida, peróxido de hidrogénio para dar início à reação, que ocorre durante 150 minutos, sob agitação contínua de 160 rpm, num agitador orbital (Heidolph Roax 20). Ao fim desse tempo, o reator é retirado da agitação e o pH é acertado para o valor de 7 com hidróxido de sódio (NaOH), sendo adicionado algumas gotas de solução de catalase (100 mg.L⁻¹) para consumir o peróxido de hidrogénio residual, devido à interferência que este exerce sobre as técnicas analíticas usadas para caracterizar as águas tratadas (nomeadamente a carência química em oxigénio).

A fim de determinar a remoção total de peróxido foi usada uma tira indicadora deste composto (Peroxide Indicator strips de 0-400ppm, Scharlau; Quantofix[®] peroxides test sticks de 0,5 a 25 mg/L, Sigma Aldrich), pelo que só ao fim da concentração atingir o valor de zero é que se sujeitam, separadamente, as águas a uma filtração usando MS[®] Nylon Membrane Filter (0,45 µm) para serem posteriormente analisadas.

II. 5. Caracterização das frações dos resíduos da indústria do azeite

II. 5.1. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

A identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes nas frações obtidas nos procedimentos de extração sequencial, em escala maior, e nas águas residuais recolhidas no final destes processos foram realizadas por HPLC.

As análises foram realizadas a 26°C, utilizando um sistema de HPLC (Prominence UFLC Shimadzu - SPDM20A) e utilizando uma coluna Eurospher 100-5C18 RP (250×4 mm i.d., 5 mm, Germany).

As condições cromatográficas foram baseadas nas já relatadas na literatura por Mulinacci *et al.* (2001). Desta forma, a fase móvel usada foi constituída por água (ajustada para pH 3,2

com ácido fosfórico) (A) e acetonitrilo (B) e empregada a uma taxa de fluxo de 1 mL/min, tendo sido aplicado um gradiente de eluição para um tempo total de funcionamento de 120 minutos que consistiu em: aos 0 minutos: 100% de A; aos 3 minutos: 89% de A, 11% de B; aos 41 minutos: 87% de A, 13% de B; aos 55 minutos: 80% de A, 20% B; aos 70 minutos: 75% de A, 25% B; aos 85 minutos: 65% de A, 35% B; aos 96 minutos: 55% de A, 45% B; e dos 99 minutos até final: 100% de A.

As frações e as amostras de água liofilizadas ou evaporadas foram re-suspendidas e dissolvidos em acetonitrilo numa concentração de 20 mg/mL e os perfis cromatográficos de cada amostra injetada (5 µL) foram medidos a 215, 240, 254, 280, 330 e 350 nm e os compostos fenólicos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção com as soluções padrão previamente preparadas no intervalo de concentração entre 0,11 a 1 mg.mL⁻¹.

A quantificação de quatro destes compostos (oleuropeína, tirosol, ácido p-cumárico e ácido sirínico) foi realizada através de uma curva padrão (Anexo A – Tabela A1) preparada para cada um deles através da solução padrão correspondente injetada em várias concentrações.

II. 5.2. Cromatografia em fase gasosa (GC)

A composição das frações obtidas nos procedimentos de extração sequencial foi determinada utilizando um sistema de cromatografia gasosa (Agilent Technologies, 7890A GC, GC Systems) acoplado a um detetor de espectrometria de massa (Agilent Technologies, 5975C inert MSD com with Triple-Axis Detetor) e equipado com uma coluna DB Wax (30 m× 0.53 mm, i.d., 1.00 µm). O gás transportador usado foi o hélio (3 mL / min) e 1 µL de amostra diluída em acetato de etilo a uma concentração de 10 mg/mL foi injetada, sendo o split de 9 mL/minuto.

A temperatura do injetor foi de 220°C e a do detetor foi de 300°C, sendo a rampa de temperatura de 100 a 220°C a uma taxa de 20°C/min e posterior de 220 a 250°C a uma taxa de 10°C/min mantendo a temperatura a 260°C durante 15 minutos, numa programação de 24 minutos.

A identificação dos compostos baseou-se na análise comparativa de espectros de massa das substâncias com as dos bancos de dados do sistema de CG-MS (NIST e FFNSC 2) ou com base na comparação com as soluções padrões injetadas a uma concentração de 0,47 a 1 mg.mL⁻¹.

A determinação da percentagem relativa dos compostos identificados nas frações foi depois realizada usando um detetor de ionização de chama (FID) e a quantificação de dois dos compostos identificados foi realizada através de uma curva padrão (Anexo A – Tabela A2).

II. 5.3. Cromatografia em camada fina (TLC)

As frações obtidas nos processos de extração sequencial, realizados em pequena escala, foram diluídas em acetato de etilo, numa concentração de 5 mg/mL, e analisadas por TLC para treinamento e identificação dos solventes para boa separação de compostos. As análises foram efetuadas usando placas de sílica gel (20 cm x 20 cm com indicador de fluorescência – 254 nm, Fluka) sendo testadas várias fases móveis (Tabela 2), contando com a aplicação de uma solução de NP-PEG (1% de 2aminoethyldiphenylborinate em metanol e 5% de polyethyleneglycol- 4000 em etanol) como reagente de pulverização para revelar fenóis.

Tabela 2 – Fases móveis testadas.

1	Acetato de etilo: n-hexano – 1/1 (v/v)
2	Acetato de etilo: n-hexano – 2/8 (v/v)
3	Acetato de etilo: acetona: água – 30:10:0,3 (v/v/v)
4	Acetato de etilo: ácido fórmico: água – 65:15:20 (v/v/v)
5	Acetato de etilo: ácido fórmico: etanol – 65:15:20 (v/v/v)
6	Acetato de etilo: 1,4-dioxano: água – 30:10:0,3 (v/v/v)
7	Acetato de etilo: ácido fórmico: tolueno – 65:15:20 (v/v/v)
8	Acetato de etilo: ácido fórmico: tolueno – 40:15:45 (v/v/v)

II. 5.4. Atividade antioxidante

Método de DPPH - A atividade antioxidante das frações obtidas nos procedimentos de extração sequencial, das águas recolhidas no final destes procedimentos e de três padrões de antioxidantes (BHA, BHT e ácido ascórbico) foi determinada pelo método de DPPH que teve por base os procedimentos descritos por Rodríguez-Rojo *et al.* (2012), Stako *et al.* (2007) e Mensor *et al.* (2001).

Para tal, as frações, as amostras de água e os padrões foram diluídos em etanol até às concentrações finais de 250, 500 e 1000 µg/mL, tendo alguns deles sido também diluídos até

uma concentração de 100, 150 e 300 µg/mL. Seguidamente, 250 µL de uma solução de DPPH em etanol a 0,3 mM foi misturada a 625 µL de uma solução de amostra diluída a uma dada concentração (ou a 625 µL de etanol no caso do controlo da reação). A mistura reacional foi vigorosamente agitada e deixada no escuro durante precisamente 30 minutos e após esse tempo os valores de absorvância foram medidos a 517 nm. De seguida, preparou-se o branco que teve por base a adição de 250 µL de etanol a 625 µL da solução de amostra diluída sendo também os valores de absorvância desta mistura medidos a 517nm num espectrofotómetro (Jasco V-550 - UV/VIS spectrophotometer).

Por fim, as absorvâncias obtidas foram convertidas na percentagem de atividade antioxidante (AA), utilizando a equação 8:

$$\%AA = \left(1 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controlo}}\right) \times 100 \quad (8)$$

onde: a $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional; a Abs_{branco} é a absorvância da solução de amostra diluída em etanol/solução de etanol; e a $Abs_{controlo}$ é a absorvância da solução de DPPH diluída em etanol.

A atividade antioxidante foi medida em triplicado para todas as amostras.

Método de oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linolénico - A atividade antioxidante das frações obtidas nos procedimentos de extração sequencial, das águas recolhidas no final destes procedimentos e de três padrões antioxidantes (BHA, BHT e ácido ascórbico) foi determinada pelo método da oxidação acoplada do β-caroteno e ácido linolénico, que teve por base a metodologia descrita por Hammerschmidt e Pratt (1978), com algumas modificações (Braga *et al.*, 2008)

O substrato da reação foi preparado pesando 10 mg de β-caroteno, 60 mg de ácido linolénico e 200 mg de Tween 40 para um balão de fundo redondo, ao qual se adicionou 10 mL de clorofórmio e, se levou durante um hora, ao abrigo da luz, a um evaporador rotativo (a 470 mbar e a 50°C) para concentrar a solução. Tendo-se colocado de seguida no referido balão 50 mL de água bidestilada de forma a diluir a solução.

A reação de oxidação foi realizada adicionando 1 mL de substrato a 2 mL de água bidestilada e 0,05 mL de amostra diluída em etanol numa concentração de 5 mg/mL (ou no caso do controlo 0,05 mL de etanol). A mistura, depois de ligeiramente agitada, foi colocada num banho (Thermo Electron Corporation Haake DC30) a 40°C e ao escuro, e o produto reacional

foi monitorizado a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de reação, por leituras de absorvância a 470 nm num espectrofotómetro (Jasco V-530 - UV/VIS spectrophotometer).

As absorvâncias medidas foram depois convertidas na percentagem de inibição da oxidação através da equação 9:

$$\text{Inibição da oxidação(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Abs}_{amostra}^{t_0} - \text{Abs}_{amostra}^{t_n}}{\text{Abs}_{controlo}^{t_0} - \text{Abs}_{controlo}^{t_n}} \right) \right] * 100 \quad (9)$$

onde a Abs^{t_0} é a absorvância no tempo zero e Abs^{t_n} é a absorvância no tempo t_n (0 horas $< t_n \leq$ 4 horas). A percentagem de inibição da oxidação foi calculada em triplicado para todas as amostras.

II. 6. Caraterização das amostras líquidas

Nesta secção são descritas as principais técnicas analíticas que foram usadas para avaliar as características dos efluentes originais (EE e EP), das águas residuais resultantes do processo de extração sequencial (AREP e AREE), das águas residuais dos efluentes português e espanhol que passaram por um processo de extração sequencial e por um processo de Fenton (AREPF e AREEF, respetivamente) e dos efluentes português e espanhol que apenas sofreram um processo de Fenton não passando pelo processo de valorização (EPF e EEF, respetivamente).

II. 6.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)

A carência química de oxigénio permitiu medir a quantidade de matéria orgânica suscetível de ser oxidada por meios químicos que existia numa amostra líquida, sendo este parâmetro determinado por um método que usa o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como um forte oxidante da matéria orgânica, sob condições ácidas e na presença de sulfato de prata (AgSO_4) como catalisador.

Para a determinação do CQO foi necessário preparar então uma solução ácida (9,6 g de sulfato de prata por litro de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado) e uma solução digestão que foi realizada colocando 14 g de dicromato de potássio durante 2 horas na estufa a 105°C, que foram depois arrefecidas num exsiccador, tendo de seguida se retirado desta quantidade apenas

10,210 g para diluir em 500 mL de água destilada num balão de 1 L, ao qual foi ainda adicionado 167 mL de H₂SO₄ concentrado e 33,3 g de sulfato de mercúrio (II) (HgSO₄), deixando arrefecer à temperatura ambiente para perfazer até 1 L com água destilada.

Assim, para esta análise foi colocado, em cada tubo de reação, 1 mL de amostra, 1,2 mL de solução digestão e 2,8 mL de solução ácida, tendo sido realizadas três réplicas para cada amostra e preparado o branco que em vez de 1 mL de amostra contém 1 mL de água destilada. Pelo que os tubos de reação depois de preparados foram todos agitados suavemente e colocados no termoreator (ECO 25) a 105°C durante duas horas, lendo-se após arrefecer 1 hora no escuro, até à temperatura ambiente, a absorvância a 605 nm, no fotómetro (Photometer MPM 3000).

Uma vez lidas as absorvâncias, foi necessário efetuar uma curva de calibração (Anexo A- Tabela A3), de forma a transformar os valores de absorvância em mg de O₂.L⁻¹, pelo que esta foi construída a partir de soluções de hidrogenoftalato de potássio (KHP) de diferentes concentrações, definidas de acordo com a gama operacional de 500-2000 mg O₂.L⁻¹.

II. 6.2. Teor de fenóis (TPh)

A determinação do teor de fenóis foi realizada usando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Martins *et al.*, 2008. Assim, 20 µL de amostra foram introduzidos numa cuvete de 2 mL bem como 1,58 mL de água destilada e 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu, sendo que ao fim de 3-6 minutos também foram introduzidos 300 µL de uma solução de carbonato de sódio saturado. A solução resultante foi depois deixada no escuro por 2 horas e ao fim desse tempo a absorvância foi determinada num espectrofotómetro (T60 U, instrumentos PG) a 765 nm, contra um ensaio em branco, contendo 20 µL de água destilada em vez da amostra. O teor fenólico foi medido em duplicado para todas as amostras sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico, uma vez que se realizou uma curva de calibração (Anexo A- tabela A4) utilizando diferentes concentrações deste composto.

II. 6.3. Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅)

A carência bioquímica de oxigénio permitiu quantificar a matéria orgânica biodegradável existente numa determinada amostra, através da medição da quantidade de oxigénio consumida na sua degradação por processos biológicos. A determinação deste parâmetro

requeriu o ajuste do pH das amostras para valores entre 6,5 e 7,5 e a preparação separadamente de diferentes soluções de nutrientes (22,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio; 27,5 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio anidro; 0,25 g.L⁻¹ de cloreto férrico hexahidratado), bem como de uma solução tampão que consiste em 8,5 g.L⁻¹ de dihidrogenofosfato de potássio, 21,75 g.L⁻¹ de hidrogenofosfato de dipotássio, 1,7 g.L⁻¹ de cloreto de amónia e 33,4 g.L⁻¹ de hidrogenofosfato disódico heptahidratado. De seguida foi preparada a água de diluição que consistiu na adição de 1 mL de cada uma das três soluções de nutrientes por cada litro de água destilada, a qual foi agitada e deixada 1 hora em repouso, adicionando-se depois 1 mL de solução tampão também por cada litro de água, tendo esta ficado 24 horas a arejar de forma a ficar saturada em oxigénio.

Uma solução de inóculo preparou-se dissolvendo 5 g de terra de jardim em 500 mL de água destilada a qual é agitada durante 10 minutos e deixada sedimentar, sendo retirado de seguida 1 mL de sobrenadante para um balão de 100 mL, perfazendo de seguida este volume com água destilada.

Depois das soluções anteriormente referidas estarem preparadas a determinação do CBO₅ pode ser realizada colocando-se num *Erlenmeyer* (300 mL de boca esmerilhada) 0,3 mL de inóculo, volume de amostra de acordo com a gama de CQO a que corresponde (Anexo A, Tabela A5) e água de diluição até ao topo, sendo isto realizado em duplicado para cada amostra e para o branco que é apenas constituído por inóculo e água de diluição.

Após a preparação de todos os *Erlenmeyers* mediu-se o oxigénio dissolvido inicialmente nas amostras ([O₂]₀) e no branco ([O₂]_{BO}), com auxílio de um medidor automático de oxigénio dissolvido (WTW INOLab 740) e após isto colocaram-se os *Erlenmeyers* durante cinco dias a 20°C, no escuro e mediu-se ao fim deste tempo novamente a quantidade de oxigénio dissolvido nas amostras ([O₂]_F) e no branco ([O₂]_{BF}), calculando-se o CBO₅ através da equação 10:

$$CBO_5 (mg O_2 \cdot L^{-1}) = \frac{([O_2]_0 - [O_2]_F) - ([O_2]_{BO} - [O_2]_{BF})}{\frac{V_{amostra}}{V_{total}}} \quad (10)$$

Simultaneamente e de forma a verificar se o teste foi efetuado corretamente mediu-se o CBO₅ de uma solução padrão (150±1 mg de glucose desidratada e igual quantidade de ácido glutâmico, previamente secos durante 1 hora na estufa a 105°C, dissolvidos em 50 mL de água destilada), sendo neste caso usado 20 mL de amostra, ao qual o valor deste parâmetro se deve encontrar no intervalo de 198±30,5 mg O₂.L⁻¹.

II. 6.4. Fitotoxicidade

O nível de toxicidade foi determinado com recurso ao método de germinação de sementes de agrião de jardim (*Lepidium sativum*) descrito por Trautmann and Krasny (1997) com modificações. Para tal, foi adicionado 1,5 mL de amostra líquida, a duas réplicas, para humedecer o papel de filtro disposto numa caixa de *petri* e em cada caixa foram depois distribuídas uniformemente 10 sementes de *Lepidium sativum*, pelo que as caixas foram de seguida fechadas e colocadas por 48 horas numa estufa a 25°C, num ambiente escuro. Do mesmo modo dois controlos foram também preparados mas na vez de amostra líquida colocou-se 1,5 mL de água destilada em cada caixa de *petri*.

Ao fim das 48 horas as caixas são retiradas na estufa e analisadas quanto ao número de sementes germinadas em cada uma das caixas (N_{SG}), bem como quanto ao seu comprimento (L_R), sendo o índice de germinação, GI, calculado através da equação 11 usando os parâmetros RSG (percentagem relativa de germinação de sementes) e RRG (percentagem relativa de comprimento de raízes) obtidos pela equação 12 e 13, respetivamente:

$$GI(\%) = \frac{RSG * RRG}{100} \quad (11)$$

$$RSG(\%) = \frac{N_{SG,T}}{N_{SG,B}} \times 100 \quad (12)$$

$$RRG(\%) = \frac{L_{R,T}}{L_{R,B}} \times 100 \quad (13)$$

$N_{SG,B}$ é a média aritmética do número de sementes que germinaram no branco, $N_{SG,T}$ é a média aritmética do número de sementes que germinaram em cada caixa com amostra, $L_{R,B}$ é comprimento médio das raízes no branco e $L_{R,T}$ é comprimento médio das raízes nos ensaios com amostra.

Os índices de germinação são classificados em termos de fitotoxicidade de acordo com a tabela A6 do anexo A.

III. Resultados e Discussões

III. 1. Análise do efeito do solvente da extração sequencial na composição das frações obtidas

Uma vez que, a composição das águas ruças pode variar com o tipo de sistema de extração de azeite usado, dois efluentes provenientes de sistemas de extração de azeite diferentes (efluente português: sistema tradicional de prensas e efluente espanhol: sistema de centrifugação de duas fases) foram sujeitos a processos de extração líquido-líquido sequencial, de forma a se poder identificar quais as diferenças existentes entre estes.

O bagaço de azeitona húmido, proveniente do mesmo sistema de centrifugação de duas fases que o efluente espanhol, foi também alvo de processos de extração sequencial, de forma a identificar a diferente composição entre estes dois resíduos, uma vez que se sabe que os compostos antioxidantes presentes nas azeitonas que não foram parar ao azeite durante o seu processamento encontram-se divididos por estes dois resíduos.

Nos processos de extração líquido-líquido efetuados, em pequena escala, verificou-se então que ao se aplicar uma agitação ao processo havia a formação de emulsões, como se pode ver pela Figura 3, dada a natureza química das matérias-primas. Estas emulsões apresentavam estabilidade diferente dependendo do efluente usado e do passo de extração realizado. Desta forma, observou-se que no primeiro e no segundo passo da extração que usou n-hexano e diclorometano como solventes, respetivamente, houve a formação de emulsões mais estáveis que no terceiro passo o que dificulta a separação do solvente da água. Isto deve-se ao fato de nos dois primeiros passos existirem mais compostos para além dos lípidos (como por exemplo fenólicos) na matéria-prima que ajudam a manter a estabilidade das emulsões (Sørensen *et al.*, 2008) deixando estes de estar presentes na matriz quando esta segue para o terceiro passo da extração, o que leva a uma menor estabilidade das emulsões formadas.

Na realização dos processos anteriormente referidos verificou-se também que, quando a matéria-prima usada era o efluente espanhol as emulsões formadas tinham uma maior estabilidade que quando se usava o efluente português, o que dificultava a separação das fases no final de cada passo do processo.

A maior estabilidade destas emulsões está relacionada com a presença no efluente espanhol de uma maior quantidade de óleo vegetal e da carga orgânica (Tabela 3), que favorece a formação de alguns complexos durante a formação da emulsão óleo em água de acordo com o pH das soluções (Sørensen *et al.*, 2008). Além disso, a presença de compostos fenólicos da

azeitona que são anfífilos na natureza e que apresentam uma maior solubilidade em água do que na fase oleosa (Preedy e Watson, 2010; Sørensen *et al.*, 2008), poderá também ser responsável por ajudar a manter esta estabilidade uma vez que estes compostos podem atuar como tensoativos.

Tabela 3 - Caraterísticas dos efluentes.

	Massa volúmica (g/mL)	pH inicial	pH no fim do processo de extração	CQO inicial (mg O ₂ .L ⁻¹)	TPh inicial (mg ácido gálico.L ⁻¹)
EP	1,03	5,6 ± 0,06	4,7 ± 0,02	4307,15 ± 282,30	432,59 ± 44,63
EE	0,97	4,6 ± 0,01	4,5 ± 0,00	4584,36 ± 392,04	364,64 ± 12,78

No que diz respeito aos processos de extração sólido-líquido sequencial, em pequena escala, (Figura 3) estes também apresentaram a formação de emulsões, dado que o resíduo sólido é também constituído por água. No entanto, estas não exibiam tanta estabilidade como as formadas pelos efluentes, facilitando assim a separação das fases.

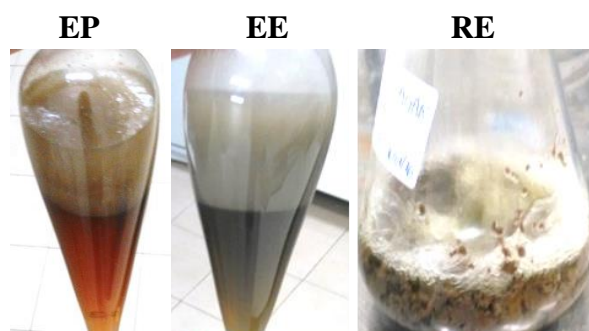


Figura 3 – Efeito do solvente na extração fracionada para as diferentes matérias-primas perante o primeiro passo do processo de extração sequencial, em pequena escala: EP, EE, RE.

Os ensaios em menor escala foram apenas realizados para verificar o efeito dos solventes na extração fracionada para as diferentes matérias-primas usadas. As frações obtidas destes foram apenas sujeitas a análises em TLC (Anexo B) para treinamento e identificação dos solventes para boa separação. A técnica de TLC é um processo de separação mas, o facto das frações apresentarem uma composição complexa fez com que esta não permitisse uma separação dos compostos fracionados de forma a identificá-los e não possibilitasse a comparação das frações entre si, com os efluentes propostos. Entretanto a técnica permitiu compreender o processo de separação que é semelhante às outras cromatografias aplicadas como o HPLC e GC.

Ao aumentar a escala da extração sequencial optou-se por aplicar uma agitação mecânica contínua em vez de uma agitação manual (de 2 em 2 horas) de forma a garantir uma melhor homogeneização do processo. Esta homogeneização levou à formação de emulsões (Figura 4), tal como se observou nos processos em escala menor, mas aparentemente mais estáveis. De forma, a solubilizar ainda mais compostos de interesse nos solventes aumentou-se também a temperatura da extração sequencial, de temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) para 40°C , pelo que se pode diminuir a duração desta etapa.

Assim, daqui para a frente só foram realizadas análises às frações obtidas nos processos de extração sequencial, na maior escala realizados.

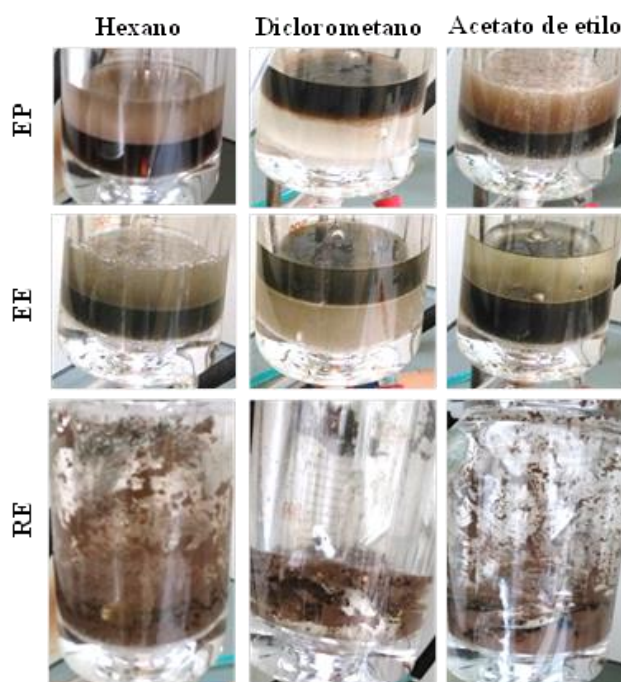


Figura 4 - Efeito do solvente dos três passos de extração fracionada nas frações obtidas, realizada na maior escala, para as diferentes matérias-primas (EP, EE e RE).

III. 2. Análise dos rendimentos das frações obtidos nos processos de extração sequencial.

Nos processos de extração sequencial realizados os rendimentos mássicos (m/m) das diferentes frações, obtidas a partir de cada um dos três solventes usados e para as várias matérias-primas apresentaram valores diferentes, como se pode ver pela Figura 5.

Nesta figura 5, pode-se verificar então que as frações obtidas no passo de extração que usou o n-hexano como solvente são aquelas que apresentaram maiores rendimentos para qualquer matéria-prima utilizada, seguindo-se as obtidas no passo que usou o diclorometano e por fim

as que foram obtidas no passo que utilizou acetato de etilo. Isto deve-se ao fato de, quando é realizado o passo de extração com n-hexano, a matriz é pela primeira vez sujeita a extração, com recurso a um solvente com capacidade de extrair os lípidos, que constituem uma importante fração destes resíduos. Uma vez o efluente deslipidificado, o diclorometano vai extrair uma menor quantidade de compostos, comparativamente aos extraídos anteriormente, pois este solvente vai apenas recuperar os compostos de baixa polaridade com afinidade para com ele, que não tiveram afinidade para com o n-hexano. Por fim, quando se usa o acetato de etilo como solvente, para se obter compostos fenólicos e outros, o efluente de extração que já foi sujeito a dois passos de extração, contém ainda menos compostos com afinidade para com este solvente, daí a recuperação de compostos alcançada ser ainda menor.

Na Figura 5 pode-se também observar que os rendimentos das frações obtidas a partir do resíduo sólido e do efluente resultantes do mesmo sistema de extração de azeite (RE e EE) variam tendo estes sido maiores para o caso do resíduo sólido. O maior rendimento da primeira etapa está também associado à maior quantidade de azeite que vem parar aos resíduos produzidos pelo sistema de extração de azeite contínuo de duas fases, pois anteriormente também foi verificado que durante os processos de extração havia a formação de emulsões mais estáveis (Figura 4) por parte do efluente espanhol do que por parte do português, devido à maior quantidade de óleo vegetal que o primeiro efluente apresenta.

Os rendimentos das frações obtidas a partir do efluente português são ligeiramente maiores que as obtidas a partir do efluente espanhol, devido à diferente composição que estes apresentam que leva à formação de emulsões mais estáveis para o caso deste último efluente, que dificulta a separação das fases e assim a obtenção das frações.

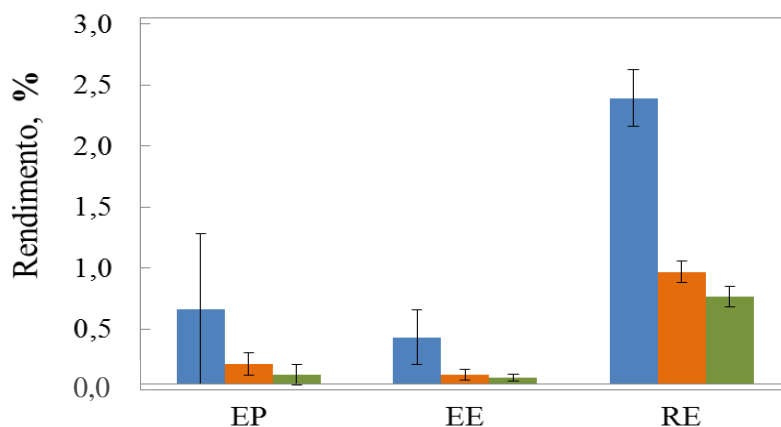


Figura 5 - Rendimentos das diferentes frações obtidas a partir das várias matérias-primas usadas (% mássica). ●Hexano, ●Diclorometano ●Acetato de etilo.

No final destes processos de extração sequencial foram então recuperadas as águas residuais resultantes destes para posterior tratamento e análise, não tendo sido recuperado o resíduo sólido uma vez que este não ia ser alvo de tratamento nem de análise. Os resultados da recuperação das águas encontram-se apresentados na figura 6 A.

As análises efetuadas às águas contaram com a determinação da carência química de oxigénio e do conteúdo fenólico das águas antes e após extração, pelo que os resultados do aumento do CQO e da remoção de fenóis das águas estão apresentados na figura 6.

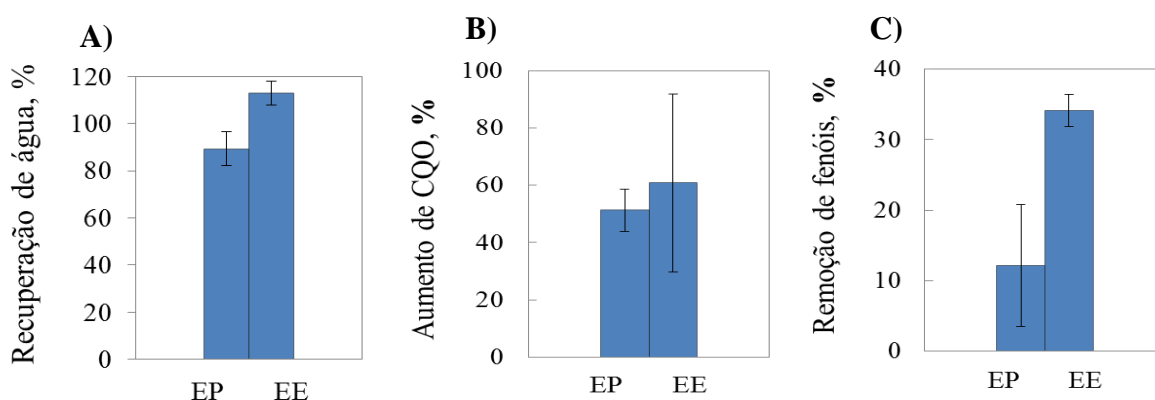


Figura 6 - A) Recuperação de água residual no final dos processos de extração líquido-líquido sequencial. B) Aumento do CQO nos efluentes, causado pelo processo de extração líquido-líquido sequencial. C) Remoção dos compostos fenólicos presentes nos efluentes pelo processo de extração líquido-líquido sequencial.

Após os processos de extração verificou-se que há tendências para aumentar o valor do CQO nas águas que foram sujeitas a extração sequencial, como é possível ver pela Figura 6B. O que está relacionado com a presença de solventes usados nos passos de extração que não foram totalmente separados do efluente. Pelo que, o aumento da carência química de oxigénio apurado foi de $51,36 \pm 17,53\%$ para efluente português e $60,86 \pm 30,96\%$ para o espanhol.

O aumento do CQO foi também verificado por Papaphilippou *et al.*, (2013) no seu estudo que teve por base a aplicação sequencial de coagulação-floculação, extração com solvente e oxidação foto-Fenton a um efluente de lagar de azeite. Após a aplicação do processo de extração efetuado durante 15 minutos com acetato de etilo, numa proporção solvente amostra de 2:1 (v/v) foi verificado um aumento do CQO nas águas, para mais do dobro do valor inicial. O que está relacionado com a difusão parcial de solvente orgânico no efluente.

A variação encontrada para o aumento do CQO do efluente espanhol é justificada pela diferente composição que este apresenta relativamente ao outro efluente, que origina uma

separação de fases mais difícil, levando a recuperações de água acima de 100%, como mostrado na figura 6A. O que confirma a presença de solventes nas águas residuais deste efluente.

Após os processos de extração observou-se também que, apesar do efluente português apresentar maior teor fenólico que o espanhol inicialmente (Tabela 3) a remoção de compostos fenólicos destes foi maior no caso do efluente espanhol, como se pode ver pela figura 6B. O que se deve ao facto do valor do pH inicial ser menor neste efluente (Tabela 3) do que no outro, uma vez que segundo Allouche *et al.*, (2004) o coeficiente de distribuição dos compostos fenólicos no solvente aumenta quando o pH diminui.

Contudo, os valores obtidos para a recuperação de fenóis do efluente espanhol ($34,2 \pm 2,2\%$) foram semelhantes aos encontrados por Papaphilippou *et al.*, (2013) no seu estudo, que alcançou uma recuperação de fenóis de 36% com a realização do processo de extração anteriormente referido, a águas ruças com pH de 5,3.

III. 3. Identificação e quantificação de compostos por HPLC

A identificação de compostos fenólicos presentes nas frações e nas águas residuais obtidas através dos processos de extração realizados foi efetuada tendo por base a análise dos perfis cromatográficos alcançados a 215 e a 254 nm, uma vez que a maior intensidade dos compostos nestes comprimentos de onda foram verificados. Ao contrário da literatura que normalmente usa 280 nm.

A Tabela 4 resume a análise efetuada, onde se pode verificar quais os compostos identificados por comparação dos tempos de retenção com os dos padrões, nas frações e nas águas em estudo. Através desta Tabela e da Figura 7 é possível verificar então que para a mesma matéria-prima as diferentes frações alcançadas apresentam uma diferente composição. Isto já era esperado uma vez que os solventes usados apresentam afinidades diferentes para com os vários compostos. Da mesma forma é também possível observar que, como esperado, a composição das diferentes matérias-primas apresenta também diferenças entre si.

Na análise realizada tem-se então a indicação da presença de ácido mandélico nas duas águas residuais e em todas as frações das três matérias-primas em estudo, assim como do ácido p-cumárico que apenas não está presente nas frações referentes ao resíduo sólido, obtidas com recurso a acetato de etilo, o que estará relacionado com o facto deste composto ser todo extraído do bagaço de azeitona húmido nos dois primeiros passos dos processos de extração.

Tabela 4 - Identificação de compostos nas frações (do H-hexano, D-diclorometano e A-acetato de etilo) obtidas a partir dos dois efluentes e do resíduo sólido, bem como nas águas residuais, através de HPLC.

Substância	t (min)	EP		ARP		EE		ARE		RE														
		Ensaio																						
		A			B			A			B													
H D A			H D A			H D A			H D A															
215 nm																								
Ácido gálico	20,87	-	-	-	-	-	-	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroxitiroso	24,47	-	-	i	-	-	i	-	-	-	-	-	i	-	-	i	i	i	-	-	-	-	-	-
Ácido mandélico	27,01	i	i	i	-	-	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Tiroso	28,40	-	-	i	-	i	i	i	i	-	-	i	i	-	i	i	i	i	-	i	i	-	i	i
Ácido vanílico	30,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido cafeico	31,06	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido sirínico	31,47	-	-	i	-	i	i	i	i	-	-	i	i	-	i	i	i	i	-	i	i	-	i	i
Ácido p-cumárico	36,39	i	i	i	-	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	-	i	i	-	i	i
Oleuropeína	46,73	-	-	-	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido trans-cinâmico	63,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
254 nm																								
Ácido gálico	20,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hidroxitiroso	24,47	-	-	i	i	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido mandélico	27,02	i	i	i	i	-	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	
Tiroso	28,40	-	-	i	-	i	i	-	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido vanílico	30,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido cafeico	31,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido sirínico	31,47	-	-	i	-	i	i	i	i	-	-	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido p-cumárico	36,39	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	-	i	-	-	-	
Oleuropeína	46,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido trans-cinâmico	63,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(i-identificado; - não identificado)

A presença de tiroso e ácido sirínico nas águas residuais em estudo e nas frações das três matérias-primas obtidas com recurso a diclorometano e a acetato de etilo também foi detetada, não sendo estes compostos identificados nas frações obtidas com n-hexano, uma vez

que este solvente não tem afinidade para com eles. O que acontece igualmente para o caso da oleuropeína, com a diferença apenas de que esta não é identificada também em nenhuma das águas residuais.

Hidroxitirosol, o composto encontrado em maior quantidade nos extratos obtidos por extração líquido-líquido usando acetato de etilo, nos estudos feitos por Zbakh e El-Abbassi (2012) e De Marco *et al.* (2007) foi também identificado em frações referentes aos dois efluentes usados, pelo que a sua presença foi ainda detetada nas águas residuais do efluente espanhol o que leva a concluir que este composto não foi todo extraído da matéria-prima (efluente). Por outro lado, este não foi identificado em frações referentes ao resíduo sólido, apesar de Lafka *et al.*, (2011) o ter detetado no seu estudo em extratos obtidos do bagaço de azeitona húmido.

Relativamente ao ácido gálico que é um composto fenólico também presente no azeite (Servili e Montedoro, 2002), este foi apenas identificado em frações do resíduo sólido não fazendo parte de nenhuma das frações referentes aos efluentes. No entanto, a sua deteção nas águas residuais no efluente português a 215 nm dá a indicação que este composto, para além de estar presente no resíduo sólido, está também presente no efluente português. O contrário acontece com o ácido vanílico que está presente somente nas águas residuais do efluente espanhol (a 254 nm).

No que respeita ao ácido trans-cinâmico a sua presença foi apenas detetada em frações do resíduo sólido, de acordo com a literatura (Lafka *et al.*, 2011). Contrariamente, o ácido cafeico foi apenas detetado a 215 nm em frações respeitantes aos dois efluentes usados, não sendo encontrado nas que se referem ao resíduo sólido.

Por fim, 3,4-dihydroxybenzoic acid identificado por Casa *et al.* (2003) após águas ruças serem sujeitas a extração com acetato de etilo, não foi detetado em nenhuma das amostras em estudo, pelo que não se encontra presente na composição das matérias-primas usadas.

Atendendo ao facto de que as condições cromatográficas utilizadas tiveram por base as encontradas em Mulinacci *et al.* (2001), a identificação de compostos fenólicos nas amostras obtidas a partir dos efluentes foi também efetuada por comparação dos perfis cromatográficos alcançados, com os adquiridos deste estudo, pelo que provavelmente há ácido elenólico, aos 51 minutos, nas frações obtidas com diclorometano a partir do efluente espanhol, identificadas a 215 nm.

De entre os compostos identificados o ácido p-cumárico, tirosol, ácido siríngico, oleuropeína e ácido cafeico foram também detetados por Leouifoudi *et al.*, (2015) e ácido vanílico por De marco *et al.* (2007) após aplicação nas águas ruças de processos de extração líquido-líquido,

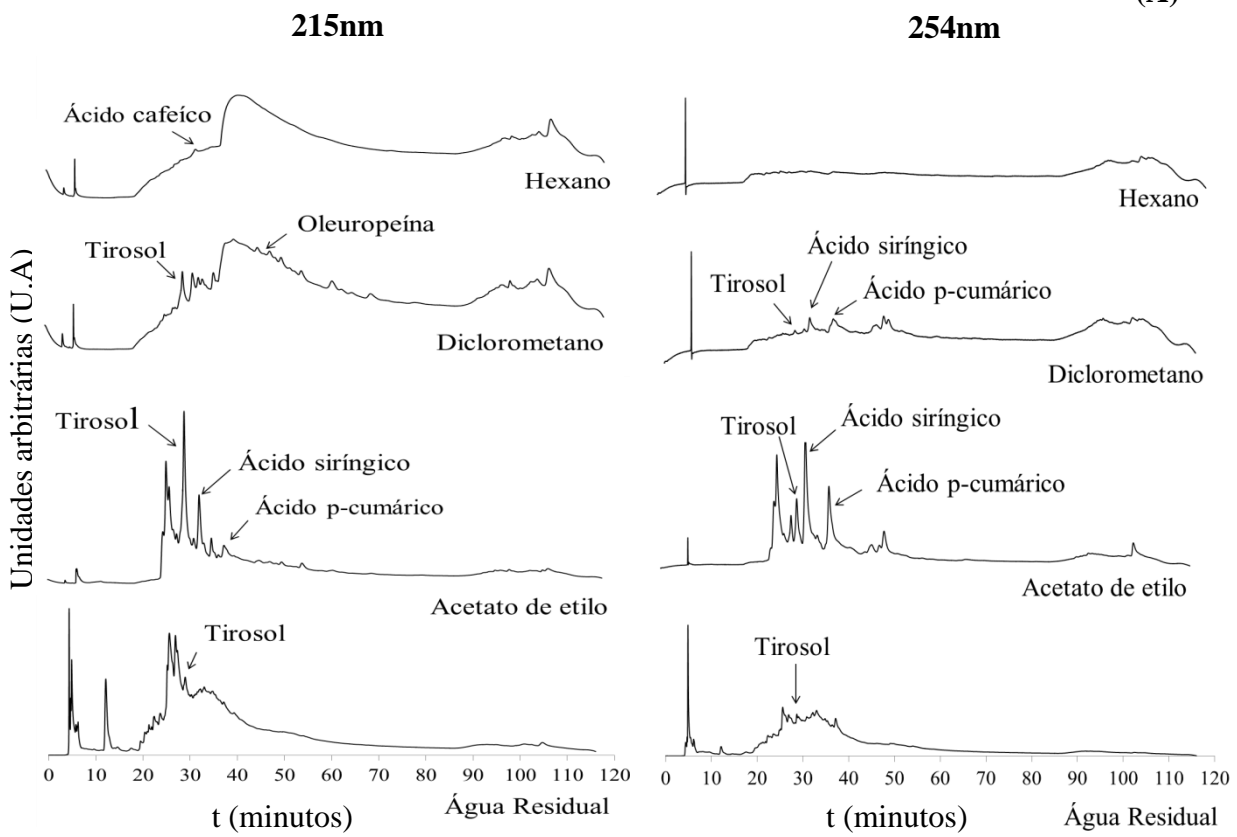
com recurso a acetato de etilo. Ácido p-cumárico, ácido cafeico, oleuropeína, ácido siríngico e ácido trans-cinâmico foram detetados por Lafka *et al.* (2011) após aplicação ao bagaço de azeitona húmido de um processo de extração sólido-líquido.

A figura 7 apresenta os perfis cromatográficos das frações obtidas e das águas residuais dos processos de extração sequencial. Através desta é possível observar que três grupos de compostos, com tempos de retenção nos intervalos de 0-20, 20-55 e 55-120 minutos, podem ser distinguidos nas amostras. O primeiro grupo que corresponde a compostos com menor afinidade para com a fase estacionária é fracamente representado nas amostras em estudo. O segundo grupo é o que aparece com uma maior representação nas amostras. E, o terceiro grupo, que apresenta maior afinidade com a fase estacionária, aparece menos representado que o anterior, sendo mais exibido em frações referentes ao resíduo sólido do que nas referentes aos efluentes. Estando também melhor representado em frações de n-hexano e diclorometano do que nas águas residuais e frações de acetato de etilo referentes aos efluentes.

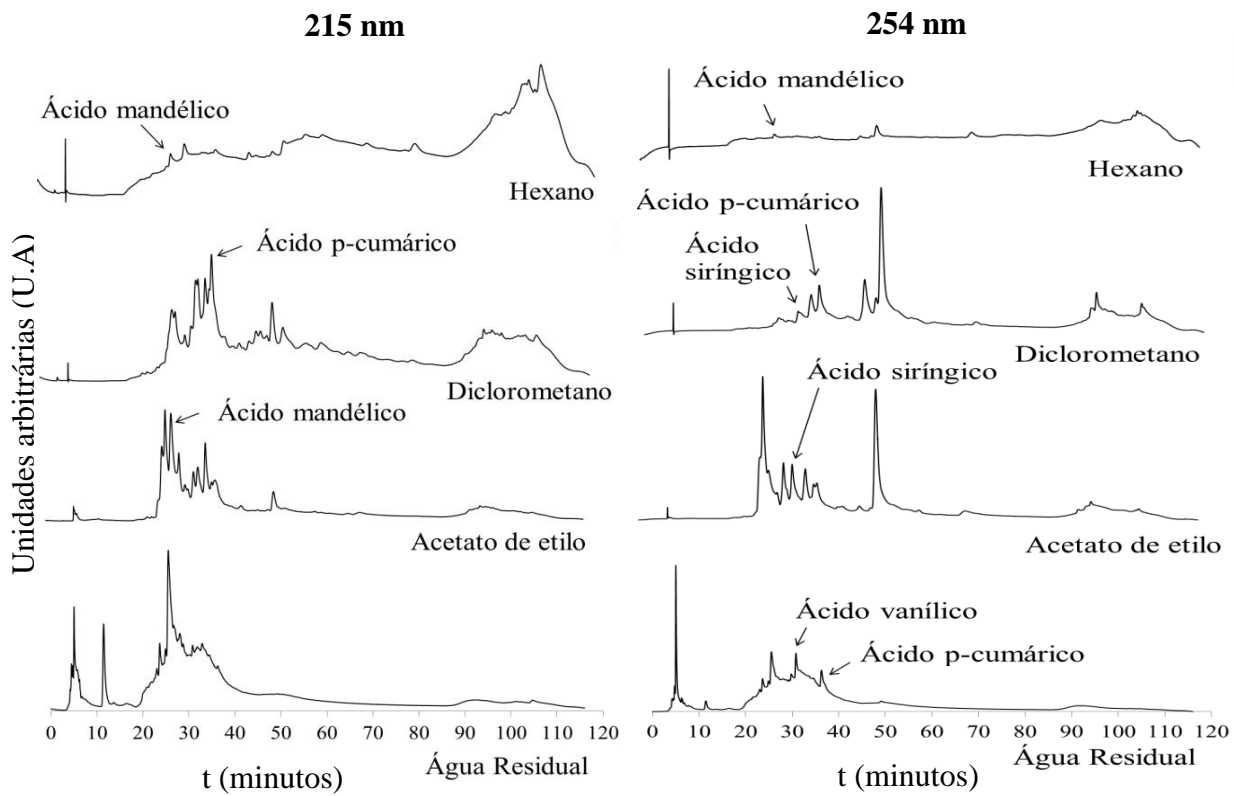
No total foram identificados dez compostos, que há exceção do ácido trans-cinâmico, fazem todos parte do segundo grupo de compostos. Os compostos identificados nas várias amostras apresentam melhores intensidades num comprimento de onda usado do que no outro, como se pode ver pela figura anteriormente referida. Por exemplo, olhando para os cromatogramas das frações do efluente português, obtidas com acetato de etilo (presentes na Figura 7), pode-se ver que a 215 nm o tirosol apresenta melhor intensidade que o ácido siríngico, sendo o ácido p-cumárico o que apresenta menor intensidade, entre estes três compostos. Por outro lado, a 254 nm, o composto com maior intensidade é o ácido siríngico e o de menor intensidade (entre estes três compostos) é o tirosol.

Entre os compostos identificados, o tirosol foi melhor identificadas por Mulinacci *et al.* (2001) a 280 nm e o ácido cafeico a 330 nm, no entanto, no presente trabalho o ácido cafeico e o tirosol foram melhor identificado a 215 nm, nas amostras em estudo.

(A)



(B)



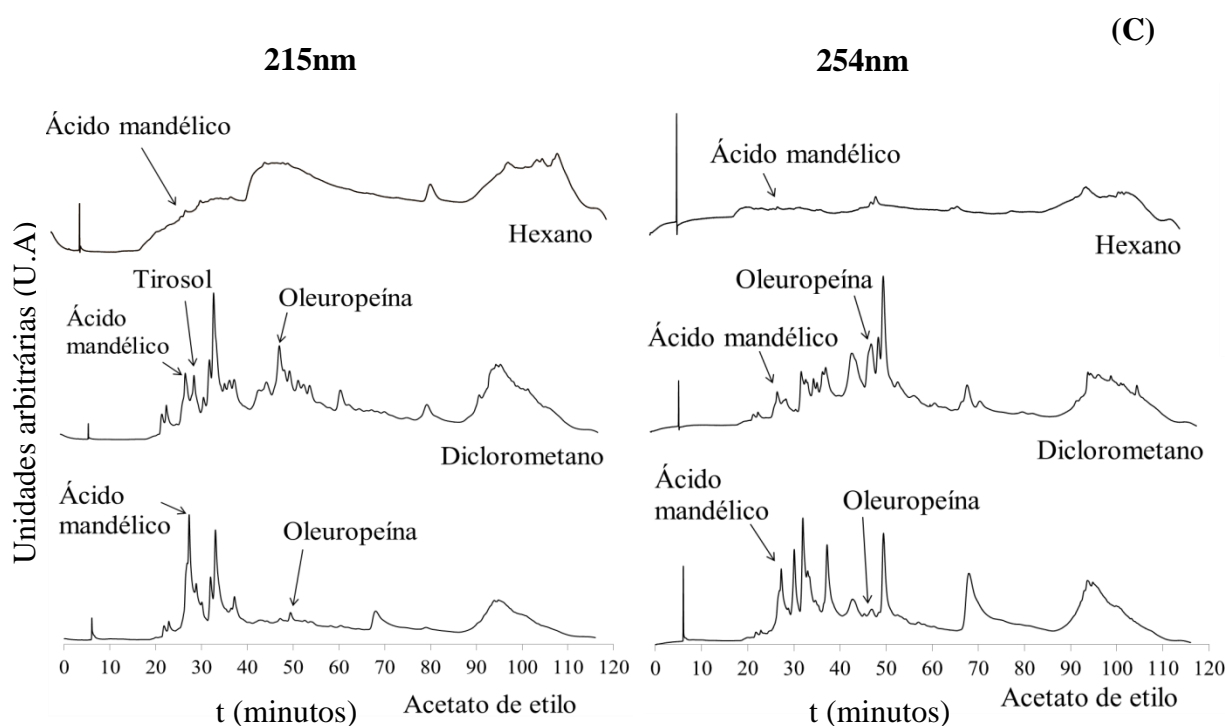


Figura 7- Cromatogramas obtidos por HPLC nos comprimentos de onda de 215 nm e 254 nm das várias frações do efluente português e da água residual portuguesa (A); do efluente espanhol e da água residual espanhola (B) e do resíduo sólido espanhol (C).

Quatro dos compostos identificados foram alvo de quantificação em algumas frações onde se apresentam em quantidades significativas, pelo que os resultados desta se encontram na Tabela 5. Esta quantificação não foi efetuada para nenhuma das frações obtidas com n-hexano, uma vez que os compostos aí detetados estão em pequenas quantidades, embora o rendimento desta etapa fosse relativamente alto.

A análise da Tabela 5 permite observar que a oleuropeína, um composto que apresenta capacidade de eliminar radicais livre ao nível da pele (Rodrigues *et al.*, 2015) e capacidade de impedir a proliferação de células do cancro da mama (Zbakha e El Abbassib, 2012), consegue representar cerca de 0,3 a 0,5% do total da fração do resíduo sólido obtida com diclorometano, o que indica que na fração existe 2,5 a 3,9 mg deste composto. Sendo este excecionalmente melhor identificado/quantificado, nesta fração, a 280 nm do que a 215 e a 254 nm.

A observação da mesma tabela possibilita também a verificação do fato de que a fração obtida com recurso a acetato de etilo a partir do efluente português apresenta uma maior quantidade de ácido sirínico que a alcançada a partir do efluente espanhol. Através da análise a 254 nm,

0,8-1,0% da fração obtida com acetato de etilo a partir do efluente português corresponde ao ácido p-cumárico, 1,3-1,5% diz respeito a ácido siríngico e 0,9% a tirosol, que é um composto conhecido por apresentar atividade antimicrobiana e prevenir doenças tumorais (Tripoli *et al.*, 2005). No entanto, o tirosol é melhor identificado/quantificado a 215 nm que a 254 nm (ao contrário da indicação da literatura), pelo que a este comprimento de onda, 1,4% desta fração corresponde a este composto.

Tabela 5 - Quantificação de compostos presentes nas frações obtidas dos dois efluentes e do resíduo sólido, através de HPLC.

λ (nm)	Substância	Resíduo	Ensaio	Solvente	Padrão/Extrato ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Padrão na fração (%)	Padrão na fração total (mg)
215	Tirosol	EP	A	A	14	1,4	1,7
			B	A	14	1,4	6,0
254	Tirosol	EP	A	A	9	0,9	1,1
			B	A	9	0,9	3,9
	Ácido siríngico	EP	A	A	15	1,5	1,8
			B	A	13	1,3	5,6
		EE	A	A	6	0,6	0,5
			B	A	8	0,8	0,8
	Ácido	EP	A	A	8	0,8	1,0
			B	A	10	1,0	4,5
	p-cumárico	EE	A	D	2	0,2	0,2
			B	D	3	0,3	0,3
Oleuropeína	RE	A	D	2	0,2	1,9	
		B	D	3	0,3	2,2	
280	Oleuropeína	RE	A	D	3	0,3	2,5
			B	D	5	0,5	3,9

III. 4. Identificação e quantificação de compostos através de GC

Os cromatogramas correspondentes ao perfil da composição volátil das frações obtidas nos processos de extração sequencial, indicam a composição relativa, estando apresentados na Figura 8 e na Tabela 6. Através da Tabela 6 e da Figura 8 é possível verificar então que as várias frações apresentam composição diferente de acordo com o solvente e com a matéria-prima usados para a sua obtenção.

Três grupos de compostos, com tempo de retenção nos intervalos de 2-6, 6-8,5 e 8,5-13,5 minutos podem ser distinguidos nas amostras. O primeiro grupo que corresponde a substâncias mais voláteis é fracamente representado nas amostras das três matérias-primas. O segundo grupo aparece já com uma maior representação, especialmente para as frações referentes ao resíduo sólido, não sendo muito representado no efluente português. E, o terceiro, que corresponde a compostos com maior peso molecular, aparece com uma representação ainda maior nas várias amostras, pelo que ao fim dos 13,5 minutos já não se detetam compostos.

No total foram identificados dezassete compostos que se encontram presentes na maioria das amostras em estudo, sendo que as quantidades de compostos identificados foram responsáveis por 47%-99% do seu conteúdo total, sendo as frações obtidas a partir do efluente português as que apresentam maior percentagem de compostos identificados seguindo-se as adquiridas através do efluente espanhol e por fim as obtidas do resíduo sólido. Não tendo sido identificados o β -cariofileno, o (R)-(+)-limoneno e o α -pineno em nenhuma das frações.

Entre os compostos obtidos em percentagens mais elevadas nas frações encontram-se o esqualeno, o ácido oleico e o ácido palmítico, que são compostos presentes no azeite (Boskou, 2008) e o diisooctyl phthalate, que é um composto que revela atividade antimicrobiana, tendo já sido identificado em extratos naturais por Velanganni *et al.* (2011) e Sermakkani e Thangapandian (2012). Assim, os dois primeiros compostos foram alvo de quantificação que se apresenta na Tabela 7.

5,84	n.i.	tr	1,47	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
6,02	n.i.	tr	0,65	tr	tr	tr	tr	tr	0,28	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,64	0,49	tr
6,13	n.i.	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,50	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
6,45	n.i.	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,06	tr	tr	1,00	tr	tr	
6,60	Ethyl oleate	tr	tr	tr	tr	tr	tr	1,89	0,65	0,54	2,20	0,69	0,26	11,58	2,56	0,46	10,61	2,07	tr	
6,66	Ácido láurico	tr	5,10	tr	tr	tr	tr	tr	0,69	tr	tr	0,75	0,61	tr	4,50	0,81	tr	5,17	0,59	
6,82	Ethyl linoleate	tr	0,87	-	tr	tr	-	0,72	tr	tr	0,76	tr	0,31	2,93	1,00	0,45	2,89	0,94	0,29	
7,14	n.i.	tr	0,63	-	tr	tr	-	tr	0,33	tr	-	tr	tr	1,03	tr	tr	1,00	tr	tr	
7,37	n.i.	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,62	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	0,71	tr	
7,43	n.i.	tr	tr	-	tr	-	-	tr	tr	tr	tr	0,31	tr	tr	tr	tr	tr	0,71	tr	
7,47	n.i.	tr	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	-	tr	1,59	tr	1,74	1,95	tr	2,14	1,65	
7,74	n.i.	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	0,43	0,51	tr	tr	-	-	tr	-	-	tr	
7,84	n.i.	-	0,39	-	-	-	-	-	tr	0,40	-	tr	2,3	-	2,28	2,96	-	2,42	2,36	
7,90	n.i.	-	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	0,57	-	tr	0,97	0,61	1,74	0,98	tr	1,82	0,97	
8,37	Álcohol homovanílico	-	0,55	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	tr	-	2,89	-	2,40	2,71	-	2,35	2,85	
8,53	n.i.	-	tr	-	-	tr	-	-	-	tr	-	-	0,94	-	-	1,15	-	-	0,96	
8,63	n.i.	-	tr	-	-	tr	-	-	tr	tr	-	-	0,70	-	tr	1,01	-	tr	0,71	
8,69	n.i.	tr	tr	-	tr	tr	-	-	tr	tr	-	tr	0,34	-	tr	0,45	-	0,32	0,29	
8,77	Ácido palmítico	18,79	6,97	1,17	16,48	16,68	2,37	17,23	3,81	2,63	20,05	4,13	4,08	8,66	3,23	3,08	9,41	4,22	3,23	
8,86	n.i.	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-	0,34	-	-	tr	
9,00	n.i.	2,75	tr	tr	2,55	0,96	0,35	1,81	2,41	1,40	1,79	1,53	1,26	tr	3,23	0,84	0,69	4,17	0,57	
9,14	n.i.	-	0,95	-	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	-	0,98	tr	tr	1,00	tr	tr	
9,25	Tirosol	-	1,24	2,04	-	2,11	1,84	-	0,40	1,55	-	tr	2,61	0,83	1,79	3,47	tr	1,77	2,73	
9,39	n.i.	tr	15,21	1,39	tr	tr	2,70	tr	4,84	1,00	tr	3,50	tr	-	tr	tr	-	tr	0,49	
9,66	Esqualeno	12,33	6,45	tr	12,49	8,86	1,29	3,18	1,71	tr	2,61	0,66	tr	8,60	2,32	0,50	9,47	1,66	tr	

9,80	n.i.	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	11,98	tr	26,11	14,08	tr	28,33	11,51
10,04	n.i.	-	-	-	-	tr	-	3,78	0,98	0,42	3,91	0,94	0,74	1,54	0,91	0,49	1,66	1,12	0,64	
10,14	Ácido esteárico	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	tr	-	1,17	tr	-	1,35	tr	
10,27	Ácido oleico	66,13	10,85	-	68,48	71,40	5,18	39,46	10,13	9,23	44,70	10,28	13,3	33,26	15,68	6,89	44,75	20,62	9,70	
10,38	Diisooctyl phthalate	-	27,40	88,85	-	tr	70,00	19,11	64,97	73,86	12,14	69,42	28,01	6,65	9,73	16,47	tr	-	26,86	
10,56	n.i.	-	tr	-	-	-	-	2,89	tr	tr	1,91	0,66	tr	3,35	tr	tr	3,55	1,19	1,53	
10,72	n.i.	tr	tr	-	tr	tr	-	7,67	tr	0,62	7,21	1,67	tr	8,42	3,17	tr	8,74	4,03	3,16	
10,98	n.i.	-	tr	-	-	tr	-	-	0,30	tr	-	tr	tr	-	1,15	tr	-	1,44	tr	
11,62	n.i.	tr	tr	-	tr	tr	-	tr	0,74	-	tr	tr	-	tr	-	-	tr	-	-	
11,87	Ácido mandélico	-	-	-	-	-	-	tr	2,03	2,68	tr	1,89	3,12	-	3,85	3,25	-	4,43	3,28	
11,96	n.i.	-	-	-	-	tr	-	tr	tr	tr	tr	tr	0,71	-	1,79	0,57	-	1,90	0,74	
12,31	4H-1-Benzothiopyran- 4-one, 3-[(4- methylphenyl)amino]- , 1-oxide	-	-	-	-	-	-	tr	tr	tr	tr	tr	1,68	-	tr	1,79	-	1,49	1,67	
identificáveis (%)		97,25	64,37	92,06	97,45	99,05	80,68	83,63	87,20	91,49	84,66	88,19	56,90	74,98	48,73	39,88	79,74	46,56	51,20	
não identificáveis (%)		2,75	35,63	7,94	2,55	0,95	19,32	16,37	12,80	8,51	15,34	11,81	43,10	25,02	51,27	60,12	20,27	53,44	48,80	

(tr: traços < 0,26; n.i.: substância não identificada).

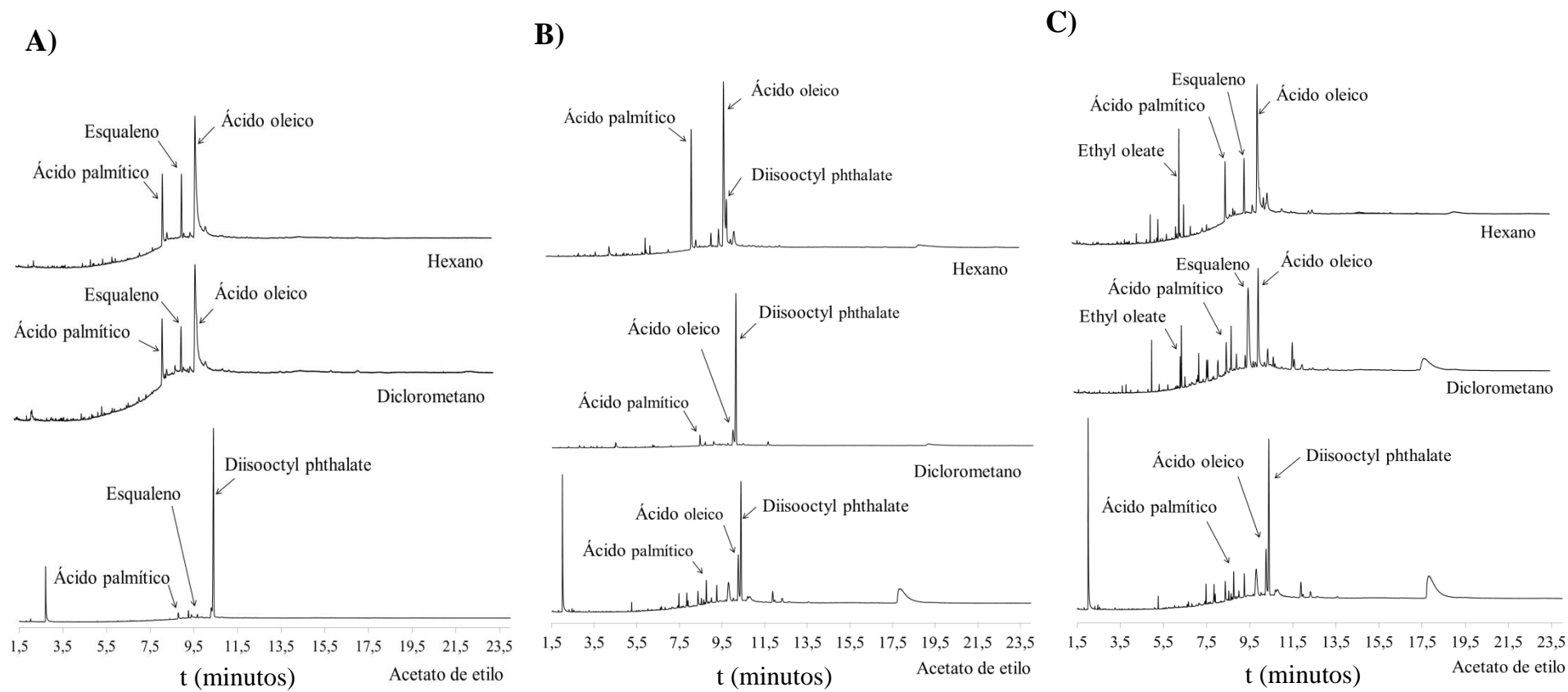


Figura 8 - Cromatogramas obtidos por GC, das várias frações do: A) efluente português; B) efluente espanhol; C) resíduo sólido.

Analisando a Tabela 7 verifica-se que o ácido oleico, o ácido gordo mais abundante no azeite (56-84%) conhecido pela sua ação protetora sobre vários tipos de cancro, está presente em maior quantidade nas frações em estudo que o esqualeno, composto também presente no azeite conhecido por apresentar atividade antioxidante (Boskou, 2008), podendo ser utilizado por exemplo em cosméticos e cremes dermo-protetores (Rodrigues *et al.*, 2015).

Examinando a mesma Tabela, observa-se também que as frações que apresentam maior quantidade destes dois compostos são as que foram obtidas usando o n-hexano como solvente, seguindo-se as que usaram diclorometano e por fim as que foram obtidas com acetato de etilo. De facto os dois primeiros solventes têm afinidade para compostos menos polares, principalmente o n-hexano. Por outro lado, verifica-se também que as frações obtidas do processo de extração efetuado ao efluente espanhol são as que apresentam maiores percentagens de ácido oleico em relação às obtidas a partir das outras matérias-primas.

Tabela 7- Quantificação, efetuada por GC-FID, de dois dos compostos presentes nas frações obtidas dos dois efluentes e do resíduo sólido.

Ensaio	Solvente	Esqualeno			Ácido oleico			
		Padrão/Extrato (µg/mg)	Padrão na fração (%)	Padrão na fração total (mg)	Padrão/Extrato (µg/mg)	Padrão na fração (%)	Padrão na fração total (mg)	
EP	A	H	0,26	0,26	2,31	23,50	2,35	20,66
		D	0,30	0,30	0,62	8,30	0,83	1,75
		A	0,31	0,31	0,38	-	-	-
	B	H	0,42	0,42	14,09	38,20	3,82	128,76
		D	0,17	0,17	1,12	23,20	2,32	15,10
		A	0,19	0,19	0,86	13,00	1,30	5,71
EE	A	H	0,30	0,30	0,50	61,00	6,10	10,38
		D	0,35	0,35	0,31	34,30	3,43	3,09
		A	-	-	-	29,20	2,92	2,33
	B	H	0,38	0,38	0,41	107,30	10,73	11,80
		D	0,15	0,15	0,20	39,30	3,93	5,11
		A	-	-	-	23,60	2,36	2,36
RE	A	H	0,39	0,39	8,58	25,40	2,54	55,29
		D	0,14	0,14	1,38	15,90	1,59	15,61
		A	0,05	0,05	0,36	10,50	1,05	8,12
	B	H	0,39	0,39	9,80	30,80	3,08	77,21
		D	0,12	0,12	1,01	24,40	2,44	20,76
		A	-	-	-	18,40	1,84	11,97

III. 5. Atividade antioxidante

As diferentes frações e as águas residuais obtidas no final dos processo de extração, bem como os efluentes iniciais, cuja atividade antioxidante (AA), determinada pelo método de DPPH, estão apresentadas na figura 10.

Através da Figura 10 (A, B e C) é possível então observar que, para as três matérias-primas usadas, que de um modo geral quando analisadas a atividade antioxidante, esta é menor nas frações obtidas com n-hexano e maior nas obtidas com acetato de etilo, o que significa que estas últimas apresentam uma maior capacidade de ceder elétrons ao DPPH[•] reduzindo-o. Estes resultados estão relacionados com o facto do acetato de etilo apresentar uma maior afinidade para compostos fenólicos presentes na matriz que os outros solventes usados. De facto, Leouifoudi *et al.*(2015) verificou nos resultados obtidos no seu estudo através deste método, que existia uma boa correlação entre o potencial antioxidante e o teor polifenólico.

A diferença verificada na atividade antioxidante das frações foi também apurada durante a realização do ensaio experimental, pela observação da coloração do meio reacional, uma vez que se sabe que ao diminuir a concentração de DPPH[•] no meio, a coloração vai passando de púrpura para amarelo, como se pode ver pela Figura 9.

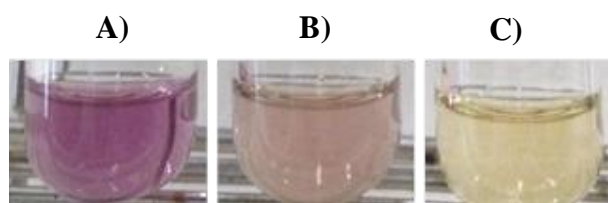


Figura 9 - Ensaio experimental de atividade antioxidante realizado para diferentes frações: A) fração de n-hexano, B) fração de diclorometano e C) fração de acetato de etilo.

A atividade antioxidante apresentada pelas frações obtidas com acetato de etilo revela-se então interessante, uma vez que em determinadas concentrações estas frações conseguem alcançar valores de AA semelhantes aos alcançados pelo BHT e BHA, que são antioxidantes sintéticos usados na indústria alimentar, farmacêutica (Ngo *et al.*, 2011) e cosmética e pelos alcançados pelo ácido ascórbico, que é um antioxidante natural também usado nestas indústrias. Assim, observa-se pela Figura 10 (A, B e C) que a fração obtida com acetato de etilo a partir do efluente espanhol apresenta uma maior capacidade antioxidante que a alcançada a partir do efluente português e do resíduo sólido espanhol, uma vez que a uma concentração de 500 µg/mL esta fração já consegue atingir um valor de atividade antioxidante igual aos valores atingidos pelos antioxidantes de referência. Por outro lado, só a uma

concentração de 1000 µg/mL é que a fração referente ao efluente português consegue atingir valores de AA iguais aos alcançados por esses antioxidantes. O mesmo acontece com as frações referentes ao resíduo sólido.

Leouifoudi *et al.*(2015), verificou também no seu estudo, através do método de DPPH, que os extratos obtidos com acetato de etilo a partir de águas ruças eram mais ativos que os obtidos a partir do resíduo sólido provenientes do mesmo sistema de extração de azeite, no entanto, há que ressaltar que o sistema de extração de azeite em causa era o sistema contínuo de três fases e não o de duas fases, o que gera resíduos com composições diferentes.

Observando a Figura 10 é ainda importante notar que a uma concentração de 500 µg/mL as frações referentes ao efluente português e ao resíduo sólido obtidas com acetato de etilo, apesar de não apresentarem valores de atividade antioxidante iguais aos dos antioxidantes de referência, já apresentam valores consideráveis, assim como as frações obtidas com diclorometano a partir do efluente espanhol e do resíduo sólido a uma concentração de 1000 µg/mL, pelo que revelam alguma importância para algumas aplicações, uma vez que os antioxidantes naturais são preferíveis ao sintéticos como referido por Pokorný (2007).

No que respeita à atividade antioxidante apresentada pelas águas ruças usadas antes e após o processo de extração (efluentes e águas residuais, respetivamente), como se pode ver pela Figura 10 (D e E), esta é muito semelhante entre si, pelo que se verifica que apenas uma pequena quantidade de compostos responsáveis por esta atividade foram extraídos dos efluentes, permanecendo nas águas residuais. A semelhança destes valores é no entanto mais acentuada no caso do efluente e das águas residuais portuguesas que no caso espanhol, o que pode estar relacionado com a maior remoção de compostos fenólicos que se verificou no efluente espanhol com aplicação do processo de extração sequencial, como já foi anteriormente referido.

Uma vez que não se conseguiu valores de concentrações e percentagens AA com linearidade, não foi possível calcular o IC50, por isso foram apresentados todos os dados obtidos nesta técnica.

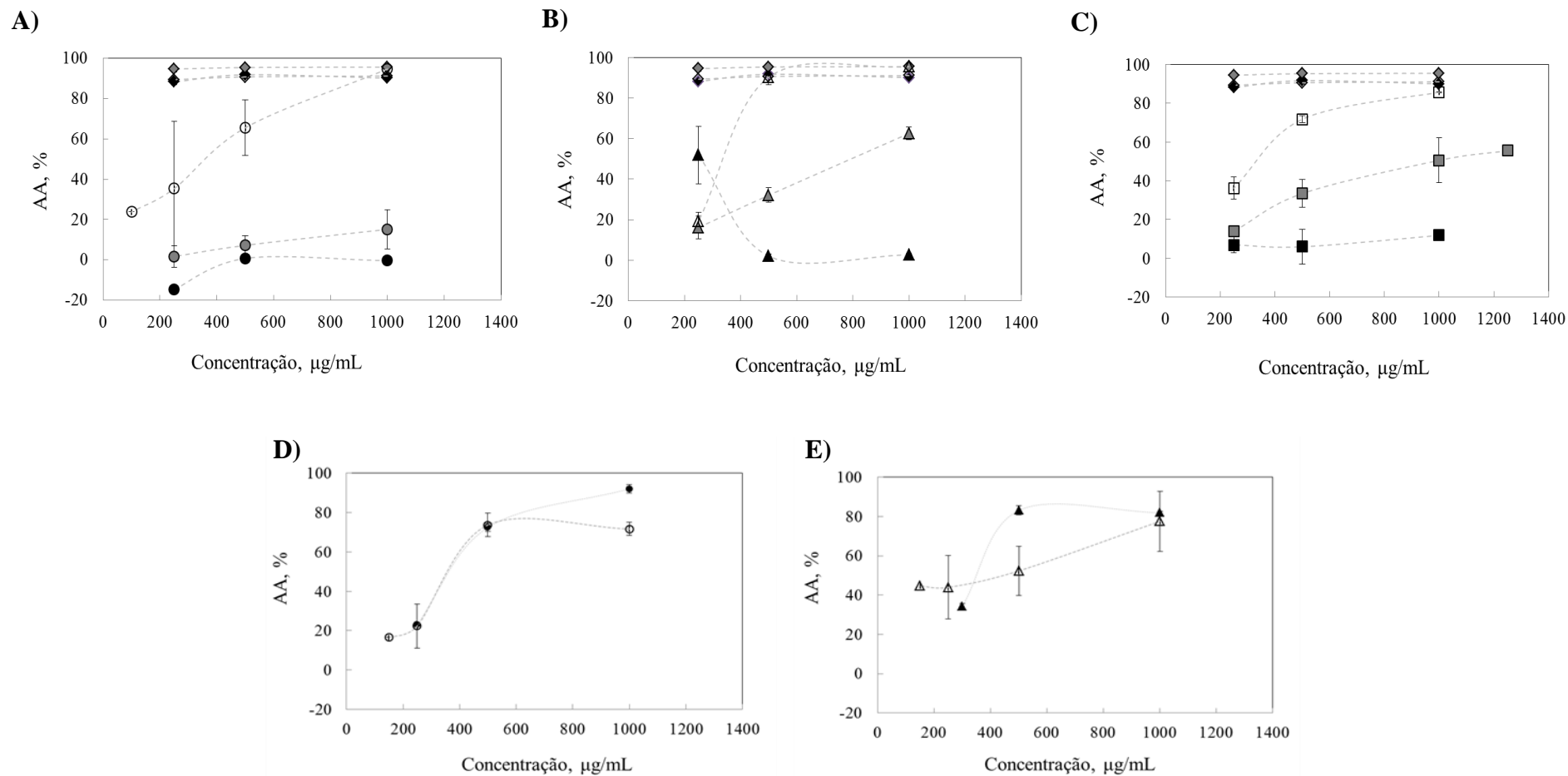


Figura 10 - Atividade antioxidante (AA) das frações obtidas para os diferentes lotes de matérias-primas e para os antioxidantes padrão, em função da concentração. BHT ◆, Ácido ascórbico ◆, BHA ◇; (A) Efluente Português: H ●, D ●, A ○; (B) Efluente Espanhol: H ▲, D ▲, A △ (C); Resíduo Sólido Espanhol (RE): H ■, D ■ e A □. Atividade antioxidante dos efluentes usados e das respectivas águas residuais: (D) Efluente Português ●, Água residual portuguesa ○; (E) Efluente Espanhol ▲, Água residual espanhola △.

Uma vez que os antioxidantes podem responder de diferentes formas a diferentes fontes de radicais ou oxidantes (Aruoma, 2003), outra metodologia para caracterizar potenciais ações antioxidantes, nas frações obtidas por extração sequencial aplicada aos resíduos da indústria do azeite e nas águas ruças antes e após este processo foi usada. Assim, através desta foi possível determinar a capacidade que as amostras possuem em proteger um substrato lipídico da oxidação.

Os resultados obtidos encontram-se então na Figura 11 e indicam que, a inibição da oxidação apresentada para as diferentes amostras é de modo geral aproximadamente constante ao longo do tempo de análise, à exceção da exibida pela fração referente ao efluente espanhol obtida com recurso ao n-hexano que vai diminuindo consideravelmente com o passar do tempo.

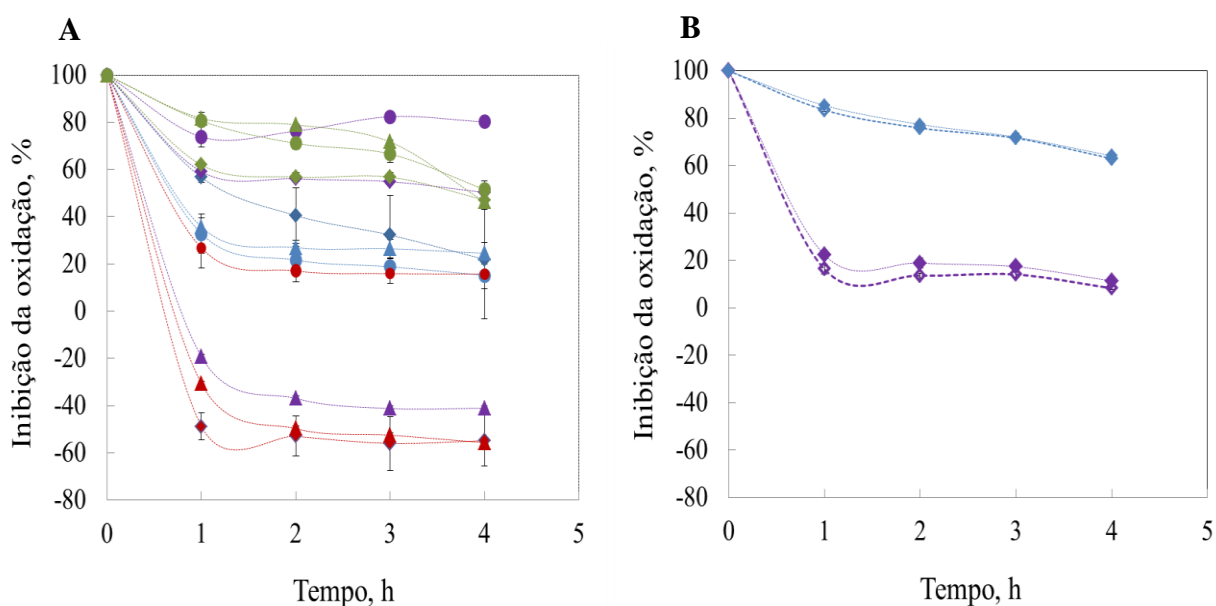


Figura 11 - Capacidade de inibição da oxidação das frações obtidas dos diferentes lotes de efluentes líquidos e resíduo sólido, ao longo do tempo, bem como a dos antioxidantes de referência (A): EP-H♦, EP-D●, EP-A▲; EE-H◆, EE-D●, EE-A ▲; RE-H♦, RE-D●, RE-A▲; ácido ascórbico◆, BHA●, BHT▲. Capacidade de inibição da oxidação dos efluentes e das águas residuais resultantes dos processos de extração, em função do tempo (B): EP♦, AREP◇; EE◆, AREE◇.

Atendendo então à Figura 11A é possível verificar que as frações que revelam mais importância são as que foram obtidas do efluente português com recurso a n-hexano e a diclorometano e que apresentam uma percentagem de inibição da oxidação, entre 60 a 80%, semelhante à apresentada pelos antioxidantes de referência. Seguindo-se as que foram obtidas do efluente espanhol pelos vários solventes e a fração do resíduo sólido referente ao

diclorometano que apresentam percentagens de inibição da oxidação que vão dos 60% aos 20%, pelo que mesmo assim poderão vir a ser preferidos em algumas aplicações aos sintéticos, uma vez que o uso contínuo do BHA e BHT trazem prejuízos para a saúde (Shahidi e Ambigaipalan, 2015). Por outro lado, estas frações são formadas por vários compostos que quando isolados e concentrados poderiam aumentar o poder antioxidante.

As três frações restantes não apresentaram porém uma atividade antioxidante mas sim pró-oxidante, uma vez que a percentagem de inibição da oxidação apresenta valores negativos, o que significa que em vez que inibirem a oxidação causam a oxidação.

Atendendo ao facto que a metodologia usada tem especificidade para compostos lipofílicos (Leoufoundi *et al*, 2015) a maior percentagem de inibição da oxidação está relacionada com a maior presença destes compostos nas amostras, pois as duas frações com maior capacidade de inibição são referentes ao efluente português obtidas com recurso a n-hexano e a diclorometano que são solventes com maior afinidade para estes compostos, seguindo-se as apresentadas pelas frações referentes ao efluente espanhol obtidas a partir dos três solventes. Apesar deste apresentar mais óleo vegetal, a presença de compostos lipofílicos nas frações dos dois primeiros passos do processo de extração não deve ter sido tão grande como para o caso do efluente português, uma vez que a separação das fases era mais difícil. No entanto, dada a dificuldade na separação das fases, alguns compostos lipofílicos ainda devem ter conseguido chegar ao terceiro passo da extração sendo também recuperados com acetato de etilo, o que já não deve ter acontecido no caso do efluente português daí ter apresentado atividade pro-oxidante.

De seguida, no que respeita às frações referentes ao resíduo sólido são as que das três matérias-primas apresentam uma menor capacidade de inibição da oxidação o que pode estar relacionado com a menor presença de compostos lipofílicos neste resíduo relativamente aos efluentes estudados. Através deste método, Leouifoudi *et al.*(2015) verificou também que os extratos obtidos com acetato de etilo a partir de águas ruças eram mais ativos que os alcançados a partir do resíduo sólido provenientes do mesmo sistema de extração de azeite que, no caso destes autores, se tratava do sistema de centrifugação de três fases e não o de duas fases.

No que respeita à inibição da oxidação apresentada pelas águas ruças antes e após o processo de extração, que se encontra na Figura 11B, é também possível verificar que apresentam valores semelhantes, no entanto a semelhança é mais acentuada no caso espanhol que no português, ao contrário do que aconteceu com a atividade antioxidante determinada pelo método de DPPH. Este fato deve estar relacionado com a maior remoção de compostos

lipofílicos no efluente português, dada à separação das fases ser mais fácil. No entanto, a capacidade de inibição da oxidação apresenta maiores percentagens no caso espanhol o que está associado ao facto deste conter mais óleo vegetal que o português.

Através dos resultados obtidos por esta metodologia e pelo método do DPPH, verificamos que existem diferenças na atividade antioxidante obtidas pelos dois métodos, o que também foi verificado por Leouifoudi *et al.* (2015) no seu estudo. Uma vez que o DPPH• é um radical estável que não tem qualquer semelhança com os radicais peróxido altamente reativos envolvidos na peroxidação lipídica (Prior *et al.*, 2005). Assim o método de DPPH baseia-se na transferência de eletrões de um composto antioxidante para um oxidante, e este determina a atividade antioxidante de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação (Duarte-Almeida *et al.*, 2006).

O que significa que os dois métodos são complementares e trazem informações diferentes. Uma vez que, a ação antioxidante, detetada pelo método de DPPH, baseia-se na eliminação direta de radicais livres, podendo ser útil por exemplo em aplicações cosméticas com ação eliminadora de radicais livres ao nível da pele. Por outro lado, a ação antioxidante determinada pelo método de oxidação acoplado do β -caroteno e ácido linolénico, baseia-se na inibição da geração de espécies reativas de oxigénio, podendo os antioxidantes então serem úteis, por exemplo, para aplicações alimentares em que se pretenda proteger os alimentos da oxidação lipídica.

III. 6. Eficiência do processo de Fenton

O processo de Fenton foi aplicado aos dois efluentes iniciais (EP e EE) e às águas residuais destes efluentes resultantes de um dos processos de extração sequencial (AREP e AREE). A comparação tem o objetivo de verificar a influência da recuperação de compostos que possam vir a ser valorizados, no tratamento final do efluente, para recuperar a água no final do processo. Estas reações foram então realizadas para diferentes valores de H_2O_2/CQO e H_2O_2/Fe^{2+} (apresentados na Tabela 1, no Capítulo II) para avaliar a sua influência na remoção de carga orgânica das amostras em estudo.

Os resultados obtidos mostraram que, independentemente das várias quantidades de H_2O_2 e de Fe^{2+} usadas, as remoções de compostos fenólicos nos dois efluentes e nas duas águas residuais em estudo, atingiram sempre valores acima de 84%, como se pode ver pela Figura 12. Estes dados levam à conclusão que os radicais hidroxilo têm grande afinidade para reagir com este

tipo de compostos orgânicos, degradando-os. De facto, substâncias com ligações múltiplas são altamente reativas com estes radicais.

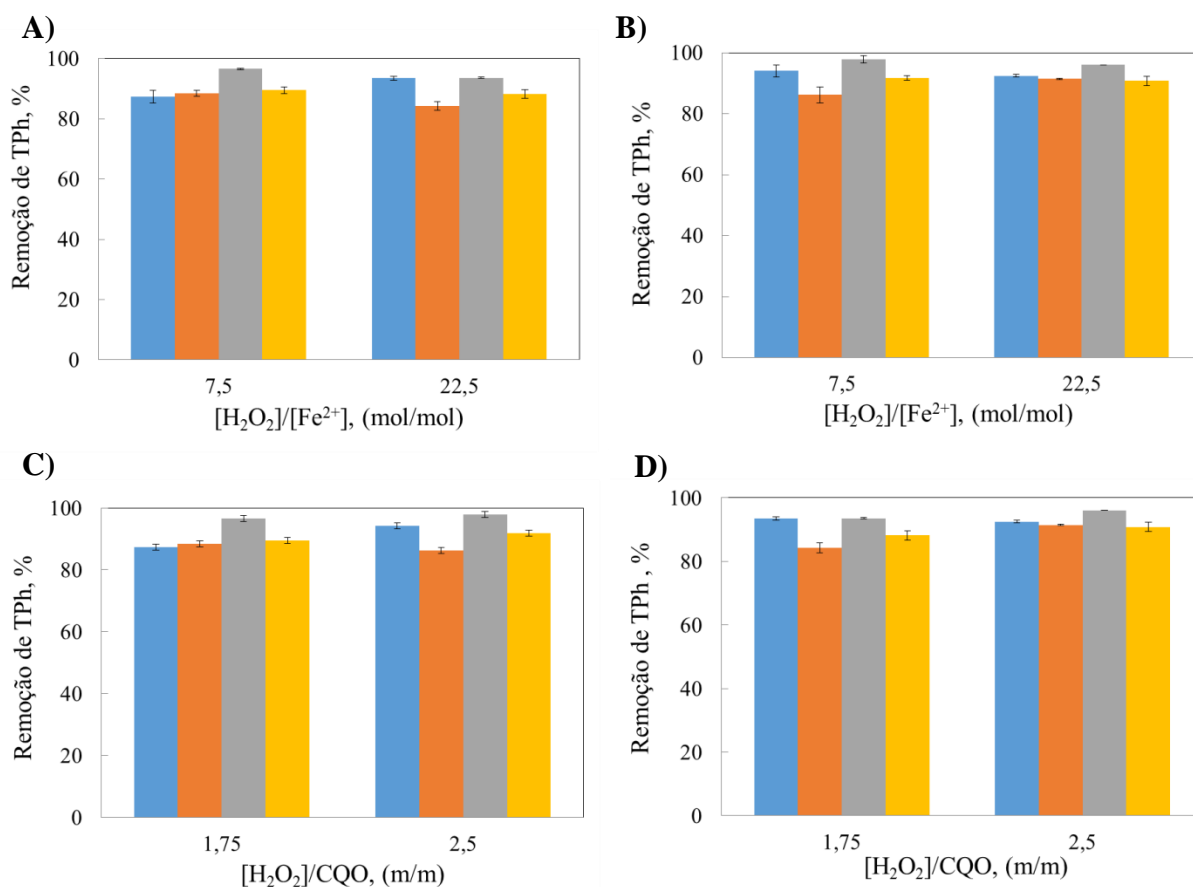


Figura 12 - Remoção do TPh dos efluentes iniciais e das águas residuais provenientes do processo de extração depois de submetidos ao processo de Fenton, sob várias condições: A) $H_2O_2/CQO=1,75$ (m/m); B) $H_2O_2/CQO=2,5$ (m/m); C) $H_2O_2/Fe^{2+}=7,5$ (mol/mol); D) $H_2O_2/Fe^{2+}=22,5$ (mol/mol). ● EP ● AREP ● EE ● AREE.

No entanto, o mesmo não acontece com todo o tipo de compostos orgânico, pois, as percentagens de remoção de carência química de oxigénio foram influenciadas pela variação da quantidade de peróxido de hidrogénio e de iões de ferro na reação (Figura 13).

Assim, pela Figura 13A, verifica-se que mantendo a quantidade de H_2O_2 constante na reação de Fenton, usando um rácio H_2O_2/CQO de 1,75 (m/m), o aumento da quantidade de Fe^{2+} leva a uma maior percentagem de remoção de CQO para o caso do efluente português (EP) e da água residual do efluente espanhol (AREE). O aumento de Fe^{2+} leva a um aumento da quantidade de radicais hidroxilo gerados (Equação 1) que vão reagir com a matéria orgânica degradando-a (Equação 2). Por outro lado, esta percentagem diminui no caso do efluente

espanhol (EE) e mantém-se quase constante no caso das águas residuais do efluente português (AREP) dado ao efeito “*scavenger*” mostrado pelos iões ferro, que ao estarem em excesso competem com a matéria orgânica pelos radicais hidroxilo reduzindo a eficiência do processo de tratamento. Estas diferenças de comportamento devem-se à complexa composição dos efluentes que afeta grandemente a eficiência dos processos de oxidação.

Do mesmo modo, pela Figura 13B (H_2O_2/CQO de 2,5) observa-se que mantendo constante a quantidade de peróxido de hidrogénio e aumentando a quantidade de Fe^{2+} a percentagem da remoção de CQO para o caso dos dois efluentes e da água residual do efluente português aumenta pouco, mas no caso da outra água residual em estudo diminui.

No que respeita à variação da quantidade de H_2O_2 vê-se pela figura 13C e D que ao aumentar a quantidade deste reagente, mantendo o rácio H_2O_2/Fe^{2+} constante, a percentagem de remoção de CQO aumenta (Equação 1 e 2) no caso das duas águas residuais e do efluente espanhol. No entanto, nas reações realizadas ao efluente português existe uma diminuição desta percentagem uma vez que este reagente apresenta um efeito “*scavenger*”, ou seja, quando em excesso compete com a matéria orgânica pelos radicais hidroxilo reduzindo a eficiência do processo.

Assim conclui-se que as condições para o qual a reação de Fenton é mais eficiente dependem da amostra em causa, pelo que para o efluente português a que alcançou a melhor percentagem de remoção de CQO foi a que usou as condições de: H_2O_2/CQO igual a 1,75 (m/m) e H_2O_2/Fe^{2+} igual a 7,5 (mol/mol). A efetuada ao efluente espanhol e à água residual portuguesa foi a que teve igual valor de rácio H_2O_2/Fe^{2+} mas um rácio de H_2O_2/CQO igual a 2,5 (m/m) e a executada à água residual espanhola foi a que usou as condições: H_2O_2/CQO igual a 2,5 (m/m) e H_2O_2/Fe^{2+} igual a 22,5 (mol/mol). Desta forma para o efluente português e espanhol e para a água residual portuguesa e espanhola a remoção de CQO melhor foi de $69,3 \pm 0,8\%$, $64,8 \pm 4,3\%$, $62,5 \pm 1,9\%$ e $58,5 \pm 2,3\%$, respetivamente.

Lucas e Peres (2009) após filtrarem e diluírem 30 vezes com água destilada as águas ruças, provenientes de um sistema de extração de azeite descontínuo que apresentavam um $CQO_{inicial}$ de 60510 mg. L^{-1} , atingindo o CQO de 2000 mg. L^{-1} . Esta amostra diluída foi sujeita a reação de Fenton durante uma hora, a pH inicial de 3,5, temperatura de 30°C , rácio H_2O_2/CQO igual a 1,75 (m/m) e H_2O_2/Fe^{2+} igual a 7,5 (mol/mol) na qual obtiveram uma remoção de CQO de 70,9%, muito semelhante ao que se alcançou no presente trabalho para o efluente português. Deve ser referido que o efluente inicial utilizado no presente trabalho apresentava um CQO cerca de duas vezes maior do que o estudado por Lucas e Peres (2009).

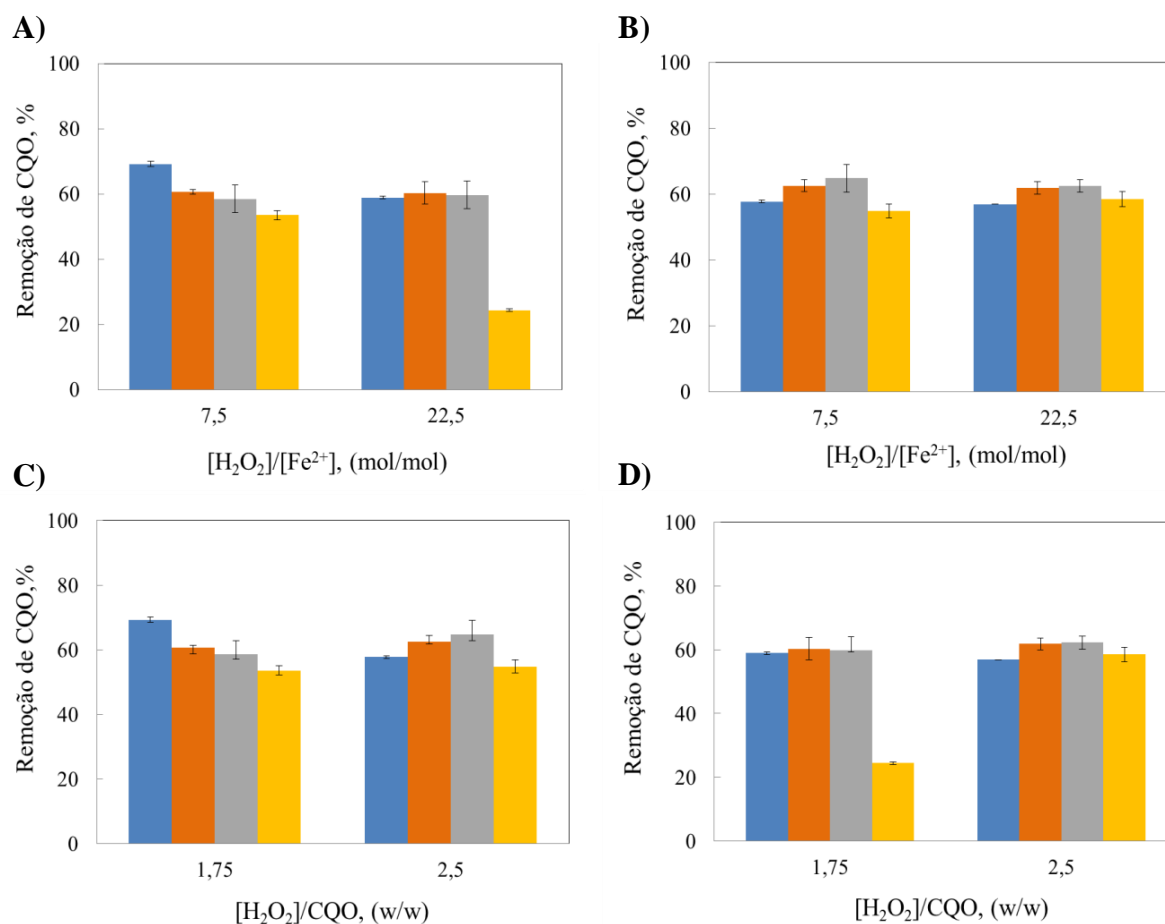


Figura 13 - Remoção do CQO dos efluentes iniciais e das águas residuais provenientes do processo de extração depois de submetidos ao processo de Fenton, sob várias condições: A) $H_2O_2/CQO=1,75$ (m/m); B) $H_2O_2/CQO=2,5$ (m/m); C) $H_2O_2/Fe^{2+}=7,5$ (mol/mol); D) $H_2O_2/Fe^{2+}=22,5$ (mol/mol). ● EP ● AREP ● EE ● ARRE.

Atendendo ao facto que as águas residuais apresentavam um valor de carência química de oxigénio maior que os efluentes antes da reação de Fenton e uma vez que as melhores remoções deste parâmetro alcançadas por este processo de tratamento foram menores nestas, o valor de CQO final por elas apresentado é maior que no caso dos efluentes, sendo as águas espanholas a que delas exhibe um valor maior. Dentro dos dois efluentes o que exhibe menor valor de carência química de oxigénio no final da reação de Fenton é o português porque foi o que obteve uma melhor remoção de CQO através da aplicação desta reação e para além disso também era aquele que tinha um CQO inicial menor (Tabela 2).

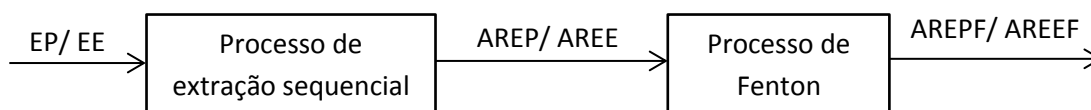
No entanto, qualquer um dos valores de CQO exibido pelas quatro amostras tratadas ultrapassa o valor limite de emissão para os cursos de água naturais, presente no Decreto-Lei nº 236/98, que é $150 \text{ mg O}_2.L^{-1}$. Assim, o processo de Fenton por si só não é capaz de promover o tratamento total do efluente de lagares de azeite, pelo que será necessário a

realização de estudos envolvendo a integração de outras etapas de tratamento. Por outro lado, apesar dos processos de extração permitirem a recuperação de compostos de valor acrescentado destas águas residuais, a sua aplicação como pré-tratamento não afeta um posterior processo de Fenton.

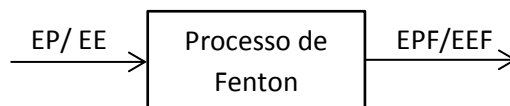
III. 7. Biodegradabilidade

A biodegradabilidade foi avaliada para os efluentes português e espanhol antes de qualquer processo de tratamento e/ou valorização (EP e EE), para as águas residuais portuguesas e espanholas provenientes de um dos processos de valorização (AREP e AREE), para as águas residuais portuguesas e espanholas que passaram por um processo de valorização e de tratamento nas melhores condições de operação (AREPF e AREEF) e para os efluentes português e espanhol que apenas passaram pelo processo de tratamento nas melhores condições de operação (EPF e EEF).

Caso 1:



Caso 2:



Assim, no que se refere à biodegradabilidade pode-se verificar pela Tabela 8 que o efluente português que não passou por nenhum processo de tratamento e/ou valorização (EP) é biodegradável, dado que o rácio CBO_5/CQO é maior que 0,4. Porém, a sua biodegradabilidade diminuiu com a aplicação do processo de extração sequencial pelo que poderá estar relacionado com a difusão do solvente nas águas e com a remoção de matéria orgânica biodegradável através deste processo. No entanto, a sua biodegradabilidade aumenta de seguida com a aplicação do processo de Fenton até um valor de $0,28 \pm 0,02$ m/m. A aplicação apenas de um processo de Fenton a este efluente levou também a uma diminuição da sua biodegradabilidade para um valor de $0,16 \pm 0,01$ m/m, o que indica que este processo

neste caso degradou matéria orgânica biodegradável passando o efluente a não ser biodegradável, apresentando uma biodegradabilidade menor que as AREPF.

O efluente espanhol (EE) não é biodegradável mas verifica-se (Tabela 8) que a sua biodegradabilidade com a aplicação do processo de extração sequencial aumenta e com a aplicação de seguida do processo de Fenton também aumenta atingindo um valor de $0,38\pm 0,01$ (m/m), pelo que se conclui que no final do processo integrado de valorização e tratamento este é biodegradável podendo ser ainda tratado por um processo biológico. Por outro lado, com a aplicação apenas do processo de Fenton a este efluente ocorre um aumento da biodegradabilidade para um valor de $0,28\pm 0,01$ (m/m).

Assim, conclui-se então que as águas no final de um processo integrado de valorização e tratamento são mais biodegradáveis que as que apenas passaram pelo processo de tratamento. Isto pode favorecer a aplicação de um sistema biológico para refinar a água tratada.

Tabela 8 - Biodegradabilidade dos efluentes e águas residuais.

CBO₅/CQO (m/m)							
EP	AREP	AREPF	EPF	EE	AREE	AREEF	EEF
$0,47\pm 0,01$	$0,19\pm 0,03$	$0,28\pm 0,02$	$0,16\pm 0,01$	$0,14\pm 0,00$	$0,24\pm 0,01$	$0,38\pm 0,01$	$0,28\pm 0,01$

Valor de referência: 0,3 parcialmente biodegradável e 0,4 totalmente biodegradável.

III. 8. Fitotoxicidade

As amostras sujeitas a uma avaliação de biodegradabilidade foram também sujeitas a uma análise de fitotoxicidade, através do método de germinação de sementes de *Lepidium sativum*, de forma a se determinar qual o impacto destas no desenvolvimento das plantas caso fossem descartadas no solo. Esta avaliação foi realizada uma vez que, atualmente, a gestão destes resíduos passa muitas vezes pela sua deposição em terrenos agrícolas.

Através deste método foi possível concluir que os dois efluentes que não passaram por nenhum processo de tratamento ou valorização (efluentes originais) e as duas águas residuais resultantes dos processos de extração (água residuais) são muito fitotóxicos, uma vez que não ocorreu germinação de sementes durante a realização deste método, como se pode ver na

Figura 14. Este fenómeno está relacionado com a elevada carga orgânica tóxica que estas amostras apresentam.

Por outro lado, após um tratamento as duas águas residuais resultantes dos processos de extração (águas residuais tratadas) já permitiram a abertura das sementes e o surgimento de uma pequena raiz que não era suscetível de ser medida. O que se deve ao facto da carga orgânica responsável pela fitotoxicidade ter diminuído, sendo estas amostras ainda muito fitotóxicas mas menos que as anteriores.

O efluente espanhol que passou apenas pelo processo de tratamento (efluente tratado) permitiu o mesmo que as duas amostras anteriormente referidas dado que a sua carga orgânica diminuiu com a aplicação do processo de Fenton. No entanto, o efluente português tratado não levou à germinação de nenhuma semente pelo que é mais fitotóxico que o espanhol, apesar de apresentar um menor CQO, o que deve estar relacionado com o facto de que nas melhores condições encontradas para a realização do processo de Fenton no caso deste efluente a remoção de compostos fenólicos, responsáveis pela fitotoxicidade deste, ter sido menor ($87,32 \pm 2,17\%$) que na reação efetuada nas melhores condições de operação ao efluente espanhol ($97,85 \pm 1,17\%$).

Assim, o índice de germinação (GI) é zero uma vez que não é possível ver calculado.

Estes ensaios foram feitos em 48 horas e poderiam ser repetidos com períodos maiores, uma vez que algumas sementes iniciaram o processo de germinação. Isso permitiria identificar se as sementes ultrapassariam as condições desfavoráveis para que suas raízes crescessem.

Atendendo aos resultados obtidos quanto à fitotoxicidade dos efluentes originais é possível entender então o Despacho Conjunto emitido pelo Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas e pelo Ministério do ambiente e do Ordenamento do Território, Despacho nº 626/2000 publicado a 06.06.2000, presente no Diário da República, 2.ª Série, Nº 131, que entre outras coisas, diz que: há necessidade de se realizar um pré-tratamento para correção do valor do pH das águas-ruças que podem ser aplicadas no solo num volume limite de $80 \text{ m}^3/\text{ha.ano}$, com aplicação limitada a culturas arbóreas e arbustivas, sendo proibido o seu espalhamento em áreas de reserva Ecológica Nacional e áreas protegidas. Pois, os resultados obtidos para o GI mostram que os efluentes podem originar problemas no desenvolvimento normal das plantas pelo que a sua aplicação direta nos solos agrícolas pode não ser a solução mais adequada.

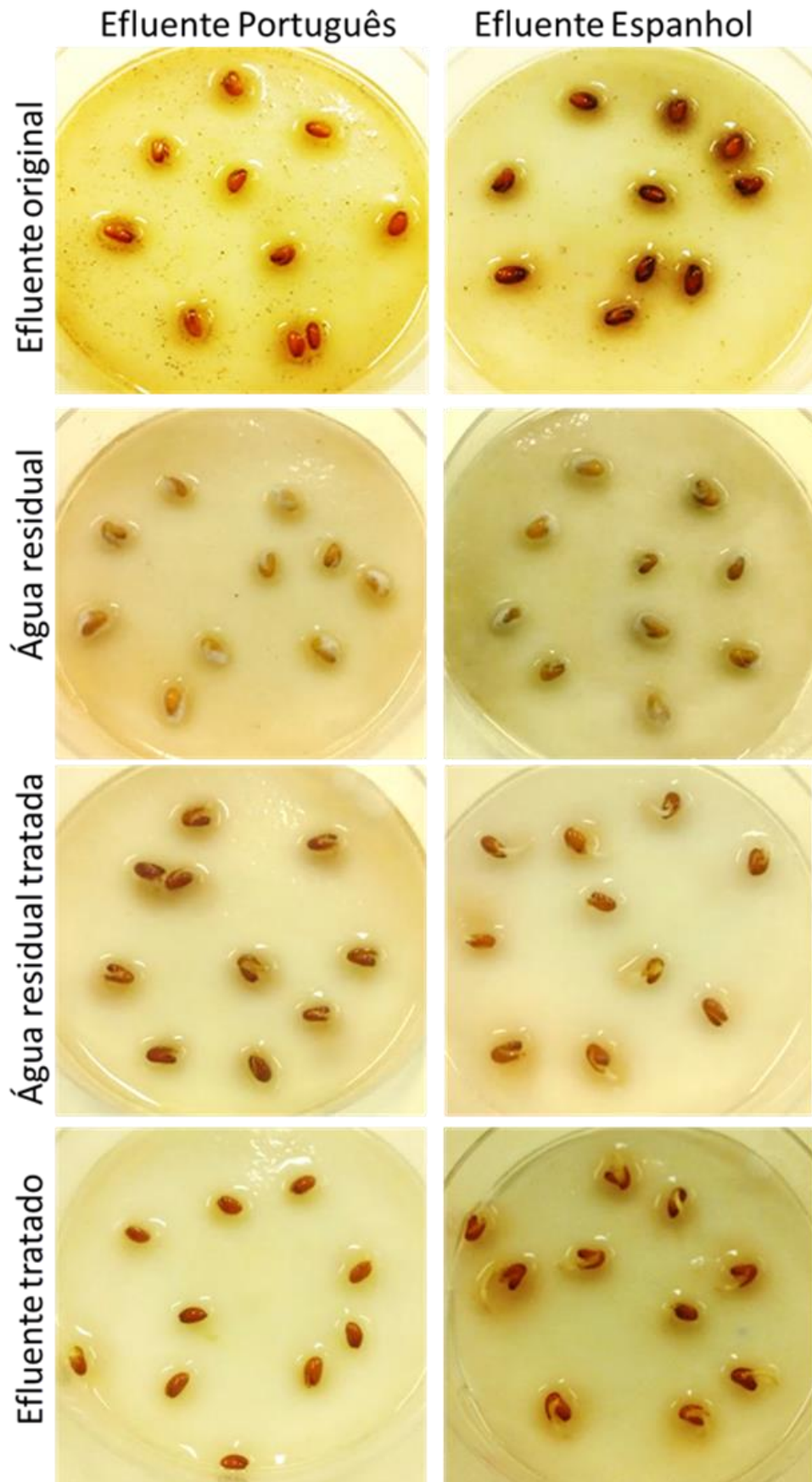


Figura 14 - Fitotoxicidade dos efluentes antes e após o processo de extração líquido-líquido sequencial e/ou processo de Fenton.

IV. Conclusões e propostas de trabalhos futuros

IV. 1. Conclusões

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em avaliar a recuperação de compostos antioxidantes presentes nas águas ruças provenientes de um sistema tradicional de prensas (efluente português) e de um sistema contínuo de duas fases (efluente espanhol), assim como no bagaço de azeitona húmido através da aplicação de um processo de extração sequencial.

Neste sentido, os resultados obtidos mostraram que, através de extração sequencial, foram obtidas, a partir das diferentes matérias-primas, frações antioxidantes que pela sua natureza química podem ter várias aplicações pois reagem de forma diferente aos radicais livres no meio.

Assim, pela aplicação do método de DPPH, conclui-se que dentro das frações obtidas existem algumas que conseguem, em determinadas concentrações, alcançar valores de atividade antioxidante muito interessantes, uma vez que estes valores são iguais aos alcançados pelos antioxidantes de referência. Pelo que, dentro destas a que apresenta maior capacidade antioxidante é a obtida com recurso a acetato de etilo a partir do efluente espanhol, seguindo-se as obtidas, com recurso ao mesmo solvente, a partir das outras duas matérias-primas. Por outro lado, conclui-se pela aplicação do método de oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linolénico, que dentro das frações obtidas existem algumas que revelam uma importante capacidade de proteger um substrato lipídico da oxidação. Sendo, estas as frações referentes ao efluente português obtidas com n-hexano e diclorometano, que alcançam percentagens de inibição de oxidação semelhantes aos dos antioxidantes de referência, e as frações referentes ao efluente espanhol, que apresentam percentagens de inibição um pouco menores.

A semelhança apresentada entre as atividades antioxidantes das águas ruças antes e após o processo de extração, determinadas pelos dois métodos referidos permitiu concluir também que apenas uma pequena quantidade de compostos responsáveis por esta atividade foi extraída/recuperada, existindo potencial para otimizar este processo.

Outro objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o potencial de recuperação de água, através do processo de Fenton, a partir dos efluentes de lagares de azeite, que passaram ou não por recuperação de compostos com potencial valor.

Neste sentido, reações de Fenton foram realizadas, levando à conclusão que os efluentes que não passaram pela recuperação de compostos com potencial valor obtiveram, no final do processo de Fenton, um menor valor de carência química de oxigénio que aqueles que

passaram. Por outro lado, levou também à conclusão que entre os dois efluentes usados (português e espanhol) aquele que no final deste processo obteve melhores remoções de carga orgânica foi o português.

No entanto, após o processo de Fenton, todas as águas continuam fitotóxicas e apresentam um valor de CQO acima dos permitidos para descarga nos cursos naturais de água. Concluindo assim que há a necessidade de avaliar sistemas integrados de vários tratamentos que permitam a recuperação efetiva da água.

IV. 2. Propostas de trabalhos futuros

No que respeita a trabalhos futuros propõem-se a avaliação de sistemas integrados de vários tipos de tratamento (envolvendo por exemplo ozonólise e sistemas foto-assistidos), por forma a obter água passível de ser encaminhada para os cursos naturais. Assim como, a avaliação da aplicação de uma metodologia de tratamento para o resíduo sólido, resultante do processo de extração sólido-líquido.

Outra proposta passa por realizar uma avaliação do teor fenólico e da atividade antimicrobiana das frações obtidas nos processos de extração, bem como a realização do isolamento de compostos antioxidantes presentes nestas.

Uma outra proposta de trabalho futuro passa também pela realização de processos de extração líquido-líquido sequencial, em que o efluente apresenta um pH inicial de 2, contando com a adição de sulfato de sódio anidro às águas ruças antes da extração, de forma tentar evitar a difusão parcial do solvente nas águas.

V. Referências Bibliográficas

- Aggouna M., Arhabd R., Cornua A., Portelli J., Barkatc M., Grauleta B., “*Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process*”, *Food Chemistry*, 209 (2016) 72–80.
- Aires, C. M. G. L. S., “*Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extracção de azeite em solos agrícolas - Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas.*” Tese de Doutoramento, Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica da Lisboa (2007).
- Albuquerque J.A., Gonzalez J., Garcia D., Cegarra J., “*Agrochemical characterisation of ‘alperujo’, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction.*”, *Bioresource Technology*, 91 (2004) 195–200.
- Allouche N., Fke I., Sayadi S. “*Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters*”, *J. Agric. Food Chem.*52 (2004) 267-273.
- Aparicio R., Harwood J., “*Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*”, 2nd.ed., Springer Science: New York (2013) p. 67-92 (capítulo 3).
- Araújo M., Pimentela F. B., Alves R. C., Oliveira M. B. P.P., “*Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants*”, *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2015) 200–211.
- Aruoma O.I., “*Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods*”, *Mutation Research* 523–524 (2003) 9–20.
- Azbar N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglv A., Sengul F., Ozer A., “*A review of waste management options in olive oil production*”, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34, 3 (2004) 209–247.
- Braga M. E. M. , Santos R. M.S., Seabra I.J., Facanali R., Marques M. O.M., Sousa H. C. “*Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark*”, *The Journal of Supercritical Fluids*, 47 (2008) 37–48.
- Boskou D., “*Olive oil: minor Constituents and Health*”, 1st ed., CRC Press (2008) p. 21-23.
- Britto J., Rangel M., “*Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais*”, *Química Nova*, 31 (2008) 114.
- Casa R., D’ Annibale A., Pieruccetti., Stazi S. R., Sermanni G. G., Lo Cascio B., “*Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (Triticum durum Desf.) germinability*”, *Chemosphere*, 50 (2003) 959–966.
- Castro S. M. O. “*Otimização de reator semi-contínuo piloto para tratamento de efluentes por oxidação química com reagente de Fenton*”, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (2014).
- De Marco E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R., “*Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters*”, *Food Chemistry*, 104 (2007) 858–867.
- Dermeche S., Nadour M., Larroche C. Moulti-Mati F., Michaud F., “*Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies*”, *Process Biochemistry*, 48 (2013) 1532–1552.

- Duarte-Almeida J. M., Santos R. J., Genovese M. I., Lajolo F. M., “*Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH*”, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (2006) 446–452.
- El-Gohary F., Badawy M., El-Khateeb M., El-Kalliny A., “*Integrated treatment of olive mill wastewater (OMW) by the combination of Fenton’s reaction and anaerobic treatment*”, *Journal of Hazardous Materials*, 162 (2009) 1536–1541.
- Favors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds 2- mass spectral Database - Willey.
- Ferraz, M. “*Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite.*” (2012), Tese de mestrado em engenharia do ambiente, Universidade nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias.
- Gebreyhannesa, A. Y., Mazzeia R., Giorno L., “*Review: Trends and current practices of olive mill wastewater treatment: Application of integrated membrane process and its future perspective*”, *Separation and Purification Technology* 162 (2016) 45–60.
- Hammerschmidt P.A., Pratt D.E., Phenolic antioxidants of dried soybeans, *Journal of Food Science* 43 (1978) 556–559
- Hernández D., Astudillo L., Gutiérrez M., Tenreiro C., Retamal C., Rojas C., “*Biodiesel production from an industrial residue: Alperujo*”, *Industrial Crops and Products*, 52 (2014) 495–498.
- Kalogerakis N., Politi M., Foteinis S., Chatzisyneon E., Mantzavinos D., “*Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: A viable solution that promotes their overall sustainable management*”, *Journal of Environmental Management*, 128 (2013) 749–758.
- Kapellakis I.E., Tsagarakis K.P., Crowther J.C., “*Olive oil history, production and by-product management*”, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7 (2008) 1–26.
- Lafka T., Lazou A. E., Sinanoglou V. J., Lazos E. S. “*Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes*”, *Food Chemistry*, 125 (2011) 92–98.
- Leouifoudi I., Harnafi H., Zyad A., “*Olive Mill Waste Extracts: Polyphenols Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities*”, *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015 (2015) 714138.
- Lesage-Meessen L., Navarro D., Mauniera S., Sigoillota J-C., Lorquinb J., Delattrea M., Simonc J-L., Asthera M., Labatb M., “*Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems*”, *Food Chemistry*, 75: 4 (2001) 501–507.
- Lucas M. S., Peres J. A., “*Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton’s reagent: Kinetic study*”, *Journal of Hazardous Materials*, 168 (2009) 1253–1259.
- Martins, R.C.; Leal, H.C.; Quinta-Ferreira, R.M. “*Single and catalytic ozonation for phenolic wastewaters remediation, in: Current Themes in Engineering Technology*” American Institute of Physics: New York, 2008.
- Martins R. C., Rossi A. F., Quinta-Ferreira R. M., “*Fenton’s oxidation process for phenolic wastewater remediation and biodegradability enhancement*”, *Journal of Hazardous Materials*, 180 (2010) 716–721.
- Martins R. C., Silva A.M.T., Castro-Silva S., Garção-Nunes P., Quinta-Ferreira R. M., “*Adopting strategies to improve the efficiency of ozonation in the real-scale treatment of olive oil mill wastewaters*”, *Environmental Technology*, 31:13 (2010) 1459–1469.

- Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., dos Santos T.C, Coube C. S., Leitão S. G., “*Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method, Phytother*”. Res. 15 (2001) 127–130.
- Mert B., Yonar T., Kiliç M., Kestioglu K., “*Pre-treatment studies on olive oil mill effluent using physicochemical, Fenton and Fenton-like oxidations processes*”, Journal of Hazardous Materials, 174 (2010) 122–128.
- Metcalf L., Eddy H. – Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw-Hill (2003).
- Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F. F., “*Polyphenolic Content in Olive Oil Waste Waters and Related Olive Samples*”, 49 (2001).
- Niaounakis, M. e Halvadakis, C.P., “*Olive processing waste management. Literature review and patent survey*”, 2nd ed., Elsevier (2006) p. 96–99.
- Niki E., “*Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo*”, Free Radical Biology and Medicine, 49:4 (2010) 503–515.
- Ngo D., Wijesekara I., Vo T., Ta Q. V., Kim S., “*Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview*”, Food Research International, 44 (2011) 523–529.
- Papaphilippou P. C., Yiannapasa C., Politi M., Daskalaki V. M., Michael C., N. Kalogerakis, D. Mantzavinos, Fatta-Kassinou D., “*Sequential coagulation–flocculation, solvent extraction and photo-Fenton oxidation for the valorization and treatment of olive mill effluent*”, Chemical Engineering Journal, 224 (2013) 82–88.
- Paraskeva P., Diamadopoulos E. “*Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review*”, J Chem Technol Biotechnol, 81 (2006) 1475–1485.
- Pokorný, J., “*Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants?*”, European journal lipid science technology, 109 (2007) 629–642.
- Preedy V. R., Watson R. R., “*Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*”, Academic Press (2010) 1106.
- Prior R. L., Cao G., “*In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods*”, Free Radical Biology & Medicine, 27 (1999) 1173–1181.
- Rahmanian N., Jafari S. M., Galanakis C. M. “*Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater*”, J Am Oil Chem Soc, 91 (2014) 1–18.
- Rima J., Rahme K., Assaker K. “*Advanced Oxidation of Olive Mill Wastewater OMW by an Oxidative Free- Radical Process Induced With Zero Valent Iron*”, Journal of Food Research, 3:6 (2014).
- Rincón B., Bujalance L., Feroso F.G., Martín A., Borja R., “*Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics*”, Bioresource Technology, 140 (2013) 249–255.
- Rodrigues F., Pimentela F.P, Oliveira M.B. P.P. “*Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry*”, Industrial Crops and Products, 70 (2015) 116–124.
- Rodríguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., Cocero M.J, “*Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents*”. Journal of Food Engineering 109 (2012) 98–103.
- Roig A., Cayuela M. L., Sanchez-Moredeno M. A., “*An overview on olive mill wastes and their valorisation methods*”, Waste management, 26 (2006) 960–969.

- Ruiz-Méndez M. V., Romero C., Medina E., García A., Castro A., Brenes M. “*Acidification of Alperujo Paste Prevents Off-Odors During Their Storage in Open Air*”, *J Am Oil Chem Soc*, 90 (2013) 401–406.
- Sermakkani M., Thangapandian V., “*GC-MS analysis of Cassia Italica leaf methanol extract*”, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (2012) 90–94.
- Servili M., Montedoro G., “*Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality*”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104 (2002) 9–10.
- Shahidi F., Ambigaipalan P., “*Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review*”, *Journal of Functional Foods*, 18 (2015) 820–897.
- Soares S. E., “*Ácidos fenólicos como antioxidantes: revisão*”, *Revista de Nutrição, Campinas*, 15 (2002) 71–81.
- Sørensen A. M., Haahr A., Becker E. M., Skibsted L. H., Bergenståhl B., Nilsson L., Jacobsen C., “*Interactions between Iron, Phenolic Compounds, Emulsifiers, and pH in Omega-3 Enriched Oil-in-Water Emulsions*”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 1740–1750.
- Stalikas C. D. “*Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids: review*”, *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 3268–3295.
- Stasko A, Brezová V., Biskupic S., Misík V., “*The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solventes*”, *Free Radical Research* 41 (2007) 379–390.
- Stasinakis A. S., “*Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment – a mini review*”, *Global NEST Journal*, 10:3 (2008) 376–385.
- Trautmann, N.M.; Krasny, M.E. “*Composting in the classroom - Inquiry for High School Students*”. (2nd edition). Dubuque, Iowa: Kendall Hunt Publishing Company (1997).
- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M., “*The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health*”, *Nutrition Research Reviews*, 18 (2005) 98–112.
- Tsagaraki E, Lazarides H.N., Petrotos K.B. “*Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. In: Olive mill wastewater treatment*”, Springer, Berlin (2007) 148.
- Velamganni J. Kadambani D., Tangavelou A.G., “*Phytochemical screening and antimicrobial activity of the stem of Mallotus Philippensis (Lam.) Muell. Arg. Var. Philippensis (Euphorbiaceae)*”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2011) 160–163.
- Zbakh, H., El-Abbassi. A. “*Potential use of olive mill wastewater in the preparation of functional beverages: A review*”, *Journal of Functional Foods*, 4:1 (2012) 53–65.

Anexos

Anexo A - Informação adicional das técnicas analíticas usadas

Tabela A1 – Curvas de calibração usadas para a quantificação no HPLC.

Composto	λ (nm)	Curva de calibração	R^2
Tirosol	215	$y = 2E+07x$	0,977
	254	$y = 1E+06x$	0,970
Ácido siríngico	254	$y = 6E+06x$	0,973
Oleuropeína	254	$y = 8E+06x$	0,994
	280	$y = 3E+06x$	0,993
Ácido p-cumárico	254	$y = 6E+06x$	0,935

(x: concentração em mg.mL^{-1} ; y: área do pico)

Tabela A2 – Curvas de calibração usadas para a quantificação no GC.

Composto	Curva de calibração	R^2
Ácido oleico	$y = 5E+07x$	0,999
Esqualeno	$y = 3E+07x$	0,990

(x: concentração em mg.mL^{-1} ; y: área do pico)

Tabela A3 – Curva de calibração usadas para a determinação do CQO.

Curva de calibração	R^2
$y = 4620,2x - 50,304$	0,998

(x: absorvância; y: concentração em $\text{mg O}_2.\text{L}^{-1}$)

Tabela A4 – Curva de calibração usadas para a determinação do TPh.

Curva de calibração	R^2
$y = 1216,4x - 2,7913$	0,997

(x: absorvância; y: concentração em $\text{mg de ácido gálico.L}^{-1}$)

Tabela A5 – Volume de amostra por gama de CQO (Metcalf e Eddy, 2003)

Gama de CQO (mg O ₂ .L ⁻¹)	Volume de amostra (mL)
0-7	300,00
4-14	100,00
10-35	50,00
20-70	20,00
40-140	10,00
120-420	5,00
300-1050	2,00
600-2100	1,00
1200-4200	0,50
3000-10500	0,20
6000-21000	0,10
12000-42000	0,05
30000-105000	0,02

Tabela A6 – Classificação da fitotoxicidade do efluente (Trautmann e Krasny, 1997)

Gama de valores de GI (%)	Classificação do efluente
< 40	Muito fitotóxico
40-60	Fitotóxico
60-80	Moderadamente fitotóxico
80-100	Não fitotóxico
>100	Potencia a germinação e o crescimento da raiz das plantas

Anexo B – Análises de TLC realizadas



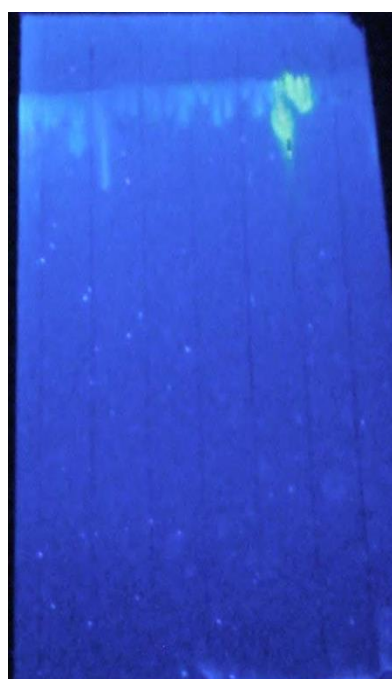
Fase móvel: acetato de etilo:hexano - 1:1 (v/v)



Fase móvel: acetato de etilo:hexano - 2:8 (v/v)



Fase móvel: acetato de etilo:acetona:água
30:10:0,3 (v/v)

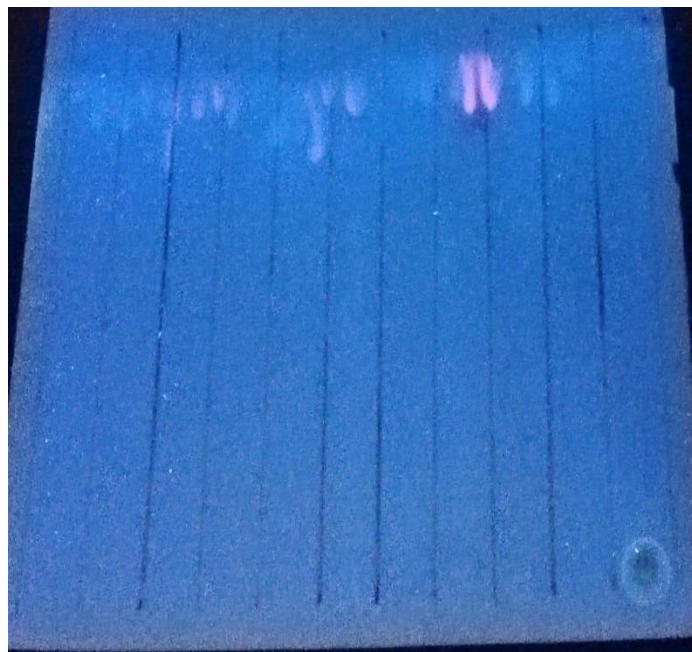


Fase móvel: acetato de etilo:ácido fórmico:água
65:15:20 (v/v)



Fase móvel:

acetato de etilo:ácido fórmico:etanol
65:15:20 (v/v)



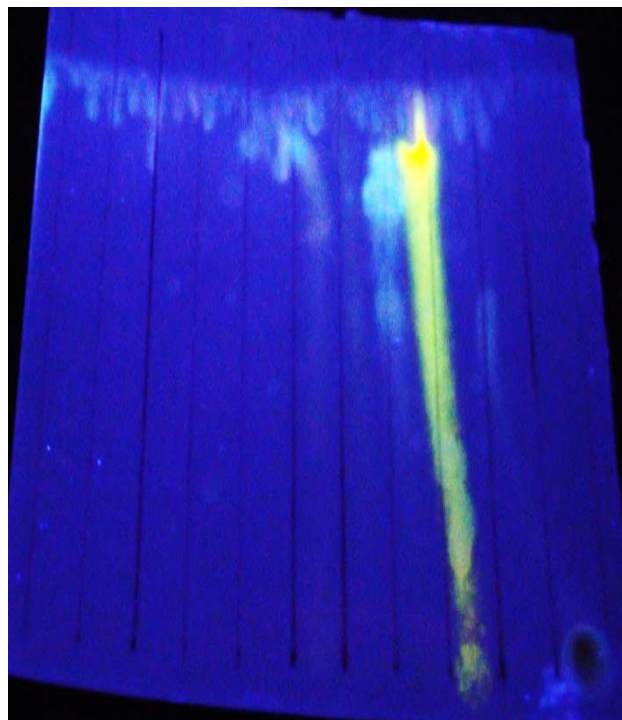
Fase móvel:

acetato de etilo:1,4-dioxano:água - 30:10:0,3 (v/v)



Fase móvel:

acetato de etilo:ácido fórmico:tolueno
65:15:20(v/v)



Fase móvel: acetato de etilo:ácido fórmico:tolueno

40:15:45 (v/v)

