SCAP
SOCIEDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE PORTUGAL

Gestão de efluentes vinícolas: potencialidades da sua reutilização na rega de espécies ornamentais

Winery wastewater management: potential of its reuse in the irrigation ofornamental species

Teresa R. Freitas[1,*], Mafalda Pires[1], Berta Gonçalves[1], Helena Ferreira[1], José A. Peres[2] e Eunice Bacelar[1]

[1] *CITAB (Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas, DeBA (Departamento de Biologia e Ambiente), UTAD (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro), Vila Real, Portugal*
[2] *Centro de Química de Vila Real (CQVR), Departamento de Química, UTAD, Vila Real, Portugal*
*(*E-mail: teresa.raquel.freitas@gmail.com)*

https://doi.org/10.19084/rca.16715
Recebido/received: 2019.01.18
Aceite/accepted: 2019.05.02

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a possibilidade da reutilização de um efluente vinícola (EV) tratado para rega de espécies ornamentais. Para tal, realizaram-se inicialmente testes de fitotoxicidade em sementes de *Lepidium sativum* e uma mistura de relva, sujeitas a concentrações crescentes de EV e um ensaio de rega em *Petunia* x *atkinsiana* com quatro tratamentos: EV sem diluição (EV100%), EV diluído (EV60%), EV com correção de pH (EVT) e controlo (EV0%). Após o ensaio, realizaram-se análises morfo-fisiológicas e bioquímicas. Os testes revelaram que as concentrações de EV potenciaram a germinação da mistura de relva, apesar de terem sido moderadamente fitotóxicas para *L. sativum*. Relativamente ao ensaio de rega em *P.* x *atkinsiana*, os tratamentos EV0% e EV100% destacaram-se positivamente em relação aos tratamentos EV60% e EVT no crescimento e anatomia foliar. Contudo, não ocorreram alterações nas concentrações foliares de pigmentos fotossintéticos e fenóis totais. Apesar do comprimento do sistema radicular e áreas radicular e foliar terem sido superiores nas plantas EV0%, não se registaram alterações na cor e no número de flores entre tratamentos. Estas caraterísticas visuais e estéticas são muito valorizadas comercialmente em espécies ornamentais. Portanto, conclui-se que a reutilização de EVs na rega de petúnias poderá ser uma alternativa sustentável.

Palavra-chave: Análise de crescimento, Anatomia foliar, Fitotoxicidade, *Petunia* x *atkinsiana*, Reutilização de efluentes.

ABSTRACT

This study evaluated the possibility of reuse treated winery wastewater (EV) for the irrigation of ornamental species. For that, initially phytotoxicity tests were made in seeds of *Lepidium sativum* and a grass mixture exposed to increasing concentrations of EV and an irrigation experiment in *Petunia* x *atkinsiana* with four treatments: winery wastewater without dilution (EV100%), diluted EV (EV60%), EV with corrected pH (EVT) and control (EV0%). After the irrigation experiment, morphological and biochemical analyses were performed. The tests revealed that EV potentiated germination of grass mixture seeds, although it was moderately phytotoxic to *L. sativum*. In the irrigation experiment in *P.* x *atkinsiana*, the EV0% and EV100% treatments stood out positively in relation to EV60% and EVT treatments in growth and leaf anatomy. However, there were no changes in the foliar concentrations of photosynthetic pigments and total phenols. Although length of the root system and root and leaf areas were higher in EV0% plants, there were no changes in colour and number of flowers in treatments. These visual and aesthetic characteristics are valued commercially in ornamental species, so it was concluded that the reuse of EVs for irrigation of petunias may be a sustainable alternative.

Keywords: Growth analysis, Leaf anatomy, *Petunia* x *atkinsiana*, Phytotoxicity, Reuse of wastewater.

INTRODUÇÃO

O setor vinícola é um dos setores agroindustriais com maior importância económica e cultural a nível mundial. Como estimado pela Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) no final de 2017 a produção mundial de vinho correspondeu a cerca de 250 MhL, valor menor em relação ao ano de 2016 devido ao efeito das alterações climáticas (OIV, 2018). Portugal no ano 2017 produziu aproximadamente 6,7 MhL de vinho sendo que, deste valor, sensivelmente 1,4 MhL corresponderam à região vitícola do Douro (Instituto da Vinha e do Vinho – IVV, 2018). Portugal é um país com longa tradição na produção de vinho sendo que, em 2016, ganhou 3197 prémios em 28 concursos (*World Ranking of Wines & Spirits* – WRW&S, 2016). O aumento das exportações de vinho português demonstra também o dinamismo do setor que revela um impacto positivo na economia portuguesa.

Nos centros de vinificação associados à elevada produção de vinho está, inevitavelmente, a geração de efluentes vinícolas (EVs), que são principalmente resultantes de lavagens diversas (equipamentos, tubagens, cubas de fermentação prensas, filtros, pavimentos, entre outros) e de perdas de mosto e vinho, uma vez que as adegas devem ser meticulosamente limpas para evitar a contaminação e a deterioração dos materiais e do produto final (Mulidzi, 2001). Os EVs apresentam uma elevada carga orgânica e, normalmente, alguns compostos fenólicos que dificultam a sua degradação biológica. Estes factos podem causar um problema ambiental grave, sendo essencial um tratamento adequado antes da sua descarga para o ambiente (Pirra, 2005; Lucas e Peres, 2011). Cada centro de vinificação produz efluentes com caraterísticas qualitativas e quantitativas diversificadas. O volume e a composição do efluente variam de acordo com os processos de produção, a sazonalidade, a dimensão da adega e as suas caraterísticas, o tipo de vinho, a região de produção, os equipamentos utilizados e as tradições e práticas enológicas (Pirra, 2009; Hirzel *et al*., 2017). Segundo Welz (2016) estima-se que por cada litro de vinho produzido são gerados entre 0,2 a 4 litros de EVs. A reutilização de efluentes vinícolas tratados para a rega pode ser considerada um elemento chave para o desenvolvimento ambientalmente sustentável desta agroindústria (Gvozdenac *et al*., 2014). Segundo Kumar (2008) e Marinho *et al*. (2013), ao nível empresarial a reutilização de EVs permite melhorar a gestão dos recursos hídricos ao reduzir os custos associados ao consumo de água e ao seu tratamento, promover a rega sustentável e a qualidade do meio ambiente pela redução da carga poluente que é descarregada nos ecossistemas aquáticos com o aproveitamento dos nutrientes existentes nas águas residuais e no balanço de carbono positivo. Para além das indústrias vitivinícolas os viveiros de plantas ornamentais também podem beneficiar da reutilização de EVs para a rega das suas plantas, uma vez que os efluentes são uma fonte de água e nutrientes. Ainda, são uma alternativa económica e contribuem para a diminuição do uso das águas superficiais e recarga dos reservatórios de água subterrânea (Lubello *et al*., 2004). Em 2012, identificaram-se em Portugal cerca de 1010 explorações com culturas ornamentais, que ocupavam 1365 ha em Portugal (Costa *et al*., 2014). A presença de nutrientes e matéria orgânica nos EVs podem estimular o crescimento da planta, mas os teores excessivos de elementos tóxicos (como por exemplo metais pesados ou a salinidade) podem provocar queimaduras nas folhas e problemas de toxicidade (Cordeiro, 2012; Marinho *et al*., 2013). Por isso, antes de qualquer reutilização de efluente na rega, deve-se aplicar um tratamento eficiente ao efluente para que sejam reduzidos os riscos que lhe estão associados (Kumar, 2008). O potássio presente nos EVs é um ativador de grande número de enzimas, regulador de pressão osmótica e é importante na fotossíntese (Mulidzi, 2001). Ao se realizarem estudos fisiológicos, bioquímicos e morfo-anatómicos às plantas poderá ser possível confirmar se existem elementos nos efluentes que alteram o seu desenvolvimento (estimulando ou prejudicando).

Neste estudo, pretendeu avaliar-se a reutilização de um EV tratado na rega de espécies ornamentais e, para isso, realizaram-se inicialmente testes de fitotoxicidade em *Lepidium sativum* e uma mistura de relva com diferentes concentrações de EV. A espécie *L. sativum* é frequentemente utilizada em testes de fitotoxicidade devido à sua elevada sensibilidade a componentes tóxicas e a mistura de relva ("Prado Florido") está disponível comercialmente para utilização em zonas ornamentais de manutenção reduzida. Posteriormente, realizou-se um ensaio de rega em petúnia comum (*Petunia* x *atkinsiana*) com

quatro tratamentos distintos. No final do ensaio, estudaram-se as respostas ao nível morfo-fisiológico, histológico e bioquímico para avaliar o efeito da rega com EVs no crescimento das plantas. *P.* x *Atkinsiana* é uma espécie ornamental criada pelo cruzamento de várias espécies selvagens, provenientes da América do Sul e pertence à família das Solanaceae (Vandenbussche *et al*., 2016). Trata-se de uma espécie mundialmente conhecida e utilizada para melhorar a qualidade das paisagens, decorando os jardins, canteiros, vasos pendentes, floreiras e outros espaços ornamentais, que com as suas diversas cultivares, ocupa o primeiro lugar na hierarquia de flores utilizadas na decoração de espaços verdes (Cantor *et al*., 2015). Apresenta também crescimento relativamente fácil, rápido e um longo período de floração (Popescu e Popescu, 2015). É frequentemente utilizada em estudos científicos de modelação de sistemas de rega de espaços verdes para torná-los mais eficientes, também revela rápido e fácil desenvolvimento e resistência a fatores de stresse (Isern *et al*., 2012; Popescu e Popescu, 2015; Vandenbussche *et al*., 2016). A Petúnia mostra uma combinação de caraterísticas morfológicas, estruturais e fisiológicas que determinam a sua capacidade adaptativa em ambientes distintos (Dellaferrera *et al*., 2015). Deve-se ter em conta que a rega em plantas ornamentais é uma opção benéfica e mais fácil em comparação com a rega de espécies agrícolas, por não serem usadas para consumo humano e os requisitos para o tratamento dos efluentes serem menos exigentes (Marinho *et al*., 2013). É fundamental nas espécies ornamentais que o aspeto visual seja preservado e se possível melhorado. A área foliar, a cor da folha e da flor, o número de folhas e flores são fatores que identificam a qualidade estética da planta, bem como o seu valor comercial (Bañón *et al*., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

Caraterização físico-química do Efluente Vinícola

Para o ensaio em questão foi selecionado um EV proveniente da Região Demarcada do Douro (RDD) com caraterísticas habituais dos EVs gerados em centros de vinificação e submetidos a um tratamento primário. Anteriormente aos testes de fitotoxicidade e ao ensaio de rega foram realizadas análises físico-químicas ao EV no laboratório de Tecnologias Agroambientais da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). A caraterização físico-química do EV permitiu verificar se o mesmo estava em conformidade com as normas, critérios e objetivos de qualidade dos efluentes com a finalidade de proteger o meio ambiente e melhorar a qualidade das águas residuais em função dos seus principais objetivos segundo o Decreto-Lei nº 236/98 (Legislação Portuguesa) e a Norma Portuguesa 4434.

Para a determinação dos parâmetros físico-químicos foi utilizada a metodologia proposta em "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"* (*American Public Health Association* – APHA, 2005). A quantificação da Carência Química de Oxigénio (CQO) foi determinada pela metodologia *Standard Methods* 5220D (APHA, 2005) com o auxílio do espectrofotómetro UV/Vis (UV/Vis, Hach DR/2400, EUA).

Para determinar a Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5) usou-se a metodologia *Standard Methods* 5210D (APHA, 2005), a partir do método manométrico com sensor de pressão Oxi-Top (Respirometric OxiTop®, WTW, Alemanha). O Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico (CI) foram determinados após combustão catalítica a 680 ºC, seguindo a metodologia *Standard Methods* 5310B (APHA, 2005) e acidificação, respetivamente, usando ambos um detetor infravermelho não-dispersivo (NDIR) num analisador Shimadzu TOC-L_{CSH} (Japão) equipado com um amostrador automático ASI-L. O Carbono Orgânico Total (COT) foi obtido pela diferença entre CT e CI. A medição do pH foi realizada por leitura direta usando um elétrodo HANNA pH 209 através da metodologia *Standard Methods* 4500-H^+ (APHA, 2005). Os polifenóis totais foram determinados por espectrofotometria usando o método de Singleton e Rossi (1965) adaptado. O sódio e potássio foram determinados por absorção atómica de emissão, o magnésio e cálcio por absorção atómica com chama, a quantificação dos diferentes metais foi realizada por cromatografia iónica respeitando a metodologia do *Standard Methods*.

Testes de Fitotoxicidade

Através dos testes de fitotoxicidade é possível determinar se existem no efluente substâncias que

possam inibir a germinação de sementes e o crescimento das raízes (Bragança *et al*., 2018). Para os testes de fitotoxicidade utilizou-se a espécie *Lepidium sativum* (agrião-de-jardim) e uma mistura de relva ("Prado Florido"). A espécie *L. sativum* (Somers, Bélgica) é frequentemente utilizada para avaliar a toxicidade das águas residuais, uma vez que evidencia sensibilidade no seu desenvolvimento quando colocada em contacto com toxinas (Arienzo *et al*., 2009). A mistura de relva (Greenkeeper, Portugal) é constituída por 50% de *Festuca ovina* subsp. *duriuscula*, 40% de *Festuca rubra* subsp. *rubra* e 3% de mistura de flores campestres. Várias espécies do género *Festuca* são frequentemente utilizadas em testes de fitotoxicidade para avaliar o efeito de compostos químicos (como pesticidas) no meio ambiente (Qi *et al*., 2015). A execução experimental teve a duração de 14 dias e foram comparadas diferentes concentrações crescentes de EV (0, 20, 40, 60, 80 e 100%). Para cada concentração efetuaram-se 5 réplicas com 10 sementes em cada placa de Petri às quais se adicionou 4 mL da solução. Nos primeiros 7 dias as soluções permaneceram numa estufa ventilada a 25± 2 ºC, sem luminosidade (P selecta, CD 2003711, Espanha). Após este período, foram colocadas sobre luz artificial com um período de 11 horas de luminosidade e *à temperatura ambiente de 25 ± 2 ºC*. Após os 14 dias, identificou-se o número de sementes germinadas e mediu-se o comprimento das raízes com um paquímetro digital (Mitutoyo, Reino Unido) o que permitiu calcular a Percentagem Relativa Média de Germinação (RSG) com a Percentagem Relativa do Comprimento das Raízes (RRG). As seguintes fórmulas foram definidas segundo Hoekstra *et al*. (2002):

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

Onde $N_{SG,T}$, *é* o número de sementes germinadas em cada extrato (efluente) e *é* a média do número de sementes germinadas na solu*ção* padrão (água destilada).

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

Onde $L_{R,T}$ *é* o comprimento médio das raízes no extrato aquoso e *é* o comprimento médio das raízes do branco de controlo.

A partir da relação entre a RSG e a RRG determina-se o índice de germinação (IG), que é o índice mais completo para descrever o potencial fitotóxico de um material (Varnero *et al*., 2007). Foi calculado pela fórmula sugerida por Tiquia e Tam (1998):

$$IG\ (\%) = \frac{RSG \times RRG}{100}$$

Ensaio de rega em petúnias

O ensaio foi realizado no laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia e Ambiente da UTAD e teve a duração de 35 dias. Compararam-se 4 tratamentos: efluente sem diluição – EV100%; efluente diluído com 60% de efluente – EV60%, EV sem diluição, mas com correção de pH utilizando o hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) – EVT e o tratamento EV0% em que as plantas foram regadas com H_2O desionizada. Os tratamentos EV60% e EVT foram incluídos neste estudo pois a diluição e a correção de pH são as formas mais simples e também as mais utilizadas para que os efluentes vinícolas cumpram os critérios impostos pela legislação (Mulidzi, 2001; Arienzo *et al*., 2009; Lucas e Peres, 2011).

Material vegetal

Inicialmente foram adquiridas 100 plantas a espécie de *Petunia* x *atkinsiana* com apenas 24 dias a um viveirista local, as quais, ao fim de 9 dias de aclimatação às condições experimentais, foram colocadas em vasos de capacidade volumétrica de 50 mL com um substrato constituído por turfa, sem fertilizantes (*GreenPlants*, Espanha) e uma pequena porção de perlite, sobre o substrato, para evitar perdas de água por transpiração. Para cada tratamento utilizaram-se 25 plantas de petúnia comum (*P.* x *atkinsiana*) com caraterísticas morfológicas semelhantes. Durante o estudo as plantas permaneceram à temperatura média de 25-30 ºC, com fotoperíodo de 13 horas de luz natural (irradiância de 600-700 μmol m^{-2} s^{-1}) e humidade relativa moderada. O cálculo das necessidades hídricas das plantas efetuou-se através do seguinte procedimento: encheram-se quatro vasos com igual capacidade volumétrica e igual quantidade de substrato utilizado para o crescimento das petúnias.

Seguidamente foi calculada a capacidade de vaso, ou seja, o conteúdo de água retido pelo substrato após sofrer saturação através do humedecimento e drenagem da água pelos orifícios localizados na base dos vasos. A partir desse cálculo foi determinada a quantidade de água a aplicar, que correspondeu a cerca de 30 mL. Portanto, ao longo do ensaio todas as plantas foram regadas com 30 mL duas vezes por semana no período da manhã (8.00 h). Na fase de plena floração, as plantas foram regadas três vezes por semana.

Análise de crescimento

No final da experiência, quando as petúnias estavam bem desenvolvidas e em plena floração, retiraram-se cuidadosamente dos vasos 8 plantas de cada tratamento. Mediu-se o comprimento e a largura das folhas (mm), o comprimento das raízes (mm) e o comprimento e diâmetro do caule (mm) com um paquímetro digital. Também foi avaliado o número total de folhas e flores de cada planta e determinaram-se as áreas foliares e radiculares através do sistema de análise de imagem WinDIAS 1 (Delta-T Devices Ltd, Reino Unido).

Anatomia foliar

Recolheram-se 5 folhas totalmente expandidas de 5 plantas de *P.* x *atkinsiana* por tratamento e utilizou-se sempre a secção da região mediana a fim de evitar diferenças de espessura ao longo da folha. As preparações definitivas foram elaboradas com as técnicas usuais de inclusão em parafina após a fixação em FAA (formol: ácido acético glacial: etanol 70%; 1:1:18), desidratação em série alcoólica etílica (70, 80, 90, 95 e 100 %) e passagem por xilol (Johansen, 1940; Berlyn e Miksche, 1976). Após a inclusão, efetuou-se o corte do material no micrótomo (Leica RM 2135, Leica Microsystem GmbH, Alemanha) e a colagem em lâminas, em banho-maria (54 °C) (Leica Biosystems Hi 1210 Histology Water Bath, Alemanha). Após 48 horas, procedeu-se à desparafinação em xilol e hidratação em série alcoólica etílica (100-70 %) e coloração com azul de toluidina 0,1 % (O'Brien *et al*., 1964). De seguida lavou-se, desidratou-se, passou-se por xilol e efetuou-se a montagem das preparações em Entellan® (Merck, Alemanha). Finalmente, procedeu-se à observação, análise e medição dos seguintes parâmetros: espessura da lâmina foliar; diâmetro transversal e longitudinal do tecido vascular e espessura da nervura central num microscópio ótico invertido Olympus IX51 (Olympus Biosystem, Alemanha) com câmara digital (Color View III, Soft Imaging System GmbH, Alemanha) e o Digimizer versão 4.6.1 (MedCalc software, Bélgica).

Análises Bioquímicas

Foram determinadas nas folhas de *P.* x *atkinsiana* as concentrações de pigmentos fotossintéticos e de compostos fenóis totais e a concentração de antocianinas totais nas pétalas das flores.

A determinação do teor de pigmentos fotossintéticos foi realizada segundo o protocolo proposto por Arnon (1949) e Sesták *et al.* (1971). Recolheram-se 8 discos foliares das plantas de cada tratamento. O macerado obtido foi homogeneizado em acetona a 80 % (v/v). Em seguida, procedeu-se à centrifugação (Centurion Scientific LTD, PrO-Research K2015R, Reino Unido). E procedeu-se à leitura das absorvâncias 663 nm e 645 nm no espectrofotómetro (Carry 100 Uv-Vis, Varian Palo Alto, EUA). Posteriormente, as concentrações de Clorofila a (Cl_a; mg g^{-1}), Clorofila b (Cl_b; mg g^{-1}) e Clorofila Total (Cl_{total}; mg g^{-1}) foram calculadas segundo as fórmulas propostas por Mackinney (1941). Para a quantificação dos Carotenoides Totais (Car; mg g^{-1}) foi utilizado o mesmo extrato, porém as leituras foram efetuadas com um comprimento de onda de 470 nm e aplicou-se a equação proposta por Lichtenthaler (1987). Ainda se determinou a razão entre Clorofila a e Clorofila b (Cl_a/C_b) e a razão entre a Clorofila total e Carotenoides (Cl_{total}/Car).

As concentrações dos fenóis totais foram determinadas de acordo com o procedimento adaptado do método de *Folin-Ciocalteu* (Singleton e Rossi, 1965). A 200 µL de extrato usado nos pigmentos fotossintéticos adicionou-se 1 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* e 800 µL de Na_2CO_3 a 7,5%. Posteriormente, homogeneizaram-se as amostras e efetuaram-se as leituras a 765 nm no espectrofotómetro. Para a conversão do valor de absorvância, efetuou-se uma curva-padrão, cujo padrão foi o ácido gálico.

Para determinar a concentração de antocianinas totais recolheram-se as 4 flores de *P.* x *atkinsiana* em plena floração disponíveis por tratamento. A concentração de antocianinas totais está comumente associada ao desenvolvimento da corola da petúnia e são atingidas antes da antese (Weiss *et al*., 1988). Após a recolha pesaram-se as flores que foram seguidamente, maceradas em azoto líquido. Adicionou-se a cada amostra 6 mL de CH_3OH com 1% de HCl. De seguida, as preparações foram homogeneizadas e centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Por fim, foram feitas as leituras da absorvância de 250 nm (Abdel-Aal e Hucl, 1999; Macías *et al*., 2013).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA a um fator no programa IBM SPSS Statistics, versão 23 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS, Chicago, EUA). Para a comparação de médias utilizou-se o teste múltiplo de Tukey para um intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caraterização físico-química do Efluente Vinícola

As águas residuais tratadas podem ser reutilizadas e aplicadas na rega de espaços verdes desde que os paramentos físico-químicos estejam em conformidade com o Decreto-Lei nº 236/98. No caso do efluente em estudo (EV100%), segundo a análise do Quadro 1, apresentou valores de CQO (1220 mg O_2 L^{-1}), CBO_5 (730 mg O_2 L^{-1}) COT (332 mg C L^{-1}), metais pesados e nutrientes (Quadro 1) em conformidade com o Decreto-Lei nº 236/98. Pelo contrário, o valor de pH (4,14) não se encontra em conformidade com a legislação, cujo VMR (Valor Máximo Recomendável) é de 6,5-8,4. No entanto, o pH do efluente estava muito próximo do VMA (Valor Máximo Admissível; 4,5-9,0). O baixo pH pode interferir negativamente com a concentração de nutrientes disponíveis para a planta (Mulidzi, 2001). Uma possível solução para o tratamento de efluentes ácidos é a utilização de $Ca(OH)_2$ que eleva o valor de pH (Mulidzi, 2001; Lucas e Peres, 2011). Assim, para o ensaio de rega de petúnias, incluiu-se o tratamento EVT através da adição de $Ca(OH)_2$ para que o pH apresentasse um valor legalmente permitido (6,20). A salinidade está associada à presença de sais dissolvidos no efluente, designadamente de sódio que em concentrações elevadas pode ser fitotóxico para as plantas (Marinho *et al*., 2013) o que não será problemático, neste caso, devido à reduzida concentração em sódio total que o efluente apresenta (1,74 mg L^{-1}). A presença de nutrientes (como o potássio) e matéria orgânica nos EVs podem estimular o crescimento das plantas (Cordeiro, 2012) como revelam os valores elevados de CQO (1220 mg O_2 L^{-1}).

Quadro 1 - Caraterização físico-química do efluente vinícola tratado

Parâmetro	Valor
pH (Escala Sörensen)	4,14
Condutividade (μS cm^{-1} (a 20°C))	235
Carência Química de Oxigénio (CQO) (mg O_2 L^{-1})	1220
Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO_5) (mg O_2 L^{-1})	730
Carbono Orgânico Total (COT) (mg C L^{-1})	332
Sólidos **Suspensos Totais** (mg L^{-1})	10
Polifenóis totais (mg ácido gálico L^{-1})	12,2
Nitratos (NO_3^-) (mg L^{-1})	n.d.
Fosfatos (PO_4^{3-}) (mg L^{-1})	2,5
Sulfatos (SO_4^{2-}) (mg L^{-1})	18,1
Ferro total (Fe) (mg L^{-1})	0,44
Alumínio (Al^{3+}) (μg L^{-1})	17
Cádmio total (Cd) (μg L^{-1})	2
Cobre total (Cu) (μg L^{-1})	358
Crómio total (Cr) (μg L^{-1})	0,03
Manganês total (Mn) (μg L^{-1})	28
Zinco (Zn) (μg L^{-1})	3737
Potássio (K) (μg L^{-1})	6670
Sódio total (Na) (μg L^{-1})	1740
Magnésio total (Mg) (μg L^{-1})	610
Cálcio total (Ca) (μg L^{-1})	150
SAR – relação de adsorção de sódio	0,63

Testes de Fitotoxicidade

As sementes de *L. sativum* responderam de forma distinta às concentrações de EV (Figura 1). Com a análise do Quadro 2 as percentagens de RRG e RSG não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, pelo contrário as percentagens do IG revelaram diferenças muito significativas entre os tratamentos (P = 0,008). As sementes expostas às concentrações 20 e 60 % de efluente

revelam maior IG em relação às restantes concentrações. Segundo a classificação apresentada por Varnero *et al*. (2007) nas concentrações 20, 40, 60 e 80% o IG foi ≥ a 80 %, ou seja, não existiam substâncias fitotóxicas no efluente ou estavam presentes em concentrações muito reduzidas que não prejudicavam a germinação das sementes. Na concentração de 100 % o IG estava entre 50 a 80 %, pelo que se considerou que estavam presentes substâncias moderadamente fitotóxicas no efluente que prejudicaram a germinação e o desenvolvimento das sementes desta espécie.

Quadro 2 - Teste de Fitotoxicidade em *Lepidium sativum*. Valores médios ± erro padrão da Percentagem Relativa Média de germinação (RSG), Percentagem Relativa do Comprimento das Raízes (RRG) e Índice de Germinação (IG) para cada concentração de efluente

Efluente vinícola	RSG	RRG	IG
(%)	(%)	(%)	(%)
20	98 ± 3	110 ± 4	108 ± 7^{b}
40	94 ± 7	104 ± 6	98 ± 11^{ab}
60	102 ± 4	112 ± 2	114 ± 4^{b}
80	96 ± 6	108 ± 7	101 ± 4^{ab}
100	85 ± 6	93 ± 9	77 ± 4^{a}
Valor de P	0,320	0,252	0,008

*Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes de acordo com o teste múltiplo de Tukey, a 5% de probabilidade.

No caso da mistura de relva (Figura 2), verificou-se que todas as concentrações de efluente promoveram a germinação de sementes, bem como o desenvolvimento das raízes, isto é, não existiram diferenças significativas entre as concentrações referentes aos parâmetros analisados, RSG, RRG e IG (Quadro 3). Obtiveram-se valores de IG entre 80 e 100 %, o que revela, também segundo a classificação de Varnero *et al*. (2007), que não existiam substâncias fitotóxicas no efluente ou podiam existir em concentrações muito baixas, mas que não influenciaram negativamente a germinação e o desenvolvimento das sementes da mistura de relva.

Quadro 3 - Teste de Fitotoxicidade em uma mistura de relva. Valores médios ± erro padrão da Percentagem Relativa Média de germinação (RSG), Percentagem Relativa do Comprimento das Raízes (RRG) e Índice de Germinação (IG) para cada concentração de efluente

Efluente vinícola	RSG	RRG	IG
(%)	(%)	(%)	(%)
20	93 ± 6	100 ± 8	94 ± 13
40	90 ± 5	124 ± 4	112 ± 7
60	98 ± 11	123 ± 24	130 ± 37
80	90 ± 13	117 ± 29	113 ± 41
100	81 ± 8	128 ± 17	106 ± 21
Valor de P	0,766	0,846	0,916

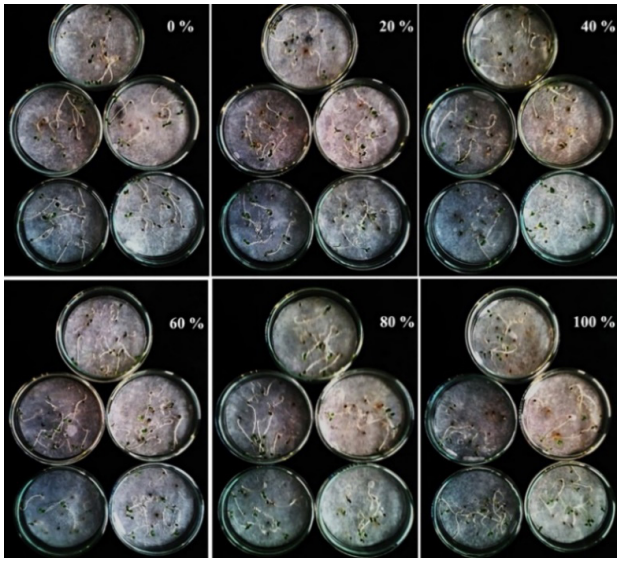


Figura 1 - Teste de fitotoxicidade em *Lepidium sativum* no final do ensaio, a cada imagem corresponde a percentagem respetiva de efluente vinícola presente na solução (0, 20, 40, 60, 80 e 100 %).

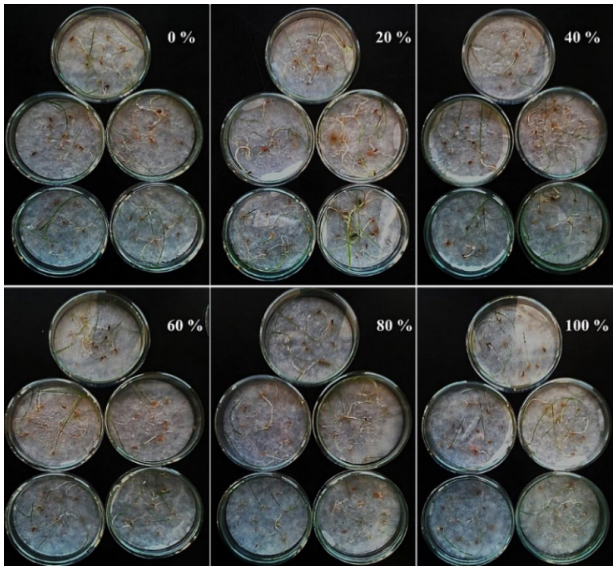


Figura 2 - Teste de fitotoxicidade em mistura de relva no final do ensaio, a cada imagem corresponde a percentagem respetiva de efluente vinícola presente na solução (0, 20, 40, 60, 80 e 100 %).

Análise de crescimento

Foram observados efeitos significativos nas plantas de *Petunia* x *atkinsiana* dos distintos tratamentos, em particular nos tratamentos EV0% e EV100%. Efetivamente, pela análise da Figura 3 e dos Quadro 4 e 5 foi possível constatar que, relativamente ao Comprimento e Área Radicular (Quadro 4), Número de Folhas e Área Foliar (Quadro 5), existiam diferenças muito significativas, sendo que as plantas do tratamento EV0% foram as que apresentam os valores mais elevados. A análise do sistema radicular é complexa. Pode ser influenciada pela variabilidade das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, do efluente e das práticas culturais, que podem alterar as caraterísticas dimensionais da raiz (Santos *et al*., 2017; Zolti *et al*., 2019). Além disso, as águas residuais podem proporcionar maior crescimento radicular devido à presença de nutrientes, mas, também podem causar problemas de toxicidade e, por isso, limitar o crescimento da raiz (Rocha *et al*., 2014).

Tendo em conta as caraterísticas visuais mais relevantes da planta é fundamental referir que o Número de Folhas e a Área Foliar (Quadro 5) diminuíram com a presença dos tratamentos EV60%, EV100% e EVT mas o Número de Flores manteve-se semelhante entre todos tratamentos.

Segundo Popescu e Popescu (2015) a capacidade de floração das petúnias pode ser influenciada pelas caraterísticas do meio de cultivo, pelas técnicas culturais e de melhoramento. No entanto, como verificamos neste estudo, não existiram diferenças significativas no Número de Flores (Quadro 4) o que comprovou que todos os tratamentos proporcionaram um bom desenvolvimento floral, o que é uma das caraterísticas mais importantes desta espécie ornamental (Bañón *et al*., 2011).

Os resultados revelaram ainda diferenças muito significativas ao nível do peso seco aéreo e significativas ao nível do peso seco radicular (Quadro 5). Estes resultados confirmaram que tal como no estudo de Peixoto *et al*. (2011), quanto menor a área

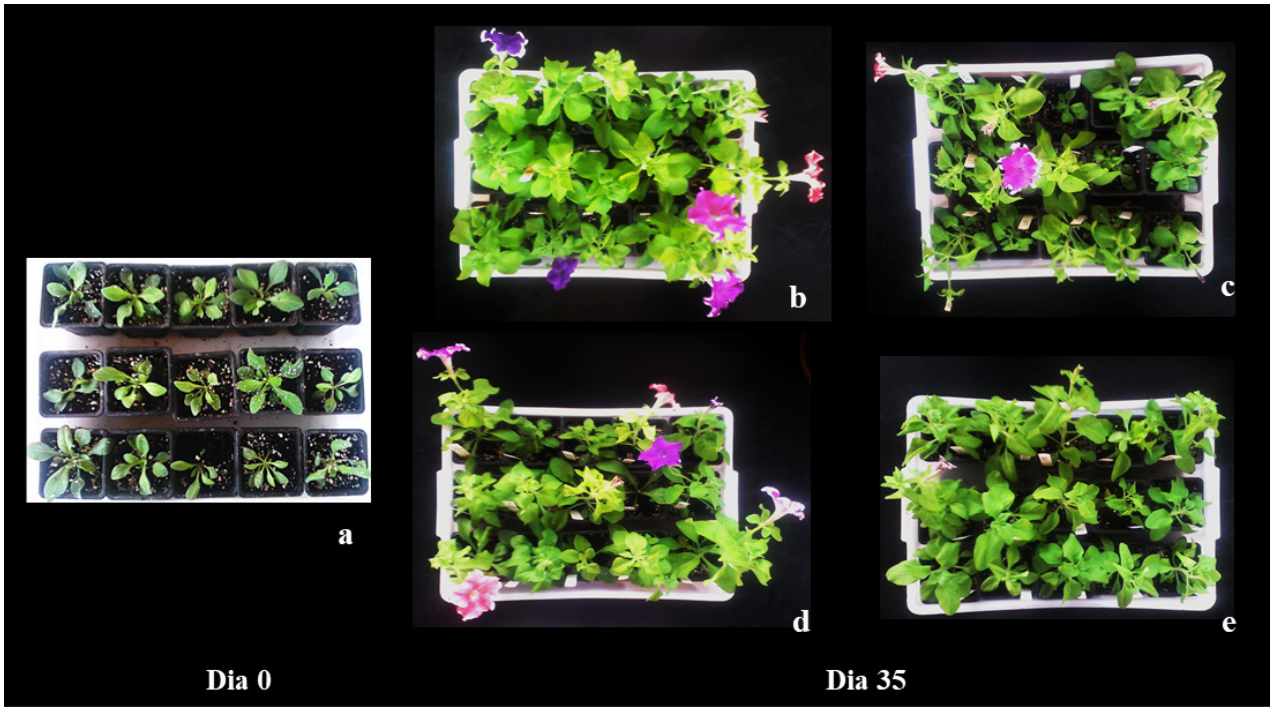


Figura 3 - Plantas de *Petunia* x *atkinsiana* no início do ensaio (dia 0; a) e no final do ensaio (dia 35) nos 4 tratamentos: b – controlo (EV0%), c – efluente diluído (EV60%), d – efluente sem diluição (EV100%), e – efluente com correção de pH (EVT).

Quadro 4 - Parâmetros estruturais médios (raiz, caule e flor) das plantas de *Petunia* x *atkinsiana* dos respetivos tratamentos (controlo (EV0%), efluente diluído (EV60%), efluente sem diluição (EV100%), efluente com correção de pH (EVT). Valor médio ± erro padrão do Comprimento e Área Radicular e do Número de Flores

Tratamento	Comprimento Radicular (mm)	Área Radicular (cm^2)	Número de Flores
EV0%	105 ± 11^{b}	216 ± 18^{b}	3 ± 1
EV 60%	55 ± 8^{a}	134 ± 13^{a}	2 ± 0
EV 100%	82 ± 16^{ab}	155 ± 17^{a}	3 ± 0
EVT	40 ± 8^{a}	118 ± 13^{a}	2 ± 0
Valor de *P*	0,003	0,001	0,250

*Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes de acordo com o teste múltiplo de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quadro 5 - Parâmetros estruturais médios (folha) das plantas de *Petunia* x *atkinsiana* dos respetivos tratamentos (controlo (EV0%), efluente diluído (EV60%), efluente sem diluição (EV100%), efluente com correção de pH (EVT). Valor médio ± erro padrão do Número de Folhas, Área Foliar, Peso Seco Radicular e Aéreo

Tratamento	Número de Folhas	Área Foliar (cm^2)	Peso Seco Radicular (mg)	Peso Seco Aéreo (mg)
EV0%	23 ± 3^{b}	$212 \pm 17b$	25 ± 2^{c}	527 ± 48^{c}
EV 60%	15 ± 1^{a}	153 ± 10^{a}	16 ± 2^{ab}	316 ± 31^{ab}
EV 100%	15 ± 2^{a}	152 ± 17^{a}	24 ± 3^{bc}	474 ± 64^{bc}
EVT	13 ± 2^{a}	116 ± 13^{a}	13 ± 1^{a}	265 ± 23^{a}
Valor de *P*	0,003	0,001	0,003	0,001

*Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são significativamente diferentes de acordo com o teste múltiplo de Tukey, a 5% de probabilidade

foliar menor será o peso seco da parte aérea, ou seja, a produtividade da planta é reduzida com a diminuição da área foliar, ao contrário do que aconteceu no estudo de Lubello *et al*. (2004) onde não ocorreram alterações na área e peso foliar das plantas regadas com efluente.

Anatomia foliar

Através deste procedimento é possível relacionar a estrutura da folha de *P.* x *atkinsiana* com as condições de crescimento (Retamales e Scharaschkin, 2015). De uma forma geral, todas as folhas revelaram-se pouco espessas e frágeis, tal como observado nas imagens dos cortes histológicos (Figura 4). Ao nível do limbo distinguem-se apenas as epidermes adaxial e abaxial e ao centro o parênquima clorofilino e nervuras secundárias. Relativamente à espessura total da lâmina foliar verificou-se que as folhas das plantas regadas com EV60%, EV100% e EVT eram significativamente mais espessas que as do EV0% (Quadro 6). A espessura foliar desempenha um papel importante no funcionamento das plantas uma vez que está relacionada com o uso dos recursos que a planta consome (Vile *et al*., 2005). Para além disso, as folhas mais espessas (EV60%, EV100% e EVT) estão melhor adaptadas a condições de seca, intensidades de luz elevadas e baixas temperaturas (White e Montes-R, 2005).

Constataram-se também diferenças significativas nas dimensões da Nervura Principal (diâmetro transversal e longitudinal) apenas entre as folhas dos tratamentos EV100% e EVT, sendo esses valores superiores para o EV100% (Quadro 6). Relativamente à Espessura da Nervura Central, verificou-se que o tratamento que apresentou maior espessura foi o EV100%, sendo a diferença muito significativa (P = 0,006). Este facto pode estar associado a uma melhor condução de nutrientes e água pelos vasos condutores, devido ao maior número e/ou tamanho dos vasos do xilema e floema (Tabassum *et al*., 2016). Também,

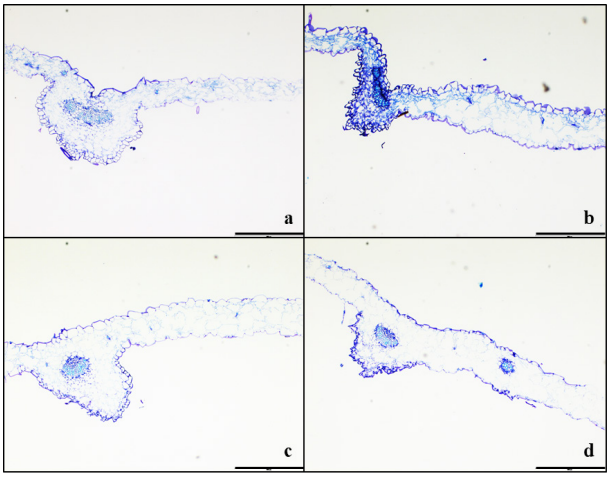


Figura 4 - Cortes transversais das folhas de *Petunia* x *atkinsiana* dos 4 tratamentos: a - controlo (EV0%); b - efluente diluído (EV60%); c - efluente sem diluição (EV100%); d - efluente com correção de pH (EVT) (Escala - 500 µm).

Quadro 6 - Valor médio ± erro padrão dos parâmetros da anatomia foliar da espécie *Petunia* x *atkinsiana*: Espessura da Lâmina Foliar, Tecido Vascular da Nervura Central (diâmetro transversal e longitudinal) e Espessura da Nervura Central, dos distintos tratamentos (controlo (EV0%), efluente diluído (EV60%), efluente sem diluição (EV100%), efluente com correção de pH (EVT)

Tratamento	Espessura da Lâmina Foliar	Tecido Vascular		Espessura da Nervura Central
		Diâmetro Transversal	Diâmetro Longitudinal	
	(μm)	(μm)	(μm)	(μm)
EV0%	150 ± 12^{a}	120 ± 5,4^{ab}	148 ± 22^{ab}	351 ± 61^{a}
EV60%	281 ± 28^{b}	119 ± 16^{ab}	122 ± 24^{ab}	375 ± 20^{a}
EV100%	233 ± 7^{b}	143 ± 11^{b}	197 ± 10^{b}	584 ± 67^{b}
EVT	244 ± 11^{b}	95 ± 4^{a}	99 ± 11^{a}	311 ± 10^{a}
Valor de P	0,001	0,048	0,013	0,006

uma espessura maior dos tecidos fotossintéticos permite maximizar a captura de energia (Givnish, 1988), sendo possível que as plantas regadas com o tratamento EV100% relevem maior taxa fotossintética, bem como uma melhor adaptação a condições de stresse.

Análises bioquímicas

Pela análise dos resultados do teor de pigmentos fotossintéticos em *P.* x *atkinsiana* verificou-se que não existiam diferenças significativas nas concentrações de clorofilas e carotenoides nas folhas, bem como na razão entre o teor de Cl_a e Cl_b (que se encontra dentro da normalidade visto que o teor de Cl_a é 2 a 4 vezes maior que o da Cl_b) (Młodzińska, 2009) e na razão entre Clorofila total/Carotenoides. A capacidade fotossintética indica que a atividade fisiológica das plantas e o seu potencial de desenvolvimento vegetativo foi garantido em todos os tratamentos o que significa que o efluente não afetou o metabolismo celular de todas as plantas (Cantor *et al*., 2015; Chandanshive *et al*., 2018).

Verificou-se que não existiam diferenças significativas na concentração de compostos fenólicos ao nível foliar (Quadro 6). Segundo Pennycooke *et al*. (2005) este resultado indica que as plantas regadas com EVs não aparentavam sintomas de stresse.

As antocianinas estão associadas à cor da flor que é uma das características mais importantes nas plantas ornamentais. Segundo Griesbach *et al*. (1999), a presença de antocianinas como a cianidina-3-*O*-glicosido e a cianidina-3-*O*-rutinosido podem interferir com a cor da flor da petúnia. Estudos realizados com petúnias comprovam que por vezes a base bioquímica das diferenças na cor revela-se devido ao efeito do pH (Griesbach *et al*., 1999; Zhao *et al*., 2016). Pela análise da concentração de antocianinas totais nas flores, constatou-se que não existiam diferenças significativas e que os valores de pH dos diferentes tratamentos não afetaram a cor da flor.

CONCLUSÕES

Os testes de fitotoxicidade permitiram deduzir que o EV foi moderadamente fitotóxico para a germinação de *L. sativum* (Índice de Germinação de 76,7 %), uma espécie altamente sensível, mas que, pelo contrário, promoveu a germinação e o crescimento das sementes da mistura de relva (Índice de Germinação de 105,81 %). Os resultados podem variar segundo a sensibilidade da espécie e, por isso, será importante, no futuro, complementar estes testes com outras espécies e outros EVs com caraterísticas substancialmente diferentes do EV estudado. Em relação aos parâmetros de anatomia foliar as folhas regadas com EV100% apresentaram maior espessura foliar e dos tecidos vasculares, o que poderá assegurar maior longevidade e resistência a fatores de stresse. Por outro lado, as caraterísticas visualmente atraentes das petúnias foram preservadas em todos os tratamentos, bem como o número e as cores vistosas das flores. Em geral, obtiveram-se resultados que suportam os tratamentos EV0% e EV100%, que os permitem destacar positivamente no crescimento das plantas em relação aos tratamentos EV60% e EV T. Os resultados fisiológicos e morfo-anatómicos das plantas dos tratamentos podem ter sido distintos devido às diferentes concentrações de matéria orgânica (MO) nas soluções. A presença significativa de MO nos efluentes favorece o crescimento das plantas (EV100%) (Lubello *et al*., 2004; Marinho *et al*., 2013). No caso do EVT com a utilização de $Ca(OH)_2$ o pH aumentou passando a estar dentro dos limites legais (Arienzo *et al*., 2009). Os parâmetros polifenóis totais e salinidade apresentaram-se igualmente em conformidade com o Decreto-Lei nº 236/98 em todos os tratamentos.

Deve ter-se em conta que, de uma forma geral, a reutilização dos efluentes deve ser bem gerida para não causar danos nas plantas e no ambiente (Marinho *et al*., 2013).

A reutilização do EV tratado para rega de petúnias parece uma opção sustentável, mas deverá ser complementada com outros estudos prolongando o período de ensaio porque a utilização destes efluentes para rega por longos períodos de tempo pode implicar problemas de salinidade. Sugere-se também a realização de futuros ensaios com outras espécies vegetais aprofundando alguns aspetos como, por exemplo, o impacto da rega com EVs na morfologia do sistema radicular, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila *a*. Relativamente a ensaios a desenvolver no contexto da viticultura moderna é fundamental que se apliquem procedimentos para determinar o tratamento mais eficiente para as caraterísticas do efluente. É também prioritário que se desenvolvam sistemas de gestão para avaliar a eficiência do processo face às necessidades hídricas, bem como o acompanhamento das empresas que estejam dispostas a implementar novas metodologias e estudos de análise ao impacte dos efluentes no desenvolvimento das plantas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é financiado por Fundos Europeus de Investimento através do FEDER/COMPETE/POCI – Programa de Competitividade e Internacionalização, no âmbito do projeto POCI-01-0145-FEDER-006958 e Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto UID/AGR/04033/2013" e pelo projeto INNOVINE&WINE – *Platform of Innovation of the Vine and Wine*, nº NORTE-01-0145-FEDER-000038.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Aal, E.S.M. & Hucl, P. (1999) – A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, vol. 76, n. 3, p. 350-354. https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350

APHA [American Public Health Association] (2005) – *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21ª edição. Washington DC, American Water Works Association, 1368 p.

Arienzo, M.; Christen, E.W. & Quayle, W.C. (2009) – Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 169, n. 1-3, p. 94-99. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.069

Arnon, D. I. (1949) – Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiology*, vol. 24, p. 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

Bañón, S.; Miralles, J.; Ochoa, J.; Franco, J.A. & Sánchez-Blanco, M.J. (2011) – Effects of diluted and undiluted treated wastewater on the growth, physiological aspects and visual quality of potted lantana and polygala plants. *Scientia Horticulturae*, vol. 129, n. 4, p. 869-876. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.027

Berlyn, G. & Miksche, J. (1976) – *Botanical microtechnique and cytochemistry*, 1ª edição, Iowa State University Press 326 p.

Bragança, I.; Lemos, P.C.; Barros, P.; Delerue-Matos, C. & Domingues, V.F. (2018) – Phytotoxicity of pyrethroid pesticides and its metabolite towards *Cucumis sativus*. *Science of The Total Environment*, vol. 619-620, p. 685-691. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.164

Cantor, M.; Krizbai, E. & Buta, E. (2015) – The behavior of some petunia varieties for improvement the romanian assortment. *Bulletin UASVM Horticulture*, vol. 72, n. 1, p. 1-44. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:10664

Chandanshive, V.V.; Kadam, S.K.; Khandare, R.V.; Kurade, M.B.; Jeon, B.H.; Jadhav, J.P. & Govindwar, S.P. (2018) – In situ phytoremediation of dyes from textilewastewater using garden ornamental plants, effect on soil quality and plant growth. *Chemosphere*, vol. 210, p. 968-976. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.064

Cordeiro, D. (2012) – *Estudo da reutilização de uma água residual tratada na rega paisagística*. Dissertação de Mestre em Engenharia do Ambiente. Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 88 p.

Costa, J.M.; Vilanova, P.; Silvestre, R. & Ferreira, M.E. (2014) – Propagação e produção de flores e plantas ornamentais em Portugal : situação e estratégias para a competitividade. *Actas de Horticultura*, vol. 68, p. 9-14.

Dellaferrera, I.; Panigo, E.; Gonzalez-Torralba, F.; De Prado, R.; Christoffoleti, P. & Perreta, M. (2015) – Características estructurales y fisiológicas de *Petunia axillaris* relacionadas con su baja sensibilidad a glifosfato. *Planta Daninha*, vol. 33, n. 3, p. 451-462. https://doi.org/10.1590/S0100-83582015000300008

Givnish, T. J. (1988) – Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Australian Journal of Plant Physiology*, vol. 15, n. 2, p. 63-92. https://doi.org/10.1071/PP9880063

Griesbach, R.J.; Stehmann, J.R. & Meyer, F. (1999) – Anthocyanins in the "red" flowers of *Petunia exserta*. *Phytochemistry*, vol. 51, n. 4, p. 525-528. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00026-6

Gvozdenac, S.; Inđić, D.; Vuković, S.; Bursić, V. & Tričkovi, J. (2014) – Assessment of environmental pollution of water from irrigation canal (Aleksandrovacki canal, Serbia) using phyto-indicators. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, vol. 24, n. 2, p. 614-619.

Hirzel, D.R.; Steenwerth, K.; Parikh, S.J. & Oberholster, A. (2017) – Impact of winery wastewater irrigation on soil, grape and wine composition. *Agricultural Water Management*, vol. 180, part A, p. 178-189. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.10.019

Hoekstra, N.J.; Bosker, T. & Lantinga, E.A. (2002) – Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 93, n. 1-3, p. 189-196. https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00348-6

Isern, D.; Abelló, S. & Moreno, A. (2012) – Development of a multi-agent system simulation platform for irrigation scheduling with case studies for garden irrigation. *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 87, p. 1-13. https://doi.org/10.1016/j.compag.2012.04.007

IVV (2018) – *Evolução da Produção Nacional de Vinho por Região Vitivinícola. Instituito da Vinha e do Vinho*, Instituto da Vinha e do Vinho, Portugal. [cit.25/10/2018.]. http://www.ivv.gov.pt/np4/36/

Johansen, D. A. (1940) – *Plant Microtechnique.* New York, McGraw-Hill Book Company Inc, 523p.

Kumar, A.; Correll, R. & Kookana, R. (2008) – Winery wastewater workshops translate research into practice. *Wine Industry Journal*, vol. 23, n. 6, p. 60-63.

Lichtenthaler, H.K. (1987) – Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, vol. 148, p. 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Lubello, C.; Gori, R.; Nicese, F.P. & Ferrini, F. (2004) – Municipal-treated wastewater reuse for plant nurseries irrigation. *Water Research*, vol. 38, n. 12, p. 2939-2947. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.037

Lucas, M.S. & Peres, J.A. (2011) – Processos de tratamento de efluentes vinícolas: breve perspetiva. *Química*, vol. 122, p. 41-47.

Macías, M.A.; Martínez, A.C.; Mounir, S.; Gaitán, G. M. & Allaf, K. (2013) – Comparative study of the effects of drying methods on antioxidant activity of dried strawberry (*Fragaria Var. Camarosa*). *Journal of Food Research*, vol. 2, n. 2, p. 92-107. https://doi.org/10.5539/jfr.v2n2p92

MacKinney, G. (1941) – Absorption of light by chlorophyll solutions. *The Journal of Biological Chemistry*, vol 140, p. 315-322.

Marinho, L.; Tonetti, A.; Stefanutti, R. & Filho, B. (2013) – Application of reclaimed wastewater in the irrigation of rosebushes. *Water, Air & Soil Pollution*, vol. 224, art. 1167. https://doi.org/10.1007/s11270-013-1669-z

Młodzińska, E. (2009) – Survey of plant pigments: molecular and environmental determinants of plant colors. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, vol. 51, n. 1, p. 7-16.

Mulidzi, A. (2001) – *Environmental impact of winery efluent in the western and northern cape provinces.* Magister Institutionis Agriculturae in Land Use Planning. Department of Plant Production and Soil Science. 128 p.

O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. (1964) – Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma*, vol. 59, n. 2, p. 368-373. https://doi.org/10.1007/BF01248568

OIV (2018) – *State of the vitiviniculture world market.* International Organisation of Vine and Wine, Paris. [cit.15/10/2018.]. http://www.oiv.int/public/medias/5958/oiv-state-of-the-vitiviniculture-world-market-april-2018.pdf

Peixoto, C.; Cruz, T. & Peixoto, M. (2011) – Análise quantitativa do crescimento de plantas: conceitos e práticas. *Enciclopédia Biosfera*,vol. 7, n. 13, p. 51-76.

Pennycooke, J.C.; Cox, S. & Stushnoff, C. (2005) – Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, vol. 53, n. 2, p. 225-232. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.04.002

Pirra, A. (2005) – *Caracterização e tratamento de efluentes vinícolas da região demarcada do Douro*.Tese de Doutoramento. Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. 296 p.

Pirra, A.J.D. (2009) – Distribuição de lamas e efluentes vinícolas no solo: uma alternativa eco-eficiente para o seu tratamento. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 32, n. 2, p. 67-84. https://doi.org/10.19084/rca.15724

Popescu, G. C. & Popescu, M. (2015) – Effects of different potting growing media for *Petunia grandiflora* and *Nicotiana alata* Link & Otto on photosynthetic capacity, leaf area, and flowering potential. *Chilean Journal of Agricultural Research,* vol. 75, n. 1, p. 21-26. https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000100003

Qi, Y.; Liu, D.; Zhao, W.; Liu, C.; Zhou, Z. & Wang, P. (2015) – Enantioselective phytotoxicity and bioacitivity of the enantiomers of the herbicide napropamide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 125, p. 38-44. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.06.004

Retamales, H.A. & Scharaschkin, T. (2015) – Comparative leaf anatomy and micromorphology of the Chilean Myrtaceae: Taxonomic and ecological implications. *Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, vol. 217, p. 138-154. https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.10.005

Rocha, S.A.; Garcia, G.O.; Lougon, M.S.; Cecílio, R.A. & Caldeira, M.V.W. (2014) – Crescimento e nutrição foliar de mudas de *Eucalyptus* sp. irrigadas com diferentes qualidades de água. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 37, n. 2, p. 141-151. https://doi.org/10.19084/rca.16808

Santos, L.N.S.D.; Barbosa, E.A.A.; Nazário, A.A.; Gonçalves, I.Z.; Ohashi, A.Y.P.; Matsura, E.E. & Pires, R.C.D.M. (2017) – Root growth of sugarcane irrigated with wastewater through subsurface drip system. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, vol. 19, n. 1, p. 16-25.

Sesták, Z.; Castky, J. & Jarvis, P.G. (1971) – *Plant photosynthetic production: Manual of methods.* Praga, República Checa, Ceskoslovenská Akademie Ved, 818 p.

Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965) – Colorometry of total phenolics with phosphomolybdicpohosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, n. 3, p. 144-158. https://doi.org/10.12691/jfnr-3-7-5

Tabassum, M.A.; Zhu, G.; Hafeez, A.; Wahid, M.A.; Shaban, M. & Li, Y (2016) – Influence of leaf vein density and thickness on hydraulic conductance and photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) during water stress. *Scientific Reports*, vol. 6, art. 36894. https://doi.org/10.1038/srep36894

Tiquia, S.M. & Tam, N.F.Y. (1998) – Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig-manure sawdust litter and pig sludge. *Bioresource Technology*, vol. 65, n. 1-2, p. 43-49. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00024-8

Vandenbussche, M.; Chambrier, P.; Rodrigues Bento, S. & Morel, P. (2016) – Petunia, your next supermodel? *Frontiers in Plant Science*, vol. 7, art. 0072. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00072

Varnero, M.T.M.; Rojas, C.A. & Orellana, R.R. (2007) – Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, vol. 7, n. 1, p. 28-37. https://doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003

Vile, D.; Garnier, É.; Shipley, B.; Laurent, G.; Navas, M.L.; Roumet, C.; Lavorel, S.; Díaz, S.; Hodgson, J.G.; Lloret, F.; Midgley, G.F.; Poorter, H.; Rutherford, M.C.; Wilson, P.J. & Wright, I.J. (2005) – Specific leaf area and dry matter content estimate thicknessin laminar leaves. *Annals of Botany*, vol. 96, n. 6, p. 1129-1136. https://doi.org/10.1093/aob/mci264

Weiss, D.; Schonfeld, M. & Halevy, A.H. (1988) – Photosynthetic activities in the *Petunia corolla*. *Plant Physiology*, vol. 87, n. 3, p. 666-670. https://doi.org/10.1104/pp.87.3.666

Welz, P.J.; Holtman, G.; Haldenwang, R. & Roes-Hill, M.L. (2016) – Characterisation of winery wastewater from continuous flow settling basins and waste stabilisation ponds over the course of 1 year: implications for biological wastewater treatment and land application. *Water Science & Technology*, vol. 74, n. 9, p. 2036-2050. https://doi.org/10.2166/wst.2016.226

White, J.W. & Montes-R, C. (2005) – Variation in parameters related to leaf thickness in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, vol. 91, n. 1, p. 7-21. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.001

WRW&S (2016) – *Detalle de País Informe 2016.* World Ranking Wines& Spirit (WRW&S®), Reino Unido. [cit.25/10/2018.]. http://www.wawwj.com/2017/_SP/pais_body.php

Zhao, D.Q.; Wei, M.R.; Liu, D. & Tao, J. (2016) – Anatomical and biochemical analysis reveal the role of anthocyanins in flower coloration of herbaceous peony. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 102, p. 97-106. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.023

Zolti, A.; Green, S.J.; Ben Mordechay, E.; Hadar, Y.; & Minz, D. (2019) – Root microbiome response to treated wastewater irrigation. *Science of the Total Environment*, vol. 655, p. 899-907. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.251