



**FEUP** FACULDADE DE ENGENHARIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

**MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2016/2017**

**CRESCIMENTO DE MICROALGAS E REMOÇÃO DE  
NUTRIENTES EM AMBIENTES POLUÍDOS COM METAIS  
PESADOS**

**FRANCISCA MARIA LOUREIRO FERREIRA DOS SANTOS**

Dissertação submetida para obtenção do grau de  
**MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE**

**Presidente do Júri:** António Manuel Antunes Fiuza  
Professor Catedrático do Departamento de Engenharia de Minas da Faculdade  
de Engenharia da Universidade do Porto

---

**Orientador académico:** Doutor José Carlos Magalhães Pires  
Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da  
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Co-Orientador:** Doutor Vítor Jorge Pais Vilar  
Investigador Principal do Departamento de Engenharia Química da  
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

**Co-Orientador:** Mestre Luciana Prazeres Mazur  
Estudante de Doutoramento do Departamento de Engenharia do Ambiente da  
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

*Porto, julho de 2017*



# Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao Professor José Carlos Pires, para mim foi uma honra tê-lo como orientador. Muito obrigada pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob a sua orientação, pelo apoio constante e o tempo que generosamente me dedicou, pela sua crítica, sempre construtiva e análise rigorosa ao longo de todo o trabalho.

Agradeço ao Professor Vítor Vilar, co-orientador desta dissertação, por disponibilizar todos os recursos necessários à realização da mesma e por todo o conhecimento partilhado durante o meu percurso académico.

Em especial, muito obrigada à Luciana Mazur, co-orientadora desta dissertação, por todo o carinho e paciência ao longo deste período. O meu sincero obrigado a toda a equipa do laboratório E404 e da ETAR pelos momentos animados e por todo o apoio dado nas diferentes fases do trabalho.

Agradeço à minha família por nunca deixarem de acreditar em mim e porque sem eles não conseguia finalizar este curso.

Agradeço em especial à família que sempre me apoiou incondicionalmente e me proporcionou os melhores momentos destes cinco anos: os meus amigos.

## Agradecimentos Institucionais

Este trabalho desenvolvido foi no âmbito do projeto:

- (i) POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.
- (ii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 – LEPABE-2-ECO-INNOVATION, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).
- (iii) Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.



## Resumo

A superfície do planeta Terra é coberta maioritariamente por água. No entanto, apenas uma pequena fração desta é apropriada para consumo humano. Para além desta já ser reduzida, o crescimento populacional e o desenvolvimento industrial têm vindo a diminuir a disponibilidade deste recurso, através da poluição dos meios hídricos. Efluentes não tratados ou parcialmente tratados de diferentes origens têm sido descarregados em lagos e rios, contribuindo para a sua contaminação. Estes efluentes podem conter elevadas quantidades de matéria orgânica, nutrientes (azoto e fósforo) e substâncias tóxicas (pesticidas, fertilizantes ou metais pesados). O tratamento de efluentes com metais pesados é efetuado com recurso a técnicas físico-químicas, sendo algumas dispendiosas e outras ineficazes. A biorremediação com microalgas surge como alternativa de baixo custo no tratamento destes efluentes, sendo importante analisar o efeito da presença de metais pesados no crescimento das mesmas. Deste modo, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar o efeito de metais pesados no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, tendo em atenção a remoção de nutrientes e produção de biomassa. Os impactos individuais de níquel (Ni), cádmio (Cd) e zinco (Zn) e o impacto combinado (Ni + Cd + Zn) foram aferidos para concentrações entre 1 e 3 mg·L<sup>-1</sup>.

Na ausência de metais verificou-se uma taxa específica de crescimento máxima de 0,934 d<sup>-1</sup> e na presença de metais, o valor máximo obtido foi de 0,34 d<sup>-1</sup> na cultura com Cd (1 mg·L<sup>-1</sup>) e na cultura com Zn (1 mg·L<sup>-1</sup>). A percentagem de inibição mais elevada foi verificada para as culturas com Ni, para uma concentração de 1 mg·L<sup>-1</sup> (> 88%). A produtividade de biomassa máxima de 98,1 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> foi obtida na cultura com Cd (1 mg·L<sup>-1</sup>), onde se obteve as melhores eficiências de remoção de azoto (90,6%) e fósforo (98,7%). Em relação à remoção de metais, a melhor eficiência foi obtida nas culturas com Zn (1 mg·L<sup>-1</sup>), com valor de 85,4%. As isotérmicas de Langmuir e Freundlich foram usadas para descrever os dados de equilíbrio. As cinéticas de sorção foram descritas por um modelo cinético de pseudo-primeira ordem. Em suma, este trabalho apresenta resultados relevantes para a integração do cultivo de microalgas no tratamento de efluentes contendo metais pesados, tendo como objetivo a produção de biomassa e remoção combinada de metais, azoto e fósforo. Esta integração de processos irá promover a sustentabilidade do tratamento de águas residuais de diferentes setores de atividade económica.

**Palavras-chave:** Biorremediação; *Chlorella vulgaris*; Integração de processos; Metais Pesados; Produção de biomassa; Remoção de nutrientes; Sustentabilidade.



## Abstract

The Earth surface is mainly covered by water. However, only a small fraction is suitable for human consumption. In addition, population growth and industrial development have diminished the availability of this resource through pollution of water resources. Untreated or partially treated effluents from different sources have been discharged into lakes and rivers, contributing to their contamination. These effluents may contain high amounts of organic matter, nutrients (nitrogen and phosphorus) and toxic substances (pesticides, fertilizers or heavy metals). The treatment of effluents with heavy metals is carried out using physicochemical techniques, which some of them are expensive and others are ineffective. Microalgae bioremediation appears as a low cost alternative in the treatment of these effluents, and it is important to analyze the effect of the presence of heavy metals in their growth. In this way, the main objective of this work is to evaluate the effect of heavy metals in the cultivation of the microalga *Chlorella vulgaris*, taking into account the nutrient removal and biomass production. The individual impacts of nickel (Ni), cadmium (Cd) and zinc (Zn) and the combined impact (Ni + Cd + Zn) were assessed at mass concentrations between 1 and 3 mg·L<sup>-1</sup>.

In the absence of metals, a specific maximum growth rate of 0,934 d<sup>-1</sup> was observed and in the presence of metals, the maximum value obtained was 0,34 d<sup>-1</sup> in the culture with Cd (1 mg·L<sup>-1</sup>) and in the culture with Zn (1 mg·L<sup>-1</sup>). The highest inhibition percentage was found for cultures with Ni for a concentration of 1 mg·L<sup>-1</sup> (> 88%). The maximum biomass productivity of 98.1 mg·L<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup> was obtained in culture with Cd (1 mg·L<sup>-1</sup>) and also the best removal efficiencies for nitrogen (90.6%) and phosphorus (98.7%). Regarding the metals removal, the best efficiency was obtained in cultures with Zn (1 mg·L<sup>-1</sup>), with a value of 85.4%. The Langmuir and Freundlich isotherms were used to describe the equilibrium data. The kinetics of sorption were described by using a pseudo-first order model. Briefly, this work presents relevant results for the integration of microalgae culture in the treatment of effluents containing heavy metals, aiming the production of biomass and combined removal of metals, nitrogen and phosphorus. This integration of processes will improve the sustainability of wastewater treatment of different sectors of economic activity.

**Keywords:** Bioremediation; *Chlorella vulgaris*; Process integration; Heavy metals; Biomass production; Nutrients removal; Sustainability.



# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	Relevância científica .....	1
1.2	Objetivos .....	2
1.3	Organização da dissertação.....	3
2.	Revisão da literatura .....	5
2.1	Microalgas .....	5
2.2	Modo de crescimento .....	5
2.3	Tecnologias de cultivo .....	9
2.3.1	Sistemas abertos .....	9
2.3.2	Sistemas fechados .....	10
2.3.1	Sistemas híbridos .....	13
2.4	Meio de cultura .....	13
2.4.1	Carbono .....	15
2.4.2	Azoto .....	15
2.4.3	Fósforo .....	16
2.4.4	Micronutrientes.....	16
2.5	Aplicações ambientais das microalgas .....	17
2.6	Tratamento de águas residuais reais .....	18
2.7	Cultura de microalgas em meios com metais pesados .....	21
3.	Materiais e métodos .....	25
3.1	Instalação experimental.....	25
3.2	Microalgas e meio de cultura .....	25
3.3	Métodos analíticos .....	26
3.4	Parâmetros e modelos cinéticos .....	27
4.	Resultados e Discussão .....	31
4.1	Temperatura e pH .....	31
4.2	Efeito isolados dos metais.....	32
4.2.1	Crescimento de biomassa .....	32
4.2.2	Remoção de metais e nutrientes .....	34
4.2.3	Modelos de equilíbrio e cinéticos de adsorção.....	35

4.3	Efeito combinado dos metais.....	42
4.3.1	Produção de biomassa .....	42
4.3.2	Remoção de nutrientes e metais .....	42
4.3.3	Cultivo semi-batch.....	44
5.	Conclusões.....	47
5.1	Considerações gerais.....	47
5.2	Recomendações de trabalhos futuros .....	48
	Referências bibliográficas .....	49
	Anexos.....	53
Anexo A-I.	Reta de calibração da biomassa .....	55
Anexo A-II.	Retas de calibração usadas no AAS .....	57
Anexo A-III.	Exemplo da propagação dos erros .....	59

# Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática de uma lagoa raceway (Chisti, 2007).....	10
Figura 2: Esquema da coluna de borbulamento (A) e do reator airlift (B) (Behin, 2012). .....	11
Figura 3: Representação esquemática de um fotobiorreator tubular horizontal com distribuição vertical (A) (Ugwu e Aoyagi, 2012) e horizontal (B) (López et al., 2006). .....	11
Figura 4: Representação esquemática de um reator inclinado (A) (Ugwu e Aoyagi, 2012) e helicoidal (B) (Mueller-Rees et al., 2013).....	12
Figura 5: Esquema de um reator em forma $\alpha$ (Carvalho et al., 2006). .....	12
Figura 6: Representação de um fotobiorreator de painel plano (Carvalho et al., 2006).....	13
<i>Figura 7: Representação esquemática de um reator do tipo fermentador (Carvalho et al., 2006).</i> .....	13
Figura 8: Esquema simplificado da assimilação do azoto inorgânico (Cai et al., 2013) .....	16
Figura 9: Valorização dos subprodutos da produção da biomassa (adaptado de Safi et al. (2014)). .....	18
Figura 10: Simbiose entre microalgas e bactérias (Gordon e Seckbach, 2012). .....	20
Figura 11: Instalação experimental usada para o crescimento das microalgas.....	25
Figura 12: Imagem de uma amostra recolhida antes (A) e após (B) centrifugação.....	27
Figura 13: Ajuste dos modelos de equilíbrio (Langmuir e Freundlich) aos pontos experimentais. .....	36
Figura 14: Variação temporal da concentração (no meio e adsorvida na biomassa) de Ni (A e B), de Cd (C e D) e Zn (E e F). .....	39
Figura 15: Variação temporal da concentração (no meio e adsorvida na biomassa) de Ni, de Cd e de Zn.....	43
Figura 16: Variação temporal da concentração dos metais em solução no ensaio V (Mistura - SB). .....	45
Figura A-I: Retas de calibração da concentração de biomassa.....	55

# Índice de Tabelas

Tabela 1: Fatores que influenciam a taxa de crescimento das microalgas (adaptado de Larsdotter (2006)).....	7
Tabela 2: Comparação das diferentes características das vias de crescimento (adaptado de Sharma et al. (2015); Ugwu e Aoyagi (2012)).....	14
Tabela 3: Remoção de nutrientes de efluentes reais com culturas de microalgas. ....	20
Tabela 4: Cultura de microalga em meios com metais pesados.....	22
Tabela 5: Valores de temperatura e pH registados nos ensaios.....	31
Tabela 6: Parâmetros de análise do crescimento das microalgas para os diferentes ensaios. ..	32
Tabela 7: Parâmetros referentes à remoção de metais, de azoto e de fósforo nos diferentes ensaios.....	35
Tabela 8: Comparação dos parâmetros de Langmuir e Freundlich para os diferentes ensaios. ....	35
Tabela 9: Parâmetros dos modelos cinéticos obtidos com o ajuste dos pontos experimentais	40
Tabela 10: Constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem para diferentes bioadsorventes. .	41
Tabela 11: Parâmetros de análise do crescimento das microalgas do ensaio IV.....	42
Tabela 12: Parâmetros referentes à remoção de azoto e de fósforo do ensaio de mistura. ....	43
Tabela 13: Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-primeira ordem e eficiências de remoção dos metais. ....	44
Tabela A-I: Curva de calibração usada no cálculo da concentração de biomassa. ....	55
Tabela A-II: Retas de calibração usadas para o cálculo da concentração das espécies de metal em cada ensaio.....	57

# Notação e Glossário

## Símbolos

C	Concentração do metal	mg·L <sup>-1</sup>
ER	Eficiência de remoção	%
P <sub>x</sub>	Produtividade em termos de biomassa	g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
q	Quantidade adsorvida do metal por quantidade de biomassa	mg·g <sup>-1</sup>
S	Concentração do nutriente	mg·L <sup>-1</sup>
TR	Taxa de remoção	mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>
T	Temperatura	°C
t	Tempo	h ou d
X	Concentração de biomassa	mg·L <sup>-1</sup>
Y <sub>x/s</sub>	Rendimento específico de biomassa (b) em termos do substrato (S)	g <sub>b</sub> ·g <sub>s</sub> <sup>-1</sup>

## Letras gregas

μ	Taxa específica de crescimento	d <sup>-1</sup>
σ	Desvio-padrão	

## Índices

f	Instante final
i	Instante i
0	Instante inicial
max	Máximo
med	Médio

## Lista de Siglas

AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CBO	Carência bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO <sub>440</sub>	Densidade ótica a 440 nm
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Espuma de poliuretano
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
KP	<i>Kappa-carrageenan</i>
PFN	Pó de folhas de Nim
PP	Polipropileno
PVC	Policloreto de vinil
RNA	Ácido ribonucleico
SS	Sólidos suspensos
WWAP	<i>United Nations World Water Assessment Programme</i>



# 1. Introdução

## 1.1 Relevância científica

A disponibilidade de água doce para consumo humano constitui um dos problemas mais preocupantes que a Humanidade enfrenta em relação aos recursos naturais. De acordo com o relatório “Water and Jobs”, elaborado pelo *United Nations World Water Assessment Programme* (WWAP) em 2015, cerca de 1,8 milhares de milhão de pessoas não tinham acesso a água potável (WWAP, 2016). O crescimento populacional e o desenvolvimento industrial estão associados a um aumento do consumo de água doce, elevando desta forma a pressão sobre este recurso natural. Para além do aumento da procura por água doce, a sua disponibilidade tem diminuído devido à poluição causada por atividades antropogénicas. Lagos e rios são recetores de inúmeros resíduos, incluindo efluentes municipais não tratados ou parcialmente tratados e efluentes de diferentes atividades do setor primário (agricultura e pecuária) e secundário (indústria) (Hinrichsen *et al.*, 1998). Os efluentes de origem agrícola e pecuária são ricos em azoto e fósforo e contêm substâncias químicas nocivas, como pesticidas e fertilizantes, que contaminam as águas superficiais e as subterrâneas. Estes efluentes estão também contaminados com resíduos de metais pesados, tal como o cobre (Cu) e o mercúrio (Hg), que são provenientes dos fertilizantes ou da ração animal. A composição dos efluentes com origem industrial varia consoante a atividade, contudo possuem compostos orgânicos tóxicos, tais como hidrocarbonetos e metais pesados (WWAP, 2017).

Relativamente a metais pesados, a indústria mineira, metalúrgica e galvanoplastia constituem as principais atividades industriais geradoras de efluentes líquidos com elevadas concentrações de metais que, se não forem devidamente tratados, podem causar sérios problemas ambientais, representando um perigo para os organismos vivos (Das *et al.*, 2008). Alguns metais, tais como Cu e o zinco (Zn), podem ter origem em minerais que se encontram em rochas e solos, apresentando valores de concentração não nocivos aos seres vivos (Goyer, 1997). No entanto, a emissão dos efluentes de atividades industriais aumenta a concentração destes elementos químicos (e outros como chumbo - Pb - e Hg) nos cursos de água, atingindo níveis cuja exposição dos seres vivos está associada a uma toxicidade. Atualmente, o tratamento de efluentes com uma elevada carga de metais pesados é efetuado com recurso a técnicas físico-químicas clássicas, tais como a precipitação química, processos de permuta iónica, tratamento eletroquímico, ou adsorção por carvão ativado (Chong *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2008). Algumas técnicas podem ser eficientes, como o caso da permuta iónica, mas são extremamente dispendiosas. Outras técnicas são mais económicas, como a precipitação química, mas são ineficazes e a formação de grandes quantidades de lamas tóxicas torna a sua eliminação mais

difícil. Portanto, um tratamento mais económico e ambientalmente favorável de efluentes com metais pesados apresenta atualmente uma importância relevante.

Uma solução de baixo custo para remediar o problema citado é a bio-remoção com microalgas. A bio-remoção envolve duas fases a bioadsorção e a bioacumulação. A bioadsorção é independente do metabolismo do organismo vivo e envolve uma fase sólida (bioadsorvente, sendo, neste caso, as microalgas) e uma fase líquida (solvente) que contém as espécies que vão ser adsorvidas. A fase de bioacumulação é dependente do metabolismo, onde o metal penetra na parede celular e se acumula nas células do organismo (Das *et al.*, 2008).

Para além da remoção de metais pesados, as microalgas possuem diversas aplicações ambientais como a captação de CO<sub>2</sub>, tratamento de águas residuais, e podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis (Chan *et al.*, 2013; Spolaore *et al.*, 2006). Relativamente ao tratamento de águas residuais, as microalgas são amplamente estudadas na remoção de nutrientes de efluentes, nomeadamente o azoto e fósforo, visto que estes são dois dos nutrientes principais para o crescimento das mesmas. As lamas produzidas podem ser utilizadas como fertilizante, devido ao alto valor nutricional, permitindo a reciclagem dos nutrientes referidos (Aslan e Kapdan, 2006). A presença de metais pesados nestes efluentes pode influenciar o crescimento das microalgas e simultaneamente a eficiência de remoção de azoto e fósforo. No entanto, para concentrações baixas de metais pesados, as microalgas podem contribuir para a remoção dos mesmos, sendo alguns deles usados como micronutrientes em alguns meios de cultura. Devido à sua grande área superficial e elevada afinidade, a remoção de metais pesados de efluentes pelas microalgas é um processo eficaz (Dinis *et al.*, 2004). Porém, a acumulação de metais pesados na biomassa inviabiliza o uso da mesma como fertilizante, sendo necessária a incineração para a sua deposição (Ahluwalia e Goyal, 2007).

Contudo, a avaliação do efeito dos metais pesados no crescimento das microalgas e na eficiência de remoção de azoto e fósforo em águas residuais é, ainda, um tópico sob investigação. Desta forma, este projeto tem como principal objetivo estudar a integração da cultura de microalgas no tratamento de efluentes com metais pesados, analisando a produção de biomassa e eficiência de remoção de azoto, fósforo e os metais estudados (cádmio - Cd, níquel - Ni e Zn).

## 1.2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é avaliar o efeito dos metais pesados no crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, visando a remoção de nutrientes e metais e a produção de biomassa. O efeito de diferentes concentrações (1, 2 e 3 mg·L<sup>-1</sup>) de Ni, Cd e Zn são estudados na sua forma isolada ou combinada (Ni + Cd + Zn), analisando a produtividade de biomassa, taxa específica de crescimento e eficiências de remoção dos nutrientes (azoto e fósforo) e do metal

estudado. Os objetivos específicos são: (i) avaliar o efeito isolado/combinado destes três metais no crescimento da *C. vulgaris*; (ii) determinar as eficiências de remoção de azoto e fósforo em diferentes ambientes com metais pesados; e (iii) avaliar as cinéticas de remoção de metais (modelo de pseudo-primeira ordem) e modelos de equilíbrio (modelos de Langmuir e Freundlich).

Com este trabalho pretende-se avaliar a integração da cultura de microalgas no tratamento de efluentes contendo metais pesados. O uso de águas residuais como meio de cultura de microalgas promove simultaneamente a redução do custo de produção de biomassa e o tratamento deste efluente (remoção de metais, azoto e fósforo). Este sistema poderá apresentar uma melhoria na sustentabilidade do tratamento de águas residuais, quando comparado com os processos convencionais atualmente utilizados.

### **1.3 Organização da dissertação**

Esta dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. O Capítulo 1 apresenta o enquadramento do tema desenvolvido, os principais objetivos do trabalho e a estrutura do presente documento.

O Capítulo 2 apresenta a revisão crítica da literatura. As microalgas, as suas características e as tecnologias de cultivo, bem como as principais aplicações ambientais das microalgas serão aprofundadas. Por fim, o tratamento de águas residuais e o crescimento das mesmas em culturas com metais pesados são também revistos.

O Capítulo 3 descreve a metodologia utilizada para a avaliação do crescimento de microalgas e remoção de nutrientes e metais. A descrição da instalação experimental e parâmetros de cultura são apresentados. O meio de cultura e a espécie utilizada, bem como as condições aplicadas em cada ensaio são descritos. Os métodos analíticos utilizados na determinação dos resultados são indicados. Por fim, os parâmetros e os modelos cinéticos aplicados neste trabalho são descritos.

O Capítulo 4 apresenta os resultados obtidos na avaliação do crescimento de *C. vulgaris*, quantificando a remoção de nutrientes e metais pela mesma. Os resultados dos diferentes ensaios são devidamente discutidos, com especial atenção aos parâmetros obtidos com os modelos cinéticos e de equilíbrio no ajuste dos valores experimentais.

O Capítulo 5 apresenta as principais conclusões obtidas durante a realização do estudo, assim como os principais valores que podem servir de referência para estudos similares. Sugestões para trabalhos futuros são também apresentados.



## 2. Revisão da literatura

### 2.1 Microalgas

As microalgas integram o grupo de microrganismos fotossintéticos e podem ser encontradas tanto em ambientes marinhos como de água doce. O processo de fotossíntese é similar ao das plantas e, devido à sua estrutura celular simples (não possuem raízes, caule nem folhas) e por se encontrarem em ambientes aquáticos, são mais eficientes em converter a energia solar em biomassa (Gouveia, 2011). São organismos que conseguem sobreviver em ambientes com condições extremas (Gonçalves, 2017): (i) conseguem crescer em ambientes em que a luminosidade é muito baixa ou muito elevada; (ii) conseguem viver sob condições de temperaturas extremas, desde climas polares até climas desérticos; (iii) podem encontrar-se, também, em ambientes hipersalinos; e (iv) algumas espécies têm a capacidade de sobreviver em meios ácidos e básicos extremos.

As classes de microalgas são distinguidas maioritariamente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. Deste modo, distinguem-se três classes de algas eucarióticas que, devido à sua abundância, assumem uma maior predominância: as algas verdes (*Chlorophyceae*), as algas douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*). Como algas procarióticas, distinguem-se as cianobactérias (*Cyanophyceae*), também conhecidas por algas azul-esverdeadas (Demirbas e Demirbas, 2010).

A microalga *C. vulgaris* pertence ao grupo de algas verdes e é a microalga em estudo no presente trabalho. Esta microalga tem uma reprodução vegetativa (assexuada) e um rápido crescimento mesmo em condições adversas. A sua composição é rica em lípidos (12-38%, m/m), hidratos de carbono (10-17%, m/m) e proteínas (39-61%, m/m) permitindo uma elevada produtividade em termos de biomassa e lípidos (Cai *et al.*, 2013). Este facto despertou interesse a nível comercial e, devido ao vasto conhecimento sobre esta microalga, a aplicação da mesma tem-se diversificado por várias áreas, desde a produção de biocombustíveis a suplementos alimentares e alimentação animal, bem como o tratamento de águas residuais (Safi *et al.*, 2014).

### 2.2 Modo de crescimento

O cultivo das microalgas pode ser classificado não só pela tecnologia usada (descrita na Seção 2.3), mas também pela via metabólica que permite o seu crescimento. As microalgas podem crescer com base em quatro tipos de metabolismo, dependendo da fonte de energia e de carbono (Chen *et al.*, 2011):

- Foto-autotrófico: utilização da luz como fonte de energia e carbono inorgânico (por exemplo, CO<sub>2</sub> e bicarbonato - HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) como fonte de carbono, onde a produção de energia química é realizada através da fotossíntese;

- Heterotrófico: recurso aos compostos orgânicos como fonte de carbono e energia obtida através da respiração celular;
- Mixotrófico: utilização de carbono orgânico e inorgânico como fonte de carbono, dependendo da concentração de compostos orgânicos e da luz disponível; estes organismos são capazes de viver sob condições auto e heterotróficas.
- Foto-heterotrófico: a luz é necessária para processar os compostos orgânicos usados como fonte de carbono.

O metabolismo heterotrófico está associado a produtividades de biomassa mais elevadas em comparação com os outros metabolismos. No entanto, estas culturas são mais suscetíveis a contaminações por bactérias e fungos, devido ao conteúdo orgânico do meio, causando problemas na produção em grande escala. Adicionalmente, o custo da fonte de carbono orgânico é uma desvantagem para a produção destes microrganismos. Apesar das baixas taxas de crescimento e produtividade, o metabolismo autotrófico é o mais utilizado e o mais simples de aplicar em lagoas abertas (descrita na Seção 2.3.1), visto que as microalgas podem capturar o CO<sub>2</sub> da atmosfera ou de efluentes gasosos de fábricas próximas, representando uma grande vantagem (Gouveia, 2011).

Quando se utiliza o metabolismo mixotrófico em fotobiorreatores, este pode evitar problemas associados à sombra que se obtém quando se atinge elevadas densidades celulares durante o cultivo foto-autotrófico. O cultivo em sistemas abertos possui produtividades tanto no período diurno (metabolismo foto-autotrófico) como no período noturno (metabolismo heterotrófico). No entanto, com esta tecnologia, a cultura está facilmente sujeita a contaminações (Chen *et al.*, 2011).

Contudo, existem fatores ou condições que influenciam o crescimento das microalgas. A Tabela 1 apresenta um conjunto de fatores abióticos, bióticos e operacionais que influenciam a taxa de crescimento. Relativamente a fatores abióticos, a intensidade luminosa e fotoperíodo, a temperatura, a concentração de nutrientes, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, e a salinidade são os parâmetros mais importantes a serem controlados de forma a obter produtividades de biomassa mais elevadas (Barsanti e Gualtieri, 2014; Gouveia, 2011). A intensidade luminosa varia com a profundidade e a densidade de biomassa. Quanto maior for a profundidade e a densidade, maior é a quantidade de luz necessária para que esta penetre no interior da cultura. No entanto, elevada intensidade luminosa pode inibir o crescimento no interior da cultura sendo, este fenómeno denominado por fotoinibição (Barsanti e Gualtieri, 2014). A distribuição de luz nas culturas é influenciada pela frequência de colheita, visto que uma frequência mais elevada diminui a densidade de cultura,

Tabela 1: Fatores que influenciam a taxa de crescimento das microalgas (adaptado de Larsdotter (2006)).

Fatores	
Abióticos	Intensidade luminosa e fotoperíodo Temperatura Concentração de nutrientes Concentração de CO <sub>2</sub> e O <sub>2</sub> pH Salinidade Substâncias inibidoras
Bióticos	Patogénicos (bactéria, fungos, vírus) Predação do zooplankton Competição interespecífica
Operacionais	Mistura Taxa de diluição Profundidade Adição de bicarbonato Frequência da colheita

permitindo a penetração da luz no interior da mesma. Desta forma, a intensidade luminosa necessária para o crescimento das microalgas será menor. Gonçalves *et al.* (2014) estudaram o efeito de diferentes intensidades luminosas (36, 60, 120 e 180  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e de diferentes fotoperíodos (10:14, 14:10 e 24:0) no crescimento de microalgas, na captura de CO<sub>2</sub> e na remoção de nutrientes (azoto e fósforo). Neste estudo foram utilizadas quatro estirpes de microalgas: *C. vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechocystis salina* e *Microcystis aeruginosa*. A maior taxa de crescimento ( $\mu = 1,190 \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida pela *C. vulgaris* sob uma intensidade de 180  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e um fotoperíodo de 24:0. A menor taxa de crescimento ( $\mu = 0,214 \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida pela microalga *S. salina* na menor intensidade luminosa testada (36  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e num fotoperíodo de 10:14. A microalga *P. subcapitata* obteve nesta gama uma taxa de crescimento semelhante. Wahidin *et al.* (2013) estudaram o efeito da intensidade luminosa (50, 100 e 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e do fotoperíodo (24:0, 18:06 e 12:12) no crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis* sp. A maior taxa específica de crescimento ( $\mu = 0,339 \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida para uma intensidade de 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e para um fotoperíodo de 18:06. Os autores concluíram que, o aumento do fotoperíodo é favorável ao crescimento para a intensidade luminosa mais baixa (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), obtendo-se para esta intensidade uma taxa de crescimento mais elevada com o fotoperíodo 24:0. Em contrapartida, quando a intensidade luminosa é elevada (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a taxa de crescimento diminui com o aumento do fotoperíodo, visto que esta intensidade interrompeu o crescimento celular e, posteriormente, a morte celular. Este declínio causado pelo excesso de luz é denominado de fotoinibição. O termo fotoinibição é utilizado para definir danos causados pelo excesso de luz no fotossistema II (PSII) e pode ser considerado como fotoinibição dinâmica ou crónica. A fotoinibição dinâmica é temporária podendo a atividade fotossintética retomar quando os níveis de intensidade

luminosa diminuem. A fotoinibição crónica prolonga-se por um período mais longo de tempo (Werner *et al.*, 2002). No caso do estudo de Wahidin *et al.* (2013) o fotoperíodo 12:12 foi o que mais beneficiou o crescimento da cultura verificando-se, neste caso, uma fotoinibição dinâmica.

Relativamente ao efeito da temperatura na cultura, o aumento deste parâmetro de cultivo favorece a cultura até um valor ótimo ser atingido. Geralmente, este valor está compreendido entre 15 e 25 °C para uma grande maioria das espécies mesófilas. O sobreaquecimento pode levar rapidamente ao declínio da taxa de crescimento. Por outro lado, com temperaturas muito baixas, as microalgas tornam-se facilmente fotoinibidas por valores elevados de intensidade luminosa (Larsdotter, 2006). Martínez *et al.* (2000) estudaram o efeito da temperatura e da mistura na remoção de azoto e fósforo de águas residuais urbanas. A microalga *Scenedesmus obliquus* foi cultivada para as temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. O estudo concluiu que esta microalga possui uma taxa de crescimento mais elevada a 30 °C. No entanto, a produtividade de biomassa foi mais elevada para a temperatura de 25 °C.

A concentração de CO<sub>2</sub> e o pH na cultura estão correlacionados, visto que o aumento da alcalinidade no meio é devido ao consumo de CO<sub>2</sub> por parte das microalgas. O CO<sub>2</sub> deve ser então adicionado à cultura de forma a reduzir a alcalinidade e manter os níveis de produtividade em biomassa. Deste modo, uma opção de controlo de pH é a injeção de ar enriquecido com CO<sub>2</sub> ou a adição de bicarbonato, aumentando a disponibilidade de carbono para as microalgas. Para a maioria das espécies de microalgas, o pH deve manter-se entre 7 e 9 (Barsanti e Gualtieri, 2014). Gonçalves *et al.* (2016) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> (0,03, 3, 5, 7, 9 e 10% v/v) no crescimento das microalgas *C. vulgaris*, *P. subcapitata*, *S. salina* e *M. aeruginosa*. Foi verificado crescimento em todas as concentrações testadas, contudo obteve-se uma taxa de crescimento mais elevada para uma corrente gasosa enriquecida com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>.

Taraldsvik e Myklestad (2000) testaram o efeito do pH no crescimento da microalga marinha *Skeletonema costatum*. Os autores variaram o pH entre 6,5 e 9,4, onde se verificou um crescimento mais elevado para um pH de 7,5. A taxa de crescimento não variou significativamente para valores de pH entre 6,5 e 8,5, verificando-se uma diminuição acentuada para valores mais elevados. Esta diminuição pode estar associada com a disponibilidade de nutrientes do meio, ou seja, o azoto e fósforo poderão ser limitantes ao crescimento.

Tão importante como adicionar dióxido de carbono é remover o oxigénio em excesso, visto que a presença de oxigénio dissolvido acima dos valores de saturação inibe a fotossíntese e aumenta a taxa de fotorrespiração, diminuindo a produtividade global (Barsanti e Gualtieri, 2014). Raso *et al.* (2012) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de oxigénio no crescimento da microalga *Nannochloropsis* sp. As concentrações variaram desde 20% a 250% da concentração de saturação. Os autores concluíram que o aumento da concentração de 20% até

75% não afetou a taxa de crescimento, obtendo-se um valor médio de  $0,48 \text{ d}^{-1}$ . O aumento da concentração de 75% para 250% provocou uma diminuição na taxa de crescimento de  $0,49 \text{ d}^{-1}$  até  $0,18 \text{ d}^{-1}$ . Foi testado ainda a concentração de 300%, contudo verificou-se a perda de cor nas células, indicando a perda da clorofila. Conclui-se que para estas concentrações ocorreu a fotossintetização das células, isto é, ocorreu a descoloração dos pigmentos fotossintéticos. A fotossintetização é dependente da concentração de oxigênio e da quantidade de luz, visto que a exposição prolongada a radiações de luz intensas também pode provocar a destruição dos pigmentos.

A mistura é outro fator igualmente importante para o crescimento, visto que: (i) previne a sedimentação; (ii) facilita a transferência gasosa entre o meio de cultura e o ar; e (iii) permite a homogeneização da cultura, promovendo a exposição das células à luz, o acesso das mesmas aos nutrientes e a uniformização da temperatura da cultura (evitando, desta forma, a estratificação termal) (Barsanti e Gualtieri, 2014; Gouveia, 2011).

Para além da temperatura, Martinez *et al.* (2000) estudaram também o efeito da mistura no crescimento. A mistura foi promovida por duas formas: (i) injeção de ar (AR); e (ii) injeção de ar em conjunto com agitação magnética (AR+AM). Os autores concluíram que a mistura fornecida pelo conjunto AR+AM favorece o crescimento da microalga, aumentando a produtividade de biomassa.

## 2.3 Tecnologias de cultivo

O cultivo das microalgas pode ser efetuado em sistemas com as culturas suspensas ou imobilizadas. O primeiro caso pode ser dividido em sistemas abertos, sistemas fechados ou sistemas híbridos, sendo este uma combinação dos anteriores (Larsdotter, 2006). No caso das culturas imobilizadas, as microalgas são fixadas a um meio sólido que as imobiliza, mas permite trocas de substratos e de produtos pelos poros do material, podendo este ser sintético (por exemplo, poliuretano) ou natural (por exemplo, agar) (Cai *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Sistemas abertos

O cultivo em sistema aberto pode ser dividido em duas categorias: naturais, que inclui lagoas ou lagoas, ou artificiais, que inclui lagoas *raceway*, lagoas circulares ou tanques. Atualmente, para cultivo comercial, a opção mais utilizada é as lagoas *raceway* (Figura 1), onde a cultura é mantida em recirculação num canal fechado, com cerca de 0,3 m de profundidade para permitir a fotossíntese das microalgas (Chisti, 2007; Larsdotter, 2006). A circulação e a mistura das microalgas são efetuadas por uma roda de pás, que evita também a sedimentação através do constante movimento.

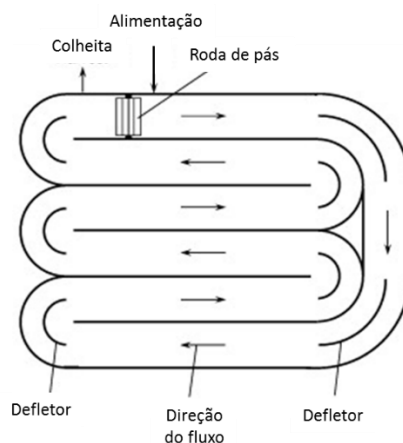


Figura 1: Representação esquemática de uma lagoa raceway (Chisti, 2007).

Os sistemas abertos são de construção e operação mais simples, o que representa uma vantagem económica relativamente aos sistemas fechados. Porém, estes sistemas possuem uma elevada dependência de fatores externos, não permitindo o controlo adequado das condições de crescimento. A perda de água por evaporação e possíveis contaminações (causando redução da produtividade e variabilidade na composição da biomassa obtida) são algumas das desvantagens deste tipo de sistemas de cultivo (Cai *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Sistemas fechados

O crescimento em sistema fechado pode ser mais vantajoso em relação ao crescimento em sistema aberto, visto que: (i) as condições da cultura e o crescimento, como o pH, temperatura, arejamento, concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, podem ser controladas; (ii) a evaporação da água e possíveis contaminações podem ser evitadas; e (iii) concentrações de biomassa mais elevadas podem ser atingidas (Gonçalves, 2017). Contudo, a maior desvantagem deste sistema é o elevado custo de investimento e manutenção.

Os sistemas fechados dividem-se em três principais categorias: fotobiorreatores tubulares, fotobiorreatores de painel plano e reatores do tipo fermentador (Carvalho *et al.*, 2006). Os reatores tubulares e os de painel plano são os sistemas mais utilizados e são desenhados de forma a garantir uma luminosidade ótima e as trocas gasosas. A captura de luz solar pode ser maximizada ajustando a disposição dos tubos do reator à orientação do sol (Cai *et al.*, 2013).

Os reatores tubulares possuem três configurações: vertical, horizontal e em forma  $\alpha$ . Os reatores tubulares verticais são geralmente tubos de vidro ou polietileno, visto que são suficientemente transparentes para permitir a penetração da luz.

A configuração vertical pode ser categorizada em coluna de borbulhamento (Figura 2A) ou reator *airlift* (Figura 2B), consoante o fluxo do líquido dentro do reator. Na coluna de borbulhamento, o ar é distribuído por um dispersor da zona escura central para a zona iluminada

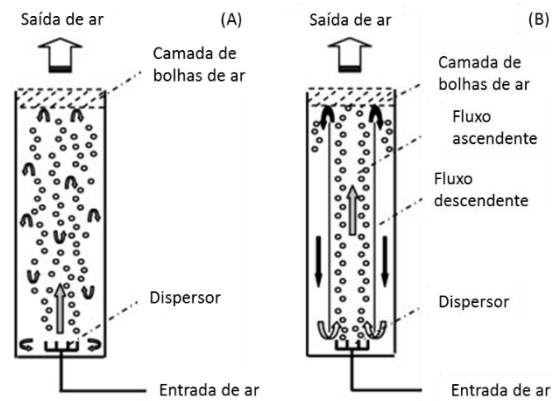


Figura 2: Esquema da coluna de borbulamento (A) e do reator airlift (B) (Behin, 2012).

exterior. O reator *airlift* possui uma estrutura de separação no centro do reator onde o ar é borbulhado. Esta separação provoca uma corrente ascendente e descendente, fazendo circular o líquido por todo o reator (Sharma *et al.*, 2015).

O reator tubular horizontal pode ser denominado de quatro formas, consoante a sua distribuição espacial: vertical, horizontal, inclinado e helicoidal. Nas Figuras 3 e 4 apresentam-se o esquema de cada uma das configurações.

Os reatores tubulares horizontais são construídos com tubos transparentes de policloreto de vinil (PVC) ou de polipropileno (PP) com diâmetros internos pequenos (< 0,1m) para aumentar a penetração da luz. Em adição, uma bomba de ar ou um sistema de *airlift* fornece a agitação necessária e as trocas gasosas são efetuadas num compartimento ou tubo de ligação. Um sistema de controlo de temperatura pode ser adicionado ao conjunto, visto que nesta configuração a temperatura é um parâmetro que é difícil de controlar (Sharma *et al.*, 2015).

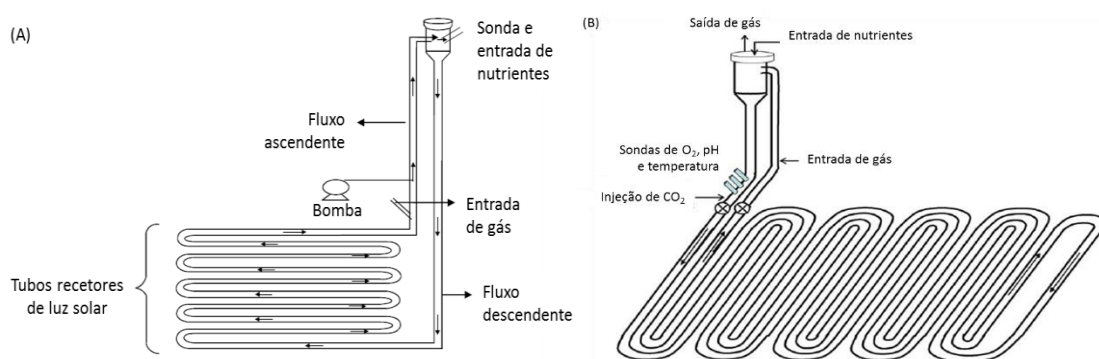


Figura 3: Representação esquemática de um fotobiorreator tubular horizontal com distribuição vertical (A) (Ugwu e Aoyagi, 2012) e horizontal (B) (López *et al.*, 2006).

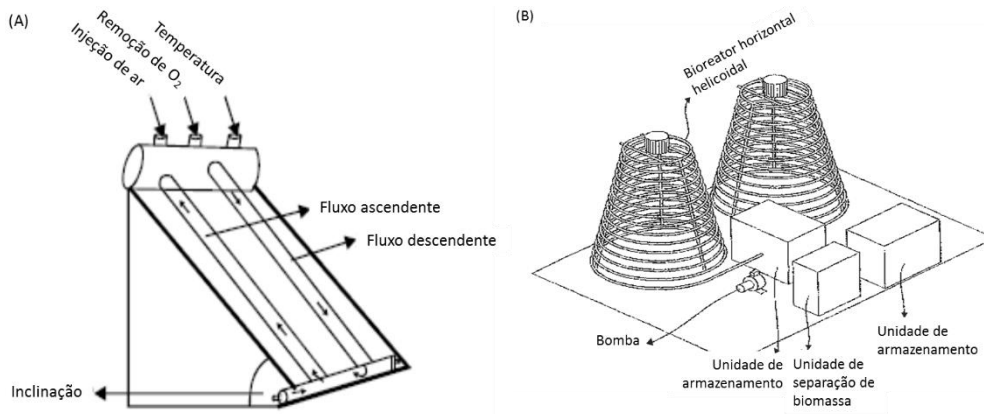


Figura 4: Representação esquemática de um reator inclinado (A) (Ugwu e Aoyagi, 2012) e helicoidal (B) (Mueller-Rees et al., 2013).

O reator tubular em forma  $\alpha$  (Figura 5) é construído com tubos transparentes de PVC e duas bombas *airlift* que promovem uma trajetória ascendente e descendente onde existem pontos de injeção de CO<sub>2</sub> ao longo do percurso. Como o fluido é bombeado numa única direção é possível atingir uma velocidade elevada com uma injeção de um fluxo reduzido de ar nos tubos ascendentes (Carvalho et al., 2006).

Os fotobioreatores de painel plano são formados por dois painéis retangulares de vidro ou acrílico com um espaçamento de cerca de 25 cm entre eles (Figura 6). Os painéis são iluminados em ambos os lados e possuem um sistema de injeção de ar no fundo que permite a mistura da cultura e a remoção de O<sub>2</sub>. Em alguns casos, os painéis podem ser inclinados para otimizar a quantidade de luz que é capturada.

Os reatores do tipo fermentador (Figura 7) são mais convencionais para o metabolismo heterotrófico com fontes de carbono apropriadas. Para um cultivo autotrófico, este reator possui uma enorme desvantagem: a razão área-volume é baixa e por isso a distribuição da luz não é eficiente. Assim, para ultrapassar esta desvantagem, um sistema de iluminação é instalado para distribuir homogeneamente a luz (Carvalho et al., 2006).

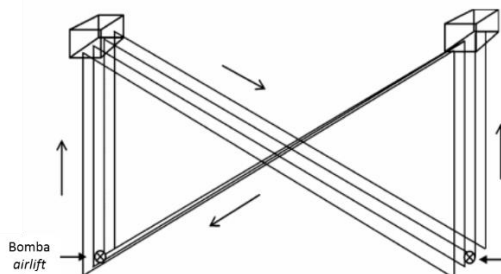


Figura 5: Esquema de um reator em forma  $\alpha$  (Carvalho et al., 2006).

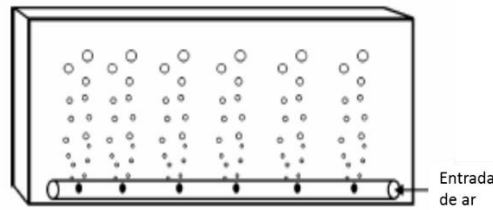


Figura 6: Representação de um fotobiorreator de painel plano (Carvalho et al., 2006).

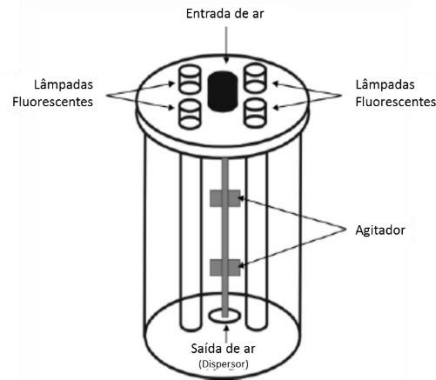


Figura 7: Representação esquemática de um reator do tipo fermentador (Carvalho et al., 2006).

A seleção da metodologia de cultivo deve ser efetuada com base em diferentes critérios para obter o melhor rendimento possível. Assim, as vantagens e desvantagens de cada reator encontram-se resumidas na Tabela 2.

### 2.3.1 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos combinam os benefícios do sistema aberto e fechado em duas etapas. Primeiramente, o inóculo passa por um reator fechado e, em seguida, as microalgas são cultivadas em lagoas abertas. Esta configuração permite minimizar a contaminação na fase inicial do crescimento. No entanto, a aplicação em larga escala é limitada pelo custo que a primeira etapa acarreta (Cai et al., 2013).

## 2.4 Meio de cultura

O crescimento fotossintético requer luz,  $\text{CO}_2$ , água e nutrientes. De forma a maximizar este crescimento, o meio de cultura tem de possuir os nutrientes essenciais ao desenvolvimento das microalgas. Estes podem ser divididos em macronutrientes, como o carbono, azoto, fósforo e enxofre, e micronutrientes, tais como o sódio, potássio, ferro, magnésio e cálcio. No entanto, o azoto e o fósforo são os nutrientes com uma maior relevância no meio de cultura (visto que o carbono pode ser alimentado pela corrente gasosa alimentada à cultura) e, por isso, a razão N:P é um dos fatores mais importantes no meio (Cai et al., 2013). A razão Redfield ( $\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$ ) é a razão estequiométrica que estima a composição elementar da maioria das células das microalgas e, por isso, o meio deverá possuir estas proporções para ser obter um crescimento

Tabela 2: Comparação das diferentes características das vias de crescimento (adaptado de Sharma et al. (2015); Ugwu e Aoyagi (2012)).

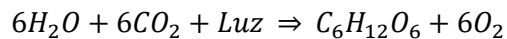
Tecnologia de cultivo	Vantagens	Limitações
Lagoas abertas	Facilidade na construção e operação Sistema mais económico Elevada capacidade de produção	Baixo controlo das condições da cultura Limitado a algumas espécies Suscetível a contaminações Baixa produtividade Dificuldade na produção por longos períodos de tempo Necessidade de uma elevada área de terreno
Reatores tubulares verticais	Compactos e relativamente económicos Facilidade de operação para monoculturas Elevada área de transferência de massa Obtenção de uma boa mistura sem provocar tensão nas células Baixo consumo de energia	Diminuição da área de iluminação no aumento de escala Elevada refração da luz incidente
Reatores tubulares horizontais	Elevadas áreas de iluminação Adequado para culturas exteriores Obtenção de boas produtividades de biomassa	Pequena área de transferência de massa Suscetível à fotoinibição Dificuldade no controlo da temperatura Necessidade de uma elevada área de terreno
Reatores de painel plano	Elevadas áreas de iluminação Adequado para culturas exteriores Obtenção de boas produtividades de biomassa Fácil manutenção Baixa acumulação de oxigénio	Dificuldades no aumento de escala Dificuldades no controlo da temperatura
Fermentadores	Facilidade em manter condições ótimas Prevenção de contaminação Obtenção de elevadas concentrações de biomassa	Custo e disponibilidade da matéria-prima Competição pela matéria-prima com outra tecnologias de produção de combustíveis

ótimo (Larsdotter, 2006). A fórmula empírica de Stumm ( $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$ ) é outra razão bastante referenciada na literatura (Cai *et al.*, 2013). No entanto, estudos apontam que a razão ideal N:P para o crescimento das microalgas deverá situar-se entre 7 e 8 (Cai *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015; Xin *et al.*, 2010). Tendo em conta que, na maioria dos efluentes residuais a razão N:P possui valores abaixo dos valores estimados pelas razões de Redfield e Stumm (Cai *et al.*, 2013), estes estudos recentes vêm justificar a combinação entre o tratamento de águas residuais e o crescimento de microalgas. Portanto, a otimização da remoção está dependente da absorção

dos nutrientes pelas microalgas logo, os mecanismos de absorção dos nutrientes devem ser entendidos.

#### 2.4.1 Carbono

As microalgas são compostas em cerca de 50% por carbono e, por isso, este é um nutriente importante no crescimento das microalgas. O CO<sub>2</sub> é o nutriente principal do metabolismo autotrófico devido à sua importância nas reações fotossintéticas (Carvalho *et al.*, 2006). As microalgas autotróficas assimilam carbono inorgânico, nomeadamente dióxido de carbono e o bicarbonato, através da fotossíntese transformando-o em glicose. De forma geral, a fotossíntese representa-se pela seguinte equação química (Larsdotter, 2006).



O CO<sub>2</sub> pode ser captado da atmosfera ou da exaustão de gases industriais. No entanto, a concentração atmosférica é relativamente baixa (0,04%, v/v) e, por isso, o fornecimento extra de CO<sub>2</sub> é necessário para manter elevadas produtividades.

As microalgas com metabolismo heterotrófico usam carbono orgânico, tal como ácidos orgânicos, açúcares, acetato ou glicerol, onde estes podem ser assimilados por via quimio-heterotrófica ou foto-heterotrófica. No primeiro caso, o substrato para além de ser usado como fonte de carbono é também usado tanto como fonte de energia, através da respiração, enquanto no segundo caso, a luz é a fonte de energia (Larsdotter, 2006).

#### 2.4.2 Azoto

O azoto encontra-se numa variedade de substâncias biológicas importantes, como enzimas, peptídios, clorofila, moléculas de transferência de energia (trifosfato de adenosina - ATP, difosfato de adenosina - ADP) e material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA, ácido ribonucleico - RNA). As fontes inorgânicas são o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), o amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), o amoníaco (NH<sub>3</sub>) e o azoto gasoso (N<sub>2</sub>) (Cai *et al.*, 2013). A Figura 8 mostra o processo de transformação do azoto inorgânico em orgânico.

O amónio é a forma preferencial de azoto no crescimento das microalgas, visto que a sua assimilação não necessita de uma reação redox, requerendo menos energia. No entanto, o nitrato está em predominância no meio aquático, sendo a forma mais oxidada e termodinamicamente estável, sendo também assimilada na ausência de amónio. Assim, efluentes com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> favorecem o rápido crescimento das microalgas (Cai *et al.*, 2013). No entanto, valores superiores a 20 mg NH<sub>4</sub>-N·L<sup>-1</sup> não são benéficos ao cultivo de microalgas devido à sua toxicidade, provocando um efeito inibitório (Larsdotter, 2006). A volatilização do amoníaco é também um importante mecanismo de remoção de amónio que é favorecido com o aumento

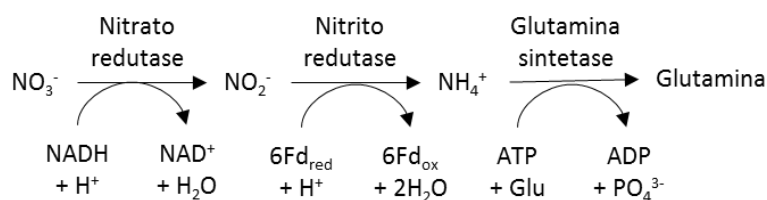
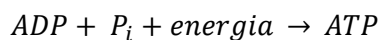


Figura 8: Esquema simplificado da assimilação do azoto inorgânico (Cai *et al.*, 2013)

de pH e temperatura. A assimilação do azoto pode ser realizada por microalgas procariontas, nomeadamente as cianobactérias, através da fixação do azoto atmosférico ( $\text{N}_2$ ), convertendo-o em formas que podem ser assimiladas.

#### 2.4.3 Fósforo

O fósforo é também um nutriente chave no metabolismo das microalgas e pode ser encontrado em ácidos nucleicos, lípidos e proteínas. As formas preferenciais de fósforo são o dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e o hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) onde são incorporadas nos componentes orgânicos através da fosforilação. A fosforilação envolve a geração de ATP a partir de moléculas de ADP com consumo de energia. A energia é originada a partir da respiração celular ou, no caso da fotossíntese, da luz (Cai *et al.*, 2013). De forma simplificada, a fosforilação procede-se da seguinte forma:



As microalgas são capazes de armazenar fósforo em excesso, sob forma de polifosfato, permitindo o crescimento na ausência de fósforo disponível (Larsdotter, 2006). De forma semelhante à remoção de azoto, a remoção de fósforo não é só dependente da absorção celular, mas também das condições exteriores, como o pH e o oxigénio dissolvido. O fosfato precipitará na solução para valores elevados de pH e elevadas concentrações de oxigénio dissolvido (Cai *et al.*, 2013).

#### 2.4.4 Micronutrientes

Os micronutrientes em oposição aos macronutrientes são necessários em menores quantidades, visto que elevadas concentrações destes elementos são tóxicas para a maioria das espécies. Assim, pequenas quantidades de manganês, cobre, ferro, zinco, boro, cloretos e níquel são frequentemente adicionadas aos meios de cultivo, juntamente com um agente quelante (por exemplo, ácido etilendiamino tetra-acético - EDTA), para prevenir a limitação ao crescimento por estes nutrientes.

## 2.5 Aplicações ambientais das microalgas

A utilização das microalgas como alternativa a diversos processos, tais como a produção de biocombustíveis ou o tratamento de águas residuais, tem-se vindo a intensificar nos últimos anos, devido à urgente necessidade de se encontrar soluções mais eficientes e económicas para determinados problemas ambientais. O crescimento de microalgas apresenta algumas vantagens que permite serem uma solução viável, nomeadamente: (i) não necessitarem de terreno arável nem de água potável para crescer, conseguindo desenvolver-se em ambientes com condições menos favoráveis; (ii) o crescimento é rápido e possuem uma percentagem elevada de lípidos na sua composição (15-75% em peso seco (Chisti, 2007)); (iii) possuírem a capacidade de fixar CO<sub>2</sub>; (iv) conseguirem utilizar os nutrientes em excesso da maioria dos efluentes residuais; e (v) a biomassa obtida no cultivo de microalgas pode ser utilizada como fonte de produtos de valor acrescentado (Spolaore *et al.*, 2006). Em suma, as microalgas podem ser aplicadas em produção de biocombustíveis, mitigação do CO<sub>2</sub> e tratamento de águas residuais (Cai *et al.*, 2013).

A produção de biocombustíveis através de microalgas tem sido amplamente estudada, visto ser uma alternativa viável aos combustíveis fósseis. Os biocombustíveis produzidos a partir destes microrganismos são o biodiesel, bioetanol e o biometano. O biometano (habitualmente designado por biogás) é produzido através da digestão anaeróbia da biomassa e tem como principal característica o alto poder calorífico, podendo ser utilizado na produção de eletricidade (Chisti, 2007). O bioetanol é produzido por fermentação alcoólica e pode ser utilizado como aditivos nos combustíveis para os veículos a motor (Chisti, 2007). O biodiesel é produzido por transesterificação dos lípidos contidos nas microalgas. Neste processo ocorre a conversão química do óleo para o éster gordo (biodiesel), onde o objetivo é baixar a viscosidade do óleo para que fique próxima do diesel de origem fóssil (Demirbas e Demirbas, 2010).

O estudo da produção dos biocombustíveis é baseado principalmente no alto teor lipídico das microalgas. Contudo, a produção de biomassa gera outros compostos químicos com interesse comercial. A biorrefinação é uma abordagem que permite a rentabilização da biomassa passível de ser transformada, permitindo reduzir o custo de produção de biodiesel através de microalgas (Chisti, 2007). A Figura 9 apresenta algumas aplicações comerciais dos subprodutos resultantes do crescimento das microalgas.

A aplicação de microalgas tem demonstrado resultados positivos na remoção de azoto, fósforo e outros elementos (metais pesados) de águas residuais. A composição dos efluentes depende da fonte onde são produzidos, podendo-se distinguir efluentes domésticos/municipais, industriais e provenientes da agricultura e pecuária. Os efluentes

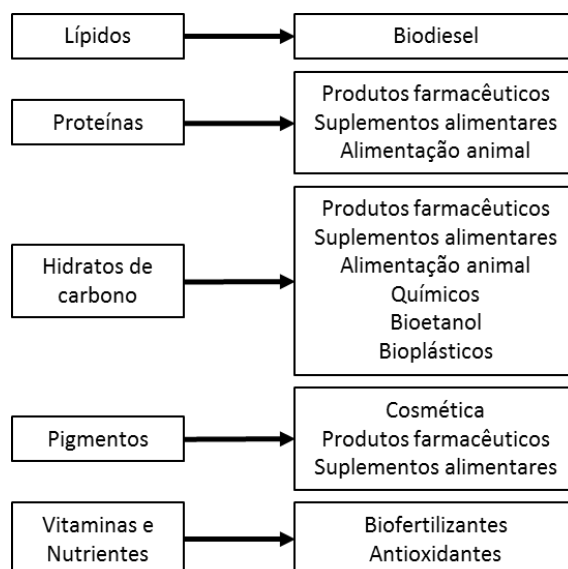


Figura 9: Valorização dos subprodutos da produção da biomassa (adaptado de Safi et al. (2014)).

domésticos são os mais estudados, visto não apresentarem compostos tóxicos e terem uma razão N:P que não se afasta muito da razão que se pensa ser a ideal para o crescimento das microalgas. As águas residuais industriais apresentam composições muito variadas, dependendo do setor comercial. Os efluentes de indústrias mineiras contém metais pesados e uma menor quantidade de azoto e fósforo em comparação com os efluentes resultantes de outras atividades. Assim, o interesse nestes efluentes é a remoção dos metais. No entanto, a baixa concentração de azoto e fósforo implica reduzidas taxas de crescimento e produtividade de biomassa. Relativamente às águas residuais provenientes da agricultura e pecuária, estas são geralmente ricas em azoto e fósforo, mas a presença de pesticidas e herbicidas pode inibir o crescimento das microalgas (Cai et al., 2013).

## 2.6 Tratamento de águas residuais reais

De uma forma resumida, o tratamento de águas residuais é efetuado em quatro fases: tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. No tratamento preliminar, os sólidos mais grosseiros, areias e óleos e gorduras são removidos por gradagem ou tamisagem, decantação e flutuação, respetivamente. O tratamento primário (ou tratamento mecânico) tem como objetivo remover os restantes sólidos grossos e remover parte dos sólidos suspensos (SS), bem como diminuir a carência bioquímica de oxigénio (CBO). No tratamento secundário (ou biológico) utilizam-se as capacidades metabólicas de determinados organismos para remover a matéria poluente coloidal e dissolvida e a remoção de nutrientes (azoto e fósforo, particularmente). O tratamento terciário é uma fase de desinfecção e afinação que tem como objetivo a remoção de agentes patogénicos e de nutrientes em excesso (nomeadamente, azoto

e fósforo). Esta fase ocorre numa lagoa de maturação onde se adiciona cloro ou carvão ativado de forma a auxiliar a adsorção das partículas (Tchobanoglous *et al.*, 2003).

Como já referido anteriormente, a utilização de microalgas nas etapas de tratamento de águas residuais pode ser muito benéfica. A presença de microalgas no tratamento secundário obriga à existência de uma relação de simbiose microalga-bactéria. Como se pode ver na Figura 10, enquanto a microalga fornece o oxigénio necessário à bactéria através da fotossíntese, a bactéria liberta CO<sub>2</sub> e nutrientes através da degradação da matéria orgânica. O uso de microalgas para produção de O<sub>2</sub> é vantajoso porque evita a libertação de componentes voláteis ou odores que poderiam ocorrer nos sistemas mecânicos tradicionais de arejamento. Permite também reduzir os custos de operação em cerca de 50%, visto que o arejamento mecânico é onde existe o maior consumo de energia nos sistemas de tratamento de águas residuais (Gordon e Seckbach, 2012).

As microalgas podem ter um papel importante no tratamento terciário nas lagoas de maturação (Munoz e Guieysse, 2006). Diversos estudos já foram desenvolvidos para determinar a eficiência do processo na remoção de nutrientes, nomeadamente azoto e fósforo, de águas residuais reais. A Tabela 3 apresenta alguns estudos sobre a remoção de nutrientes utilizando efluentes reais.

Valderrama *et al.* (2002) usaram um efluente industrial diluído, visto que o efluente bruto possuía elevadas quantidades de matéria orgânica que impediam o crescimento aquático. O efluente utilizado na diluição do efluente bruto é a água de lavagem de equipamentos, visto ser um efluente abundante. A taxa de diluição usada foi 1:10. Relativamente à remoção de nutrientes, a eficiência de remoção de amónio obtida foi de 73%. Os autores justificaram esta remoção amónio com a volatilização do amoníaco, visto que os biorreatores estavam bem arejados. A eficiência de remoção de fósforo foi de 51%, tendo os autores atribuído esta remoção à acumulação na biomassa.

Martinez *et al.* (2000) estudaram o crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* e as cinéticas de remoção de azoto e fósforo de um efluente municipal. Os autores verificaram uma diminuição acentuada da concentração de fósforo nas primeiras 3 h de cultivo. Esta diminuição foi causada pela adsorção nas paredes das células e do biorreator, sendo responsável por 51% da remoção de fósforo. Contudo, o pH inicial da cultura era superior a 9, o que pode ser uma explicação para a diminuição acentuada da concentração de fósforo, visto que o fósforo precipita a um pH de 8,5. Para além disso, a remoção não atingiu os 100%, porque houve rutura das células, havendo libertação de fósforo para o meio. Esta rutura foi confirmada por observação ao microscópio e está associado ao pH elevado da cultura (pH=11). O pH também

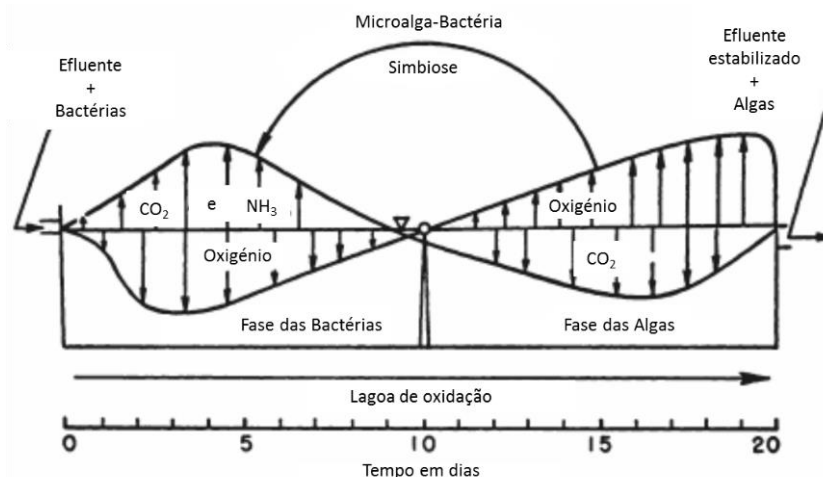


Figura 10: Simbiose entre microalgas e bactérias (Gordon e Seckbach, 2012).

Tabela 3: Remoção de nutrientes de efluentes reais com culturas de microalgas.

Espécie	Operação e condições experimentais	Azoto $C_i$ (mg·L <sup>-1</sup> ) [ER(%)]	Fósforo $C_i$ (mg·L <sup>-1</sup> ) [ER(%)]	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Ref.
<i>C. vulgaris</i>	Efluente industrial; Reator fechado (V=5L); Modo Batch; T = 23 ± 1 °C; I = 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; t = 5 dias; $C_{x,i} = 2 \times 10^6$ células·mL <sup>-1</sup> .	3-8 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [73]	1,5-3,5 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [51]	n.d.	Valderrama <i>et al.</i> (2002)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente municipal; Reator fechado (V=1L); Modo Batch T = 25 °C; I = 153 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; t = 8 dias; pH = 9,3; $C_{x,i} = 14$ mg·L <sup>-1</sup> .	27,4 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [100]	11,8 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [98]	0,032	Martinez <i>et al.</i> (2000)
<i>C. vulgaris</i>	Efluente industrial; Reator fechado (V=0,25L); T = 27 °C; I = 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; t = 8 dias; pH = 8,0; $C_{x,i} = 40$ mg·L <sup>-1</sup> .	54,6-90,0 NH <sub>3</sub> [100] 17,7-35,4 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [46]	46 PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [73]	n.d.	Yun <i>et al.</i> (1997)
<i>C. vulgaris</i>	Efluente municipal; Reator fechado (V=0,5L); Modo Batch; T = 28 °C; t = 9 dias; I = 20 e 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; pH = 7,0; $C_{x,i} = 190$ mg·L <sup>-1</sup> .	79,3 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [71]	7,47 P [100]	0,141	Silva-Benavides e Torzillo (2012)
<i>Planktothrix isothrix</i>		79,3 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> [74]	7,47 P [100]	0,135	

NOTA:  $C_{x,i}$  = Concentração de biomassa inicial;  $C_i$  = Concentração inicial; %ER=Eficiência de remoção; I= Intensidade luminosa; n.d.=Não definido; Ref.=Referência;  $\mu$ =Taxa específica de crescimento; T=Temperatura; t=Tempo; V=Volume.

influenciou a remoção de azoto do meio, deslocando o equilíbrio químico no sentido da produção de NH<sub>3</sub>. Assim, a volatilização foi o principal mecanismo de eliminação de azoto. Neste caso, como o efeito do pH foi acentuado, a avaliação do efeito da temperatura e da mistura foi apenas conseguida no caso da remoção de azoto. A 30 °C verificou-se uma taxa de crescimento mais elevada no ensaio com a mistura, logo uma maior remoção de azoto. Conclui-se que a mistura afetou a remoção de azoto através da influência que esta teve no crescimento. Assim, a mistura favorece a remoção de azoto do meio.

Yun *et al.* (1997) realizaram o seu estudo com um efluente com uma concentração residual de fósforo, sendo necessário adicionar uma fonte suplementar de fósforo. Nos ensaios em que não foi adicionado fósforo, a taxa de remoção do amoníaco era muito lenta devido à limitação causada pela ausência deste elemento químico. Nos ensaios com adição de fósforo, a microalga conseguiu remover na totalidade a quantidade de amoníaco e conclui-se que existe uma preferência pelo  $\text{NH}_3$  em vez do nitrato como fonte de azoto. O nitrato apenas foi consumido quando já não existe  $\text{NH}_3$ . A remoção de fósforo não foi tão significativa visto que inicialmente foi adicionado uma quantidade superior à necessária.

O trabalho experimental desenvolvido por Silva-Benavides e Torzillo (2012) avaliou a remoção de azoto e fósforo de um efluente municipal sob diferentes condições de iluminação (20 e 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). O azoto não foi totalmente removido da cultura, apesar de esta ter decorrido durante vários dias com fotoperíodo de 24:0. Os autores justificaram a baixa eficiência de remoção com elevada concentração inicial, alegando que para concentrações superiores a 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , mais de 50% da concentração de  $\text{NH}_4\text{-N}$  se mantém na cultura após 21 dias. Isto indica que existe um excesso na concentração de azoto e poderá ser essa razão deste não ser captado pelas microalgas. A remoção de fósforo está relacionada com a absorção ativa das células, visto que o pH foi controlado e nunca ultrapassou os 8,5, valor no qual o fósforo precipita. Os autores também não excluíram a hipótese da remoção de fósforo por adsorção às paredes das microalgas e às paredes do reator.

## 2.7 Cultura de microalgas em meios com metais pesados

Efluentes industriais são tratados nas próprias instalações e posteriormente encaminhados para as condutas de tratamento de efluentes domésticos. Assim, se a descarga de efluentes com elevada quantidade de metais for efetuada sem tratamento prévio, as elevadas concentrações podem afetar o tratamento biológico das ETARs, diminuindo a eficácia do tratamento. Desta forma, o crescimento das microalgas em meios com metais pesados deve ser avaliado e alguns estudos já foram desenvolvidos nesse sentido.

Chong *et al.* (2000) estudaram a remoção de Ni e Zn por 11 espécies de microalgas. A experiência decorreu em tubos de digestão de 150 mL contendo a solução de metal. Duas soluções foram utilizadas: (i) a primeira contendo 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ni; e (ii) uma mistura contendo 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn e 30  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ni. O pH variou entre 6,0 e 7,9 e cada amostra foi inoculada com uma concentração celular de  $5 \times 10^8$  células·mL<sup>-1</sup>. A microalga que conseguiu obter o melhor resultado na remoção de Ni e Zn foi a *Scenedesmus quadricauda* 43, com uma percentagem de remoção de 99,0% e 99,3%, respetivamente. A segunda espécie mais eficiente foi a *Chlorella miniata* com uma remoção de Ni de 70,0% e de Zn de 98,3%. A *C. vulgaris* obteve uma remoção bastante elevada de Zn com uma percentagem de 96,7%, sendo a remoção de Ni cerca de 56,7%.

Estes resultados podem-se traduzir em termos da quantidade de metal absorvida na biomassa. Desta forma, a *C. vulgaris* absorveu 0,18 mg Ni·g<sub>b</sub><sup>-1</sup> e 0,28 mg Zn·g<sub>b</sub><sup>-1</sup>.

Travieso *et al.* (1999) estudaram o crescimento das microalgas *Scenedesmus acutus* e *C. vulgaris* na presença de três metais (Cd, Zn e Cr). Ambas as microalgas foram estudadas em culturas em suspensão e a *C. vulgaris* foi também estudada em cultura imobilizada (em matriz de Kappa-carrageenan e espuma de poliuretano). No caso das microalgas em suspensão, a *C. vulgaris* apresentou um crescimento até uma concentração de zinco até 600 mg·L<sup>-1</sup>, obtendo uma taxa de crescimento mais elevada para uma concentração de 200 mg Zn·L<sup>-1</sup>. A *S. acutus* não tolerou concentrações elevadas (> 100 mg Zn·L<sup>-1</sup>), no entanto obteve uma taxa de crescimento de 0,0142 h<sup>-1</sup> para uma concentração de 50 mg·L<sup>-1</sup>, onde na amostra de controlo a taxa de crescimento foi de 0,0124 h<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos com as culturas na presença de Cd demonstram que concentrações superiores a 2 mg·L<sup>-1</sup> não são toleradas para ambas as microalgas, onde o crescimento mais elevado foi verificado para uma concentração de 1 mg·L<sup>-1</sup>. No caso do Cr, a *C. vulgaris* tolerou concentrações até 45 mg·L<sup>-1</sup>, obtendo um melhor resultado em termos de crescimento para uma concentração de 36 mg·L<sup>-1</sup>. A tolerância da *S. acutus* não excedeu os 15 mg·L<sup>-1</sup>, onde o melhor crescimento foi obtido para uma concentração de 5 mg·L<sup>-1</sup>.

Tabela 4: Cultura de microalga em meios com metais pesados.

Metal pesado	Espécie e condições	Operação	Eficiência de remoção	Ref.
Cd, Zn e Cr	<i>S. acutus</i> e <i>C. vulgaris</i> : cultura imobilizada	Imobilização em matriz de Kappa-carrageenan (KP) e espuma de poliuretano (EP); V = 1L; T = 25 °C ± 3 °C; LI = 27 μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ; t <sub>KP</sub> = 18 h; t <sub>EP</sub> = 72 h.	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , e Cr(VI) foi 66%, 85% e 48%, respetivamente no caso de KP Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , e Cr(VI) foi 57%, 78% e 34%, respetivamente no caso de EP	Travieso <i>et al.</i> (1999)
Cu, Cd e Cr	<i>S. incrassatulus</i>	Frascos cónicos; V = 2 L; T = 25°C; Modo contínuo	Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> e Cr(VI) foi 43,9%, 65,7% e 78,2%, respetivamente	Pena-Castro <i>et al.</i> (2004)
Cu e Zn	<i>C. vulgaris</i> e <i>S. maxima</i>	Frascos cónicos; V = 0,25 L; Efluente municipal (bruto – B - e tratado -T)	<i>C. vulgaris</i> removeu 76,5% (B) e 81,9% (T) de Cu <sup>2+</sup> e 2,9% (B) e 96,3% (T) de Zn <sup>2+</sup> <i>S. maxima</i> removeu 81,7% (B) e 76,9% (T) de Cu <sup>2+</sup> e 94,9% (T) de Zn <sup>2+</sup>	Chan <i>et al.</i> (2013)

NOTA: I = Intensidade luminosa; Ref. = Referência; T=Temperatura; t=Tempo; V=Volume.

Pena-Castro *et al.* (2004) avaliaram a remoção de três metais (Cr, Cd e Cu) pela microalga *Scenedesmus incrassatulus*. O ensaio foi efetuado em regime contínuo com duração aproximada de 15 dias, onde as condições experimentais foram controladas. Os autores testaram o efeito individual e o efeito da mistura de dois ou três metais (Cu+Cd; Cu+Cr; Cd+Cr; Cd+Cr+Cu), onde em cada ensaio as concentrações iniciais de Cu, Cd e Cr eram, respectivamente, 4,15, 3,50 e 1,20 mg·L<sup>-1</sup>. Obtiveram-se melhores taxas de remoção para os ensaios com mistura de dois metais do que os ensaios individuais. A melhor remoção de cobre foi obtida na mistura (Cu+Cr) com uma percentagem de 43,9%. Relativamente a Cd e a Cr, o ensaio da mistura (Cd+Cr) foi mais benéfico para ambos os casos, obtendo-se remoções de 65,7% e 78,2%, respectivamente. A Tabela 4 apresenta resumida as condições de alguns dos estudos que testaram o efeito dos metais no crescimento de microalgas.

A capacidade das microalgas removerem os metais pesados já foi comprovada com os estudos existentes, contudo para o tratamento de águas residuais existe a necessidade de um estudo mais aprofundado. Estudos sobre a remoção de nutrientes, como o azoto e o fósforo, na presença de metais pesados são quase inexistentes. O presente estudo vem preencher essa lacuna no conhecimento sobre o efeito que os metais pesados têm nas microalgas quando se pretende remover azoto e fósforo.



## 3. Materiais e métodos

### 3.1 Instalação experimental

As culturas foram inoculadas em duplicado sem recurso a técnicas assépticas e em frascos de borossilicato com volume operacional de 500 mL. O cultivo de cada ensaio durou 7 d e decorreu numa instalação pré-concebida para o efeito (Figura 11). A instalação possui integrada uma fonte luminosa composta por quatro lâmpadas fluorescentes de 18 W, dispostas a cerca de 25 cm da superfície líquida dos frascos. As culturas estavam sujeitas a uma intensidade luminosa de cerca de  $71,73 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , determinada através de um medidor de luz (HD 2102.2, Delta OHM, Itália), e um fotoperíodo 24:0 (luz contínua). A temperatura de cultivo foi a temperatura ambiente do laboratório, sendo este parâmetro monitorizado diariamente. De modo a evitar a sedimentação das microalgas, a mistura das culturas é garantida através da injeção contínua de ar atmosférico com caudal aproximado de  $90 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  promovido por bombas de ar Trixie AP 180 (Trixie, Tarp, Alemanha). A perda de água por evaporação foi controlada por marcação do nível superficial e restituído diariamente.

### 3.2 Microalgas e meio de cultura

A microalga utilizada neste estudo foi a *C. vulgaris*, visto ser amplamente estudada na remoção de nutrientes e demonstrar uma boa eficiência na remoção de metais de águas (Safi *et al.*, 2014). A estirpe alvo de estudo foi obtida a partir da *Culture Collection of Algae and Protozoa* do Reino Unido. A microalga foi cultivada em meio de cultura teste da OCDE modificado, com a seguinte composição ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ): 119  $\text{KNO}_3$ ; 12  $\text{MgCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 18  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 15  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,08  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,185  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,415  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,003  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,0015  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,00001  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,007  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 100  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .



Figura 11: Instalação experimental usada para o crescimento das microalgas.

Ao longo do trabalho experimental foram realizados cinco ensaios. Nos três primeiros ensaios (I, II e III) o efeito isolado de cada metal (Ni, Cd and Zn, respetivamente) foi avaliado. Nestes ensaios, as culturas (em duplicado) possuíam uma concentração do metal em estudo correspondente a 1, 2 e 3 mg·L<sup>-1</sup>. No ensaio IV, as culturas de microalgas foram testadas numa mistura dos três metais com igual concentração molar (30 μmol L<sup>-1</sup>), correspondendo a concentrações mássicas de, aproximadamente, 2 mg·L<sup>-1</sup> de Ni, 3 mg·L<sup>-1</sup> de Cd e 2 mg·L<sup>-1</sup> de Zn. O último ensaio (V) testou o cultivo semi-*batch* (a cultura era alimentada com meio fresco com uma frequência equivalente a dois dias) com a mesma concentração de metais do ensaio anterior. Neste último ensaio, para além das recolhas diária das amostras, foi efetuada uma recolha imediatamente após a adição do meio.

### 3.3 Métodos analíticos

A temperatura, o pH e a densidade ótica foram monitorizadas diariamente. O pH e a temperatura foram medidas com recurso a um medidor de pH (Hi 8424, Hanna Instruments, Itália) e a densidade ótica a 440 nm (DO<sub>440</sub>) foi medida através de um espectrofotómetro (Spectroquant Pharo 100, Merck, Darmstadt, Germany). A quantidade de biomassa (em peso seco) foi determinada indiretamente através da preparação de uma reta de calibração em ordem à DO<sub>440</sub>. O procedimento, a equação obtida, a gama de aplicabilidade e o coeficiente de determinação encontram-se apresentados no Anexo A-I.

A recolha das amostras foi efetuada diariamente, sendo estas submetidas a centrifugação, com recurso a uma centrifugadora (Herarus Labofuge 200, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), durante 15 minutos a uma velocidade de rotação de 4000 rpm (Figura 12). Posteriormente, as amostras foram filtradas individualmente através de filtros de seringa com membrana filtrante de acetato de celulose de 0,45 μm (Specanalitica, Portugal).

Para análise da concentração dos metais, após filtração, as amostras foram acidificadas com uma gota de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 65%, e devidamente conservadas no frigorífico. Estas amostras foram analisadas por espectroscopia absorção atómica (AAS) por chama (932 plus, GBC Scientific Equipment Ltd., Melbourne, Austrália) no fim de cada ensaio. As retas de calibração utilizadas para a determinação da concentração de cada metal, a gama de aplicabilidade e o coeficiente de correlação são apresentadas no Tabela A-II.

Relativamente à concentração de nitratos e fosfatos, estas foram apenas determinadas no início e no fim de cada ensaio. Após filtração, a análise da concentração dos iões NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> foi efetuada com recurso aos testes colorimétricos: *Spectroquant Nitrate test 1.09713.0002* da Merck e *Spectroquant Phosphate cell test 1.14543.0001* da Merck, respetivamente. Em seguida, a leitura foi realizada no espectrofotómetro (Prove 300, Merck, Darmstadt, Germany).

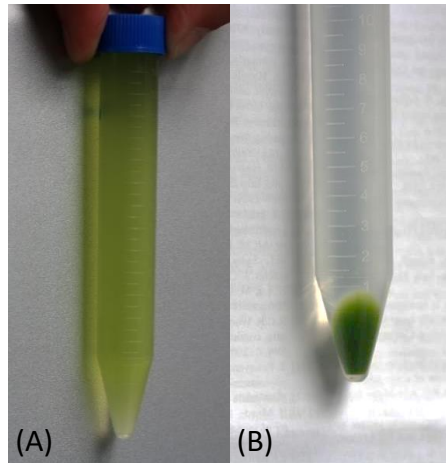


Figura 12: Imagem de uma amostra recolhida antes (A) e após (B) centrifugação.

Na técnica de espectroscopia de absorção atômica por chama, a amostra é aspirada para o nebulizador, que transforma o líquido num aerossol. De seguida, o aerossol é arrastado até ao queimador, onde a chama transforma os iões e moléculas em átomos no estado fundamental. A chama utilizada para a leitura do Zn, Ni e Cd foi uma mistura de ar/acetileno numa proporção relativamente elevada de comburente em relação ao combustível (5/1, chama oxidante). Os átomos no estado fundamental absorvem a radiação de um comprimento de onda característico emitida pela fonte de radiação. Posteriormente, a radiação recebida pelo sistema de deteção regista o sinal obtido em absorvância em que utilizando retas de calibração obtém-se a concentração do elemento a ser analisado.

### 3.4 Parâmetros e modelos cinéticos

A partir dos diferentes valores de concentração de biomassa ( $X$ ) ao longo do tempo do tempo, determinou-se a taxa específica de crescimento ( $\mu$ , expressas em  $d^{-1}$ ) e as produtividades de biomassa ( $P_x$ , em  $g \cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$ ). As taxas específicas de crescimento foram determinadas a partir de uma cinética de 1ª ordem relativamente ao tempo (Equação 1). Com a representação gráfica de  $\ln(X)$  em função do tempo ( $t$ , em d), determinou-se a taxa específica de crescimento com o conjunto de pontos relativos à fase exponencial de crescimento das microalgas:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Leftrightarrow \mu = \frac{\ln(X_i/X_0)}{t_i - t_0} \quad (1)$$

onde  $X_i$  e  $X_0$  são a concentração de biomassa ( $g \cdot L^{-1}$ ) nos instantes  $t_i$  e  $t_0$ , o fim e início da fase de crescimento exponencial, respetivamente.

As produtividades de biomassa foram determinadas para cada par de pontos experimentais consecutivos, através da Equação 2. De forma a comparar com estudos semelhantes, determinaram-se os valores da produtividade máxima ( $P_{x,max}$ ) e da produtividade média ( $P_{x,med}$ ). A produtividade máxima corresponde ao valor máximo do conjunto de valores de  $P_x$ . A

produtividade média corresponde à razão entre toda a biomassa produzida e o tempo de ensaio decorrido.

$$P_x = \frac{X_{i+1} - X_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (2)$$

Relativamente à concentração de nutrientes ( $S$ , em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), o tratamento dos dados é baseado na determinação da eficiência de remoção ( $ER$ , %) de cada ensaio e das taxas de remoção média ( $TR$ , expressa em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) através das Equações 3 e 4, respetivamente:

$$ER = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$TR = \frac{S_0 - S_f}{t_f - t_0} \quad (4)$$

onde,  $S_0$  é a concentração de um dado nutriente no instante inicial  $t_0$  e  $S_f$  é a concentração do mesmo nutriente no instante final  $t_f$ . Este cálculo pode ser aplicado à remoção de azoto e fósforo, mas também à remoção dos metais presentes em solução.

Através da produtividade média e da taxa de remoção de nutrientes, os rendimentos específicos de biomassa ( $Y_{X/S}$ , em  $\text{g}_b\cdot\text{g}_S^{-1}$ ) podem ser determinados através da Equação 5. Estes determinam a quantidade de biomassa formada por massa de substrato consumido.

$$Y_{X/S} = \frac{P_{x,med}}{TR} \quad (5)$$

De forma a avaliar o efeito inibitório do crescimento da microalga devido à presença de metais, determinou-se a percentagem de inibição ao crescimento  $I_\mu$  (expresso em %) através da Equação 6.

$$I_\mu = \frac{\mu_C - \mu_E}{\mu_C} \times 100 \quad (6)$$

sendo  $\mu_C$  representa a taxa específica de crescimento do controlo e  $\mu_E$  a taxa específica do respetivo ensaio.

Em relação à remoção de metais, as cinéticas de adsorção e de equilíbrio envolvem o cálculo da quantidade de metal adsorvido na biomassa ( $q$ , expresso em  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), obtido através da Equação 7.

$$q = \frac{C_0 - C_i}{X_i} \quad (7)$$

sendo  $C_0$  e  $C_i$  a concentração do metal no inicial e no instante  $i$  ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e  $X$  a concentração de biomassa.

Neste trabalho, o estudo da cinética de remoção dos metais foi efetuado ajustando-se os pontos experimentais a dois modelos: o modelo cinético de pseudo-primeira ordem e o modelo cinético de pseudo-segunda ordem. Ambos os modelos são bastante utilizados no estudo da adsorção de metais pesados (Febrianto *et al.*, 2009). O modelo cinético de pseudo-primeira ordem é geralmente expresso através da Equação 8:

$$\frac{dq}{dt} = k_{1,ads}(q_e - q) \quad (8)$$

sendo  $k_{1,ads}$  a constante cinética do modelo de pseudo-primeira ordem (em  $\text{h}^{-1}$ ) e  $q_e$  a quantidade de metal adsorvido no equilíbrio ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). A integração da Equação 8 pode ser escrita na forma linearizada (Equação 9).

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_{1,ads}t \quad (9)$$

A reta obtida pela representação gráfica de  $\ln(q_e - q_t)$  em função de  $t$  permite determinar os valores das constantes do modelo de pseudo-primeira ordem.

O modelo cinético de pseudo-segunda ordem é expresso através da Equação 10.

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q)^2 \quad (10)$$

onde  $k_2$  é a constante cinética de pseudo-segunda ordem (em  $\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). A linearização da integração da Equação 10 resulta em:

$$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{q_e} + \left(\frac{1}{k_2 q_e^2}\right) \frac{1}{t} \quad (11)$$

A reta obtida com a representação gráfica de  $1/q_t$  em função de  $1/t$  permite determinar os parâmetros da cinética de pseudo-segunda ordem. A avaliação do melhor modelo cinético é efetuada pela análise do valor obtido de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), sendo que o melhor modelo corresponde ao valor mais elevado.

Com base nos dados obtidos experimentalmente, verificou-se que no ensaio I (Ni) para uma concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , o metal não foi imediatamente adsorvido. O Modelo de Gompertz modificado (Equação 12) admite a existência de um tempo de atraso na cinética, sendo este aplicado para descrever a cinética de adsorção do metal na experiência em questão.

$$q = ae^{-e^{-k(t-\lambda)}} \quad (12)$$

sendo,  $k$  a constante cinética de adsorção (em  $\text{h}^{-1}$ ) e  $\lambda$  o tempo de atraso (em h).

Os modelos de equilíbrio da concentração de metal na solução e a concentração na biomassa são geralmente descritos pelas isotérmicas de Langmuir e de Freundlich. A isotérmica de Langmuir (Equação 13) é baseada na suposição que a adsorção não acontece para além da mono-camada e que todos os espaços da superfície do adsorvente são equivalentes e a superfície é perfeitamente uniforme. Assume também que não existe interações entre as moléculas adsorvidas adjacentes.

$$q_e = q_m \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (13)$$

onde,  $C_e$  representação do metal no equilíbrio. A Equação 13 também pode ser expressa sob a sua forma linear através da Equação 14:

$$\frac{1}{q_e} = \left( \frac{1}{q_m K_L} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (14)$$

onde  $q_m$  representa a capacidade máxima de adsorção ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e  $K_L$  é a constante da isotérmica de Langmuir ( $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). A representação gráfica de  $1/q_e$  em função de  $1/C_e$  irá resultar numa reta com declive  $1/(q_m K_L)$  e interceptar o eixo do  $yy$  no ponto  $1/q_m$ .

Em relação à isotérmica de Freundlich, esta é baseada na adsorção numa superfície heterogénea, sendo representada pela seguinte forma:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (15)$$

em que, expressa na forma linearizada resulta na Equação 16:

$$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log(C_e) \quad (16)$$

sendo  $K_F$  e  $1/n$  constantes da isotérmica de Freundlich relacionadas com a capacidade de adsorção e a intensidade de adsorção, respetivamente. Estas constantes são determinadas pela representação gráfica de  $\log q_e$  em função de  $\log C_e$ .

Todas as constantes relevantes foram determinadas pelo ajuste dos modelos referidos aos pontos experimentais utilizando o *software* OriginPro 8.5 (OriginLab, Northampton, MA).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Temperatura e pH

A monitorização diária da temperatura e do pH permitiu calcular os valores médios e determinar se o cultivo decorreu em condições favoráveis ao crescimento. A Tabela 5 apresenta os valores médios das condições observadas durante os ensaios. Relativamente à temperatura, os valores médios estão em concordância com gama de temperaturas que se considera como aceitável para a maioria das espécies de microalgas: 16 a 27 °C. No caso da *C. vulgaris*, Converti *et al.* (2009) estudaram o efeito da temperatura no crescimento da mesma. Os autores testaram diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 38 °C) e concluíram que o crescimento apenas é afetado negativamente para temperaturas superiores a 30 °C. Portanto, a gama de temperaturas medidas neste trabalho encontram-se dentro do intervalo considerado aceitável para o crescimento desta espécie.

Em relação ao pH, os valores médios registados variam entre 6,6 e 7,6. Este intervalo está em concordância com a gama apresentada por Barsanti e Gualtieri (2014) (7-9). No entanto, Gong *et al.* (2014) avaliaram o efeito do pH no crescimento da *C. vulgaris*. O intervalo de pH testado variou entre 7 e 10. Os autores concluíram que o crescimento mais elevado foi obtido para um pH de 10. Contudo, sendo um objetivo do presente trabalho avaliar o efeito dos metais no crescimento e na remoção de azoto e fósforo, um valor tão elevado de pH não poderia ser utilizado. A pH elevado, os iões metálicos precipitam em forma de hidróxidos devido à elevada concentração do ião hidroxilo (OH<sup>-</sup>). Na forma precipitada, o metal não está disponível para adsorção, visto que a microalga apenas consegue adsorver os metais na forma iónica devido à sua superfície negativa.

Tabela 5: Valores de temperatura e pH registados nos ensaios.

Ensaio	T <sub>med</sub> ± σ (°C)	T <sub>min</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)	pH <sub>med</sub> ± σ	pH <sub>min</sub>	pH <sub>máx</sub>
I (Ni)	18 ± 2	15,2	21,3	7,3 ± 0,3	7,02	7,83
II (Cd)	20 ± 3	16,0	24,2	6,6 ± 0,3	6,09	7,59
III (Zn)	20 ± 1	18,3	21,7	7,6 ± 0,2	7,00	7,95
IV (Mistura – B)	22 ± 3	18,8	29,1	7,5 ± 0,3	7,00	7,92
V (Mistura – SB)	22 ± 3	17,9	25,7	7,5 ± 0,3	7,01	7,89

NOTA: B = Batch; σ = Desvio-padrão; SB = Semi-Batch; T = Temperatura.

## 4.2 Efeito isolados dos metais

### 4.2.1 Crescimento de biomassa

A medição contínua da concentração de biomassa ao longo do tempo de ensaio permite determinar um conjunto de parâmetros que auxiliam a caracterização do crescimento das microalgas e que permitem a comparação com estudos similares da literatura. Com os resultados obtidos é possível determinar o ensaio em se verifica maior crescimento e maior produtividade e também verificar se as diferentes concentrações dos metais podem ter influência no crescimento. Para tal e de forma a proceder a uma análise clara do crescimento verificado em todos os ensaios, a Tabela 6 apresenta um resumo de todos os parâmetros calculados a partir dos dados relativos ao crescimento da cultura.

No que diz respeito às concentrações de biomassa máximas obtidas, nos ensaios sem adição de metais os valores variam entre 0,607 e 0,934 g·L<sup>-1</sup> enquanto que na presença dos metais os valores variam entre 0,171 e 0,554 g·L<sup>-1</sup>. Com base em estudos prévios onde se testaram diferentes condições de cultura, constata-se que os resultados obtidos nos ensaios sem adição de metais enquadram-se dentro da gama reportada na literatura (0,622 a 2,30 g·L<sup>-1</sup>) (Chang *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015). O controlo do ensaio III (Zn) apesar de ter obtido um valor inferior à gama, este é muito próximo, sendo considerado dentro do expectável.

Em comparação dos ensaios com e sem metal, verifica-se que a gama obtida nos ensaios com metais é bastante inferior à gama obtida nos ensaios sem metais. Desta forma, supõe-se que a presença dos metais tem um efeito negativo no crescimento da biomassa. Comparando o efeito

Tabela 6: Parâmetros de análise do crescimento das microalgas para os diferentes ensaios.

Ensaio	[M] (mg·L <sup>-1</sup> )	X <sub>i</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>max</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	P <sub>x,max</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	μ ± t <sub>α/2</sub> *σ (d <sup>-1</sup> )	I <sub>μ</sub> (%)
I (Ni)	Controlo	0,101	0,695	202	0,5 ± 0,2	-
	1	0,153	0,276	26,2	0,06 ± 0,01	88,0
	2	0,152	0,175	9,48	0,02 ± 0,01	96,0
	3	0,161	0,171	6,01	0,03 ± 0,01	94,0
II (Cd)	Controlo	0,0938	0,934	183	0,46 ± 0,08	-
	1	0,0950	0,533	98,1	0,34 ± 0,02	26,1
	2	0,0970	0,282	54,4	0,22 ± 0,05	52,2
	3	0,0965	0,204	26,7	0,14 ± 0,05	69,6
III (Zn)	Controlo	0,0983	0,607	127	0,43 ± 0,07	-
	1	0,0990	0,554	95,8	0,34 ± 0,09	20,9
	2	0,106	0,376	69,4	0,25 ± 0,03	41,9
	3	0,111	0,396	52,6	0,220 ± 0,008	48,8

NOTA: [M] = Concentração de metal; X<sub>i</sub> = Concentração inicial de biomassa; X<sub>max</sub> = Concentração máxima de biomassa obtida; σ = Desvio-padrão; I<sub>μ</sub> = Percentagem de inibição da taxa específica de crescimento; P<sub>x,max</sub> = Produtividade máxima obtida; μ = Taxa específica de crescimento; t<sub>α/2</sub> = Valor de t-student com 90% de significância.

dos metais, a concentração máxima de biomassa ( $0,554 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) obtida corresponde à concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do ensaio III (Zn), apresentando menor percentagem de inibição da microalga. Para a mesma concentração, no ensaio II (Cd) a concentração de biomassa máxima obtida foi de  $0,533 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , apresentando este metal percentagens de inibição semelhantes às observadas para o Zn. A concentração de biomassa mínima obtida ( $0,171 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi verificada para a concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do ensaio I (Ni), sendo observado neste ensaio, as maiores percentagens de inibição da microalga. Assim, o aumento da concentração de metal provocou a diminuição da concentração da biomassa, indicando um possível efeito inibitório por parte dos metais.

A determinação da taxa de crescimento na fase exponencial permite identificar em que condições a cultura obteve uma velocidade de crescimento superior. As taxas específicas de crescimento obtidas nos ensaios sem metal variam entre  $0,43$  e  $0,5 \text{ d}^{-1}$  e nas culturas com metais variam entre  $0,02$  e  $0,34 \text{ d}^{-1}$ . Estes valores encontram-se, novamente, abaixo da gama reportada pela literatura ( $0,550$ - $1,872 \text{ d}^{-1}$ ) (Chang *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015), sendo este outro indício que as condições de cultivo do presente trabalho são, de alguma forma, inibitórias para o crescimento exponencial de *C. vulgaris*. Quanto à espécie de metal, verifica-se que a cultura do ensaio III (Zn) evidenciou um crescimento mais elevado em todas as concentrações testadas. Contudo, no ensaio II (Cd) as taxas de crescimento foram similares, concluindo que Zn e Cd têm um efeito semelhante no crescimento da microalga *C. vulgaris*. O crescimento mais elevado na cultura com Zn pode ser justificado com o facto de este ser um micronutriente essencial ao crescimento das microalgas, estando também presente no meio de cultura. Desta forma, para o mesmo efeito inibitório, a concentração de Zn deverá ser superior em relação aos outros metais testados.

De forma a sustentar esta teoria, procedeu-se à interpretação dos resultados obtidos no cálculo da produtividade de biomassa. A Tabela 6 apresenta os valores de produtividade máxima que permitem avaliar a eficiência do crescimento. As produtividades obtidas variam entre  $6,01$  a  $98,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  para os ensaios com metais e encontram-se dentro do intervalo  $16$ - $373 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  determinado por outros estudos que utilizam a espécie *C. vulgaris* (Griffiths *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Apesar do valor mínimo obtido estar abaixo do intervalo referido na literatura, este resultado apenas ocorreu no ensaio I (Ni) para as concentrações de  $2$  e  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pode concluir-se que o Ni tem um efeito negativo mais pronunciado no crescimento e, consequentemente, na produtividade em biomassa. Em relação ao valor máximo obtido, este foi verificado para a concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  no ensaio II (Cd). O ensaio III (Zn) com a concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  obteve um valor de produtividade de biomassa semelhante ( $95,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), como seria de esperar tendo em conta o valor de taxa específica de crescimento. Assim,

pode afirmar-se que na presença de Zn a *C. vulgaris* apresenta maior potencial para a produção de biomassa.

De forma a confirmar as hipóteses formuladas, determinou-se a percentagem de inibição. Constata-se, como já referido anteriormente, que Ni tem um efeito inibitório bastante elevado, causando uma percentagem de inibição entre 88,0 e 96,0%. A percentagem de inibição do Cd variou entre 26,1 e 69,6% e a do Zn variou entre 20,9 e 48,8%. O efeito de ambos pode ser considerado semelhante, visto que apenas existe uma variação mais significativa para concentrações superiores a 2 mg·L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Remoção de metais e nutrientes

Os resultados obtidos nos cálculos da eficiência de remoção, da taxa de remoção e dos rendimentos específicos de biomassa apresentam-se na Tabela 7. Em relação à remoção de azoto, os cálculos foram efetuados tendo por base a concentração de nitratos no meio. As eficiências de remoção variam entre 37 e 91% e as taxas de remoção variaram entre 0,406 a 4,89 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. As elevadas taxas de remoção no ensaio II (Cd) foram causadas pela maior concentração inicial de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio. Outros estudos reportam eficiências de remoção do azoto dentro do intervalo de 42,3 a 100% e, taxas de remoção que variam entre 1,08 e 4,22 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (Gonçalves, 2017; Silva *et al.*, 2015). Verifica-se que apenas no ensaio I (Ni), a remoção de azoto foi afetada para concentrações de Ni superiores a 2 mg·L<sup>-1</sup>. Os rendimentos específicos de biomassa obtidos (3,2-74 g<sub>b</sub>·g<sub>N</sub><sup>-1</sup>) encontram-se dentro da gama de 4,1-75,2 g<sub>b</sub>·g<sub>N</sub><sup>-1</sup> reportada na literatura (Pereira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015).

Por último, a remoção de fósforo foi baseada na remoção de fosfatos do meio. As eficiências de remoção obtidas (0 a 98,7%) encontram-se dentro do intervalo de 16,9 a 100% reportado por estudos que determinam a remoção de fósforo pela *C. vulgaris* (Gonçalves, 2017; Pereira *et al.*, 2016). O ensaio I (Ni), para uma concentração de 3 mg·L<sup>-1</sup> o fósforo não foi removido da cultura, visto que não se observou um crescimento significativo da cultura. As taxas de remoção obtidas variam entre 0,0576 a 0,544 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. Os mesmos estudos reportam uma gama que varia de 0,149 a 1,7 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, concluindo que apenas o ensaio referido anteriormente se encontra fora desta gama de valores (Gonçalves, 2017; Pereira *et al.*, 2016). Os resultados obtidos do rendimento específico de biomassa (53-211 g<sub>b</sub>·g<sub>P</sub><sup>-1</sup>) enquadram-se dentro da gama reportado por Pereira *et al.* (2016) (20- 230 g<sub>b</sub>·g<sub>P</sub><sup>-1</sup>). Verifica-se que a remoção de fósforo foi afetada pela presença de concentrações de Ni superiores a 1 mg·L<sup>-1</sup>. Esta observação permite afirmar que o Ni tem um efeito inibitório mais acentuado no crescimento da microalga e conseqüentemente na remoção de nutrientes. Em relação ao ensaio II (Cd), apenas concentrações superiores a 2 mg·L<sup>-1</sup> afeta a remoção de fósforo. No caso do ensaio III (Zn), concentrações superiores a 1 mg·L<sup>-1</sup> provoca um efeito acentuado na remoção.

Tabela 7: Parâmetros referentes à remoção de metais, de azoto e de fósforo nos diferentes ensaios.

Ensaio	[M] (mg·L <sup>-1</sup> )	ER <sub>N-NO3</sub> (%)	TR <sub>N</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/N</sub> (g <sub>b</sub> ·g <sub>N</sub> <sup>-1</sup> )	ER <sub>P-PO4</sub> (%)	TR <sub>P</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/P</sub> (g <sub>b</sub> ·g <sub>P</sub> <sup>-1</sup> )
I (Ni)	Controlo	63,7	0,699	119	94,7	0,478	174
	1	61,2	0,671	25,7	33,4	0,169	102
	2	59,3	0,650	4,95	11,4	0,0576	55,9
	3	37,0	0,406	3,22	0,00	0,000	n.a.
II (Cd)	Controlo	81,2	4,21	28,7	83,2	0,445	272
	1	90,6	4,89	12,9	98,7	0,544	116
	2	84,5	4,45	5,98	94,0	0,500	53,3
	3	73,3	4,60	3,36	30,0	0,168	92,2
III (Zn)	Controlo	74,3	0,834	87,2	93,3	0,482	151
	1	78,4	0,881	73,9	93,1	0,481	119
	2	81,5	0,915	42,2	50,4	0,260	131
	3	83,2	0,934	43,6	37,3	0,193	187

NOTA: [M] = Concentração de metal; ER = Eficiência de remoção; n.a. = Não aplicável; Y = Rendimento específico de biomassa; TR = Taxa de remoção.

#### 4.2.3 Modelos de equilíbrio e cinéticos de adsorção

A Tabela 8 apresenta os valores das constantes de sorção estimadas a partir das isotérmicas de Langmuir e Freundlich, bem como os coeficientes de regressão linear relacionados. Ao analisar os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), conclui-se que a isotérmica de Langmuir descreveu os dados de equilíbrio dos ensaios I (Ni) e II (Cd), enquanto a isotérmica de Freundlich descreveu melhor os dados de equilíbrio para o ensaio III (Zn).

Para baixas concentrações dos metais em solução ( $K_L C_e \ll 1$ ), o modelo de equilíbrio de Langmuir aproxima-se à equação de uma reta com declive  $q_m \cdot K_L$ . Assim a eficácia do adsorvente é tanto maior quanto mais elevado for o valor do produto entre  $q_m$  e  $K_L$ . Desta forma, o resultado do produto do ensaio I (Ni) é  $3,2 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$  do ensaio II (Cd) é  $9 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$  e do ensaio III (Zn) é  $12 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ . Desta forma, considera-se que a *C. vulgaris* é um bom bioadsorvente para Zn e para o Cd.

Em relação ao modelo de Freundlich, este foi analisado de acordo com o significado físico das suas constantes. O valor de  $n$  reflete o grau de heterogeneidade da superfície e quanto mais elevado for o seu valor, mais favorável é a isotérmica. O  $K_F$  reflete a capacidade de adsorção e,

Tabela 8: Comparação dos parâmetros de Langmuir e Freundlich para os diferentes ensaios.

Ensaio	T (°C)	Langmuir			Freundlich		
		$q_m \pm t_{\alpha/2} \cdot \sigma$ (mg·g <sup>-1</sup> )	$K_L \pm t_{\alpha/2} \cdot \sigma$ (L·mg <sup>-1</sup> )	$R^2$	$n \pm t_{\alpha/2} \cdot \sigma$	$K_F \pm t_{\alpha/2} \cdot \sigma$	$R^2$
I (Ni)	20,9	$1,6 \pm 0,5$	$2 \pm 1$	0,984	n.a	n.a	n.a
II (Cd)	17,4	$15 \pm 4$	$0,6 \pm 0,2$	0,995	$1,4 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,7$	0,966
III (Zn)	18,5	$6 \pm 4$	$2 \pm 2$	0,913	$1,6 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,7$	0,971

NOTA:  $q_m$  = Capacidade máxima de adsorção;  $K_F$  e  $n$  = Constantes de Freundlich;  $K_L$  = Constante de Langmuir;  $\sigma$  = Desvio-padrão; n.a. = Não aplicável; T = Temperatura;  $t_{\alpha/2}$  = Valor de t-student com 90% de significância.

portanto, um valor mais elevado, maior é a capacidade de adsorção. Este modelo não apresentou um bom desempenho no ajuste aos pontos experimentais no ensaio I (Ni), não sendo possível obter parâmetros estatisticamente significativos. Em relação aos valores obtidos para o ensaio II (Cd) e III (Zn), ambos obtiveram bons resultados e a adsorção é favorável pela avaliação do valor de  $n$ . No entanto, como referido anteriormente, no caso do ensaio II (Cd), a isotérmica de Langmuir apresentou melhor desempenho no ajuste aos valores experimentais. A Figura 13 apresenta os ajustes dos modelos de Langmuir e Freundlich aos pontos experimentais.

Após a análise do potencial de adsorção dos metais estudados pela *C. vulgaris*, efetuou-se a comparação com outros bioadsorventes já estudados para o mesmo efeito. Nuhoglu e Malkoc (2009) estudaram a bioadsorção de Ni a resíduos de bagaço de azeitona. O processo de adsorção foi estudado para diferentes temperaturas (25, 45 e 60 °C) e a concentração inicial de Ni variou de 25 a 150 mg·L<sup>-1</sup>. Os modelos de equilíbrio foram determinados para uma dose de adsorvente de 0,25 g. Os autores verificaram que o aumento de temperatura beneficiava o processo de adsorção. Aplicando o modelo de Langmuir, a capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) variou entre 10,64 e 14,80 mg·g<sup>-1</sup>, enquanto a constante de Langmuir ( $K_L$ ) variou entre 0,0475 e 0,0783 L·mg<sup>-1</sup>. Neste estudo, o valor de  $q_m \cdot K_L$  variou entre 0,505 e 1,16 L·g<sup>-1</sup>. Salem e Awwad (2014) estudaram a bioadsorção de Ni a resíduos de cascas de nêspera. Para determinar as isotérmicas

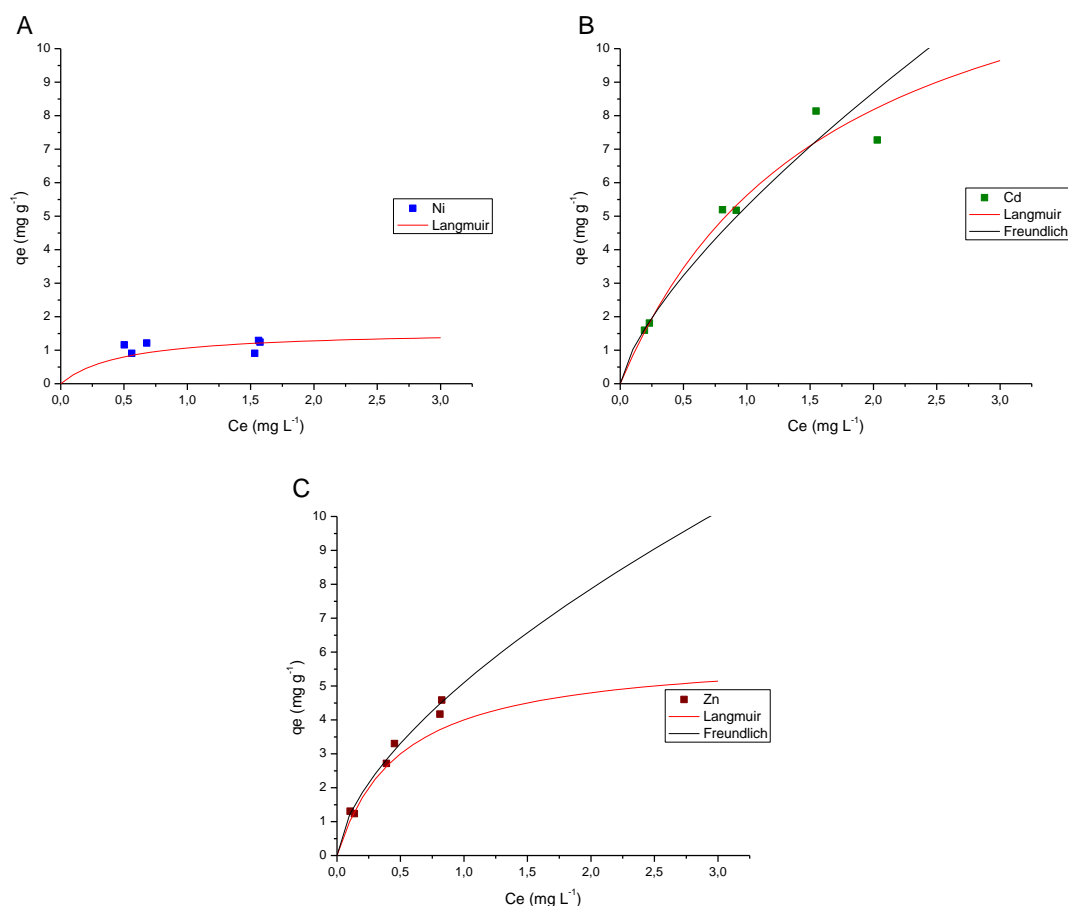


Figura 13: Ajuste dos modelos de equilíbrio (Langmuir e Freundlich) aos pontos experimentais.

a gama de concentração de níquel foi 10-100 mg·L<sup>-1</sup> e a dose de resíduos de casca de nêspira foi de 0,4 g. Os autores testaram diferentes temperaturas (20, 30 e 40 °C) e verificaram que a isotérmica de Langmuir se ajustava melhor aos pontos experimentais. Os autores obtiveram uma capacidade máxima que varia entre 24,775 e 29,543 mg·g<sup>-1</sup> e os valores obtidos de  $K_L$  variam entre 0,024 a 0,038 L·mg<sup>-1</sup>. O  $q_m \cdot K_L$  obtido variou entre 0,595 e 1,12 L·g<sup>-1</sup>, sendo esta gama muito semelhante à gama obtida por Nuhoglu e Malkoc (2009). Desta forma, comparando o ensaio I (Ni) com os resultados reportados pela literatura, verifica-se que a capacidade de adsorção da *C. vulgaris* é superior aos outros bioadsorventes analisados.

Sharma e Bhattacharyya (2005) estudaram a adsorção de Cd ao pó de folhas de nim (*Azadirachta indica*) (PFN). A concentração inicial de adsorvente variou entre 0,4 até 2,0 g·L<sup>-1</sup> e as concentrações iniciais de cádmio variam entre 36,5 até 218,8 mg·L<sup>-1</sup>. Os valores obtidos de  $q_m$  diminuem com o aumento da concentração de bioadsorvente, obtendo um valor médio de 158 mg·g<sup>-1</sup>. Os valores de  $K_L$  aumentam com o aumento da concentração de PFN resultando num valor médio de 0,088 L·mg<sup>-1</sup>. Assim, o valor do produto de  $q_m$  e  $K_L$  é de 13,9 L·g<sup>-1</sup>. Em relação as constantes de Freundlich, os valores médios de  $K_F$  e  $n$  obtidos foram 18,7 e 0,45, respetivamente. Verifica-se que neste caso, como o valor de  $n$  é inferior a 1, a adsorção não é favorável. Saeed *et al.* (2005) analisaram as propriedades de adsorção de Cd na madeira da árvore de papaia. Para determinar as constantes das isotérmicas, foram testadas concentrações de Cd entre 5 e 500 mg·L<sup>-1</sup> e a concentração inicial da madeira de papaia foi de 5 g·L<sup>-1</sup>. Os autores obtiveram um  $q_m$  com o valor de 17,22 e um  $K_L$  de 0,329 L·mg<sup>-1</sup>, onde o produto destes dois valores é de 5,67 L·g<sup>-1</sup>. As constantes de Freundlich obtidas foram 2,24 e 2,56 para  $K_F$  e  $n$ , respetivamente. No entanto, pela análise dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), a isotérmica de Langmuir ( $R^2 = 0,997$ ) ajusta-se melhor que a isotérmica de Freundlich ( $R^2 = 0,958$ ). Comparando os valores referidos pela literatura com os resultados obtidos no ensaio II (Cd), verifica-se que a *C. vulgaris* é melhor bioadsorvente de Cd em relação à madeira da árvore de papaia e pior que o PFN.

Saeed *et al.* (2005) estudaram também a bioadsorção de Zn nas mesmas condições testadas para a adsorção de Cd. O  $q_m$  obtido foi de 13,45 mg·g<sup>-1</sup> e o  $K_L$  foi de 0,031 L·mg<sup>-1</sup>, onde o produto destes valores é 0,417 L·g<sup>-1</sup>. Relativamente às constantes de Freundlich, os valores obtidos para o  $K_F$  e  $n$  são 1,33 e 1,84, respetivamente. Bhatti *et al.* (2007) estudaram o equilíbrio de adsorção de Zn à biomassa da árvore de acácia-branca. Para determinar as isotérmicas, as concentrações de Zn testadas foram entre 25 e 200 mg·L<sup>-1</sup> e a concentração de biomassa foi de 0,5 mg·L<sup>-1</sup>. Os valores dos parâmetros de Langmuir  $q_m$  e  $K_L$  obtidos foram 52,08 mg·g<sup>-1</sup> e 0,150 L·mg<sup>-1</sup>, respetivamente e o valor de  $q_m \cdot K_L$  corresponde a 7,81 L·g<sup>-1</sup>. Em relação à isotérmica de Freundlich, os valores obtidos para as constantes  $K_F$  e  $n$  foram 0,156 e 8,18, respetivamente.

Tendo em conta a informação obtida pelo produto de  $q_m$  e  $K_L$ , verifica-se a *C. vulgaris* é considerado um bom bioadsorvente de Zn em relação aos bioadsorventes citados.

Quanto aos modelos cinéticos de adsorção apenas o modelo de pseudo-primeira ordem ajustou-se aos pontos experimentais exceto no ensaio I (Ni), na concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , como já referido na Secção 3.4. Neste caso, o modelo ajustado foi o modelo de Gompertz que, para além da constante cinética de adsorção ( $k$ ), é necessário ter em consideração o tempo de atraso ( $\lambda$ ) no processo de adsorção. A variação temporal da concentração do metal na solução, a variação temporal da quantidade adsorvida à biomassa e os respetivos modelos cinéticos estão representados na Figura 14.

As Figuras 14A, 14C e 14E representam a variação da concentração do metal dos ensaios I (Ni), II (Cd) e III (Zn), respetivamente. Pela mesma ordem, a Figura 14B, 14D e 14F apresentam os resultados obtidos da determinação da quantidade de metal adsorvida e os modelos de ajuste. Através da análise da Figura 14 (A, C e E), verifica-se que a concentração do metal em solução sofre uma diminuição mais acentuada nas primeiras 24 h de cultivo. Após este tempo a concentração estabiliza, demonstrando um equilíbrio entre a concentração presente no meio e a concentração adsorvida na microalga. Em termos da espécie de metal, pode-se verificar um decréscimo mais elevado no ensaio III (Zn) (Figura 14E), para uma concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nas primeiras 24 h, a concentração do metal em solução diminui em cerca de 39%. O valor máximo de  $q$  obtido neste ensaio foi cerca de  $7,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . O ensaio I (Ni) foi o ensaio que obteve os piores resultados em termos da diminuição da concentração no meio e conseqüentemente em termos da quantidade adsorvida. Neste caso o  $q_m$  foi cerca de  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . O ensaio em que se verifica os melhores resultados em termos de quantidade adsorvida é no ensaio II (Cd). A quantidade máxima adsorvida neste ensaio foi de cerca de  $9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . Pode-se concluir que a *C. vulgaris* tem elevada afinidade com Cd à sua elevada capacidade de adsorção. Chong *et al.* (2000) avaliou a adsorção de Ni e Zn a microalga *C. vulgaris*. A concentração testada dos dois metais foi de  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . As quantidades adsorvidas de Ni e Zn obtidas são  $0,18 \text{ mg Ni}\cdot\text{g}_b^{-1}$  e  $0,28 \text{ mg Zn}\cdot\text{g}_b^{-1}$ , sendo estes valores inferiores aos obtidos neste estudo.

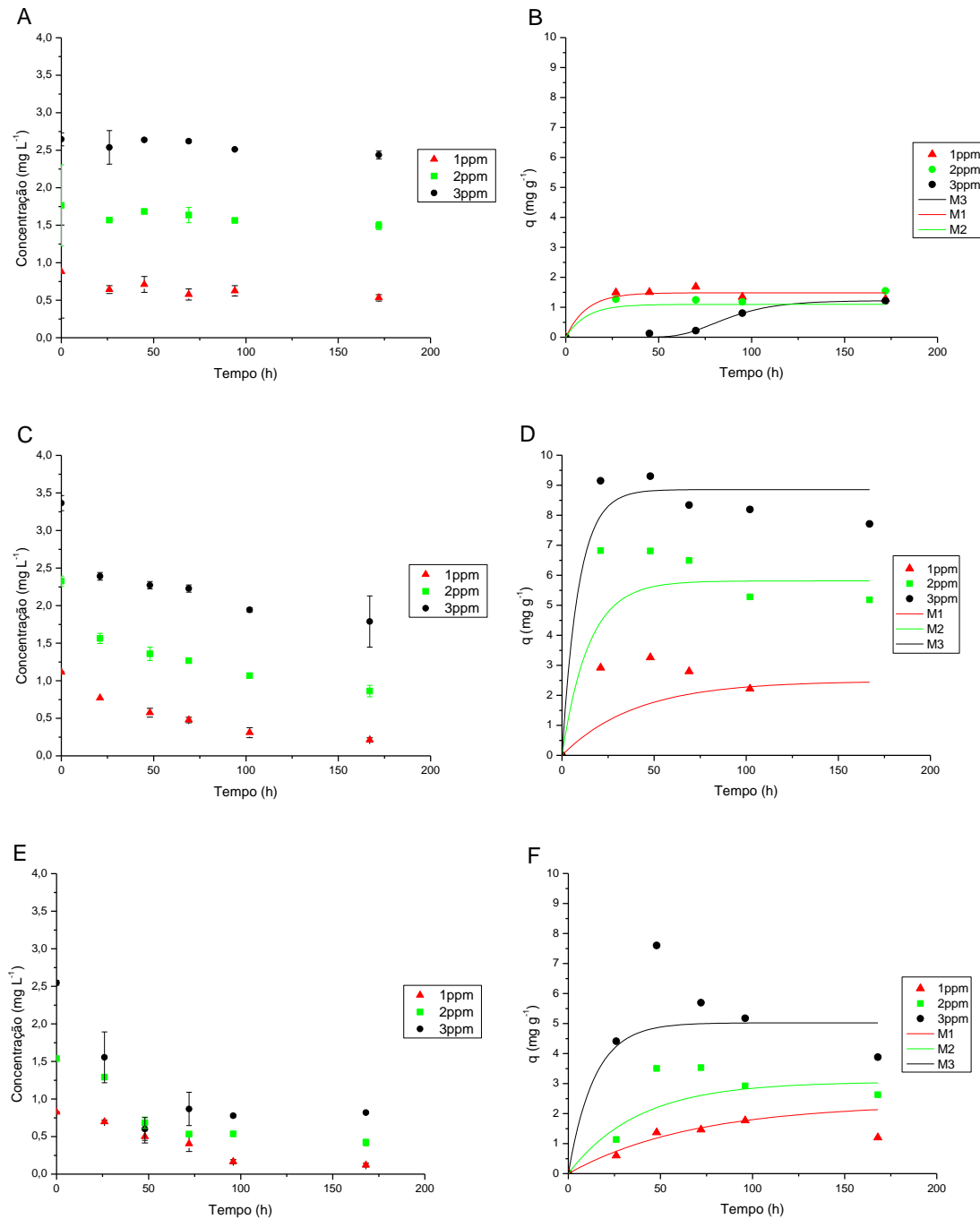


Figura 14: Variação temporal da concentração (no meio e adsorvida na biomassa) de Ni (A e B), de Cd (C e D) e Zn (E e F).

A Tabela 9 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos aplicados. Estes resultados permitem fazer uma comparação das constantes cinéticas de adsorção e da quantidade adsorvida no equilíbrio com valores reportados na literatura. Os valores obtidos relativos à constante cinética de adsorção variaram entre 0,015 a 0,11 h<sup>-1</sup>. O ensaio I (Ni) apresenta um intervalo de 0,06 a 0,09 h<sup>-1</sup>, o ensaio II (Cd) apresenta uma gama de 0,03 a 0,11 h<sup>-1</sup> e o ensaio III (Zn) obteve valores que variam entre 0,015 a 0,071 h<sup>-1</sup>.

Tabela 9: Parâmetros dos modelos cinéticos obtidos com o ajuste dos pontos experimentais

Ensaio	[M] (mg·L <sup>-1</sup> )	$\lambda \pm t_{\alpha/2} * \sigma$ (h)	$k \pm t_{\alpha/2} * \sigma$ (h <sup>-1</sup> )	$q_e \pm t_{\alpha/2} * \sigma$ (mg·g <sup>-1</sup> )	ER <sub>Metal</sub> (%)
I (Ni)	1	-	0,09 ± 0,02	1 ± 1	39,7
	2	-	0,09 ± 0,01	1,1 ± 0,8	15,3
	3*	79 ± 11	0,06 ± 0,05	1,2 ± 0,3	7,88
II (Cd)	1	-	0,03 ± 0,01	2,5 ± 0,8	81,0
	2	-	0,07 ± 0,01	6 ± 5	62,9
	3	-	0,11 ± 0,01	9 ± 6	46,8
III (Zn)	1	-	0,015 ± 0,004	2,3 ± 0,5	85,4
	2	-	0,03 ± 0,01	3 ± 2	72,6
	3	-	0,071 ± 0,004	5 ± 1	67,9

\*Foi aplicado o modelo de Gompertz. NOTA: [M] = Concentração de metal; k = Constante cinética do modelo;  $\sigma$  = Desvio-padrão; ER = Eficiência de remoção;  $q_e$  = quantidade adsorvida no equilíbrio;  $\lambda$  = tempo de atraso;  $t_{\alpha/2}$  = Valor de t-student com 90% de significância.

O valor de  $k$  representa a velocidade de adsorção e quanto mais elevado, mais rápido é o processo de adsorção. A adsorção mais rápida ( $k = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ) foi obtida no ensaio II (Cd) para a concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . A adsorção mais lenta ( $k = 0,015 \text{ h}^{-1}$ ) corresponde ao ensaio III (Zn), com concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Apesar de a velocidade ter sido mais baixa, a quantidade adsorvida no equilíbrio não foi a mais baixa, ou seja, apesar de ter demorado mais tempo, o processo foi mais eficiente que o ensaio I (Ni). Este obteve velocidades de adsorção superiores, no entanto a quantidade adsorvida foi bastante inferior. Neste ensaio, verifica-se que a diferença entre o ensaio com concentração de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e o de  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  não é significativa. Desta forma, pode concluir-se que para concentrações superiores a  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  o processo de adsorção não é eficiente.

Hanif *et al.* (2007) estudaram o processo de adsorção do Ni na biomassa de *Cassia fistula*. A bioadsorção ocorreu a uma temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , a um pH de 6,0 e a concentração inicial do metal foi  $197,56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os autores utilizaram uma concentração inicial de bioadsorvente de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e o ensaio decorreu durante 24 h. Os autores, através da aplicação do modelo de pseudo-primeira ordem, obtiveram um valor de  $k$  de  $0,0156 \text{ h}^{-1}$  e um  $q_e$  de  $78,90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . A biomassa de *Cassia fistula* atingiu uma eficiência de remoção do níquel de 85,64%.

Saeed *et al.* (2005) estudaram a bioadsorção de Cd e de Zn com madeira da árvore de papaia. O ensaio decorreu durante 60 minutos, a um pH de 5, com a concentração inicial de metal de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e a concentração inicial do adsorvente de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . No caso do Cd, os autores obtiveram um valor de  $2,34 \text{ h}^{-1}$  e  $1,307 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , para  $k$  e o  $q_e$ , respetivamente. Para o Zn, os valores obtidos de  $k$  e o  $q_e$  são  $1,98 \text{ h}^{-1}$  e  $0,908 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respetivamente. A eficiência de remoção atingida foi de 94,9% para o Cd e de 66,8% para o Zn.

Bhatti *et al.* (2007) estudaram a adsorção de Zn à biomassa da árvore de acácia-branca. O processo decorreu durante 24 h a uma temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e a um pH de 7. A concentração de

adsorvente foi de  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e a concentração inicial de Zn foi de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os autores ajustaram os pontos experimentais a uma cinética de pseudo-primeira ordem e obtiveram um valor de  $k$  de  $0,0276 \text{ h}^{-1}$  e um valor de  $q_e$  de  $114,47 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Sharma e Bhattacharyya (2005) estudaram a adsorção de Cd a pó de folhas de nim (PFN). O ensaio de adsorção decorreu durante 5 h a uma temperatura constante de  $20^\circ\text{C}$ . A concentração de Cd utilizada foi de  $158,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e a concentração de bioadsorvente variou entre  $0,4$  e  $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A constante cinética de pseudo-primeira ordem variou entre  $0,594 \text{ h}^{-1}$  e  $0,871 \text{ h}^{-1}$ , obtendo-se um valor médio de  $0,720 \text{ h}^{-1}$ .

A Tabela 10 apresenta com maior clareza as constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem obtidas neste estudo e nos estudos mencionados anteriormente. Pode-se constatar que, no geral, as constantes cinéticas de obtidas pela *C. vulgaris* são inferiores às obtidas pelos outros bioadsorventes. Em termos da eficiência da *C. vulgaris* na remoção dos metais, verificou-se que esta diminuiu com o aumento da concentração do metal. De acordo com os resultados analisados anteriormente, esta diminuição era expectável visto que o aumento da concentração do metal também causou uma inibição no crescimento. Desta forma, a quantidade de metal adsorvida está limitada pela quantidade de biomassa existente inicialmente na cultura. O ensaio I (Ni) obteve eficiências de remoção entre 8 e 40%. Estas eficiências são inferiores às eficiências reportadas por Mehta e Gaur (2001) que obtiveram uma remoção de cerca de 69% para uma concentração inicial de metal de  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . No entanto, esta eficiência de remoção foi obtida para uma concentração inicial de biomassa de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , sendo esta seis vezes superior à utilizada no presente trabalho ( $0,152$ - $0,161 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). As eficiências de remoção do ensaio II (Cd) variam entre 47 e 81% e as do ensaio III (Zn) entre 68 e 85%. Cañizares-Villanueva *et al.* (2000) avaliaram a remoção destes metais pela *C. vulgaris*. As concentrações iniciais de Cd e Zn foram  $16,55$  e  $48,26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respetivamente. A eficiência de remoção para Cd foi de 39% e para Zn foi de 85%. Desta forma, pode-se concluir que se obteve boas eficiências de remoção de ambos os metais em comparação ao estudo citado.

Tabela 10: Constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem para diferentes bioadsorventes.

Espécie	Bioadsorvente	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Ref.
Ni	Biomassa de <i>Cassia fistula</i>	0,0156	Hanif <i>et al.</i> (2007)
	<i>C. vulgaris</i>	0,06 a 0,09	Este estudo
Cd	Madeira da árvore de papaia	2,34	Saeed <i>et al.</i> (2005)
	Pó de folhas de nim (PFN)	0,720	Sharma e Bhattacharyya (2005)
	<i>C. vulgaris</i>	0,03 a 0,11	Este estudo
Zn	Madeira da árvore de papaia	1,98	Saeed <i>et al.</i> (2005)
	Biomassa da árvores de acácia-branca	0,0276	Bhatti <i>et al.</i> (2007)
	<i>C. vulgaris</i>	0,015 a 0,071	Este estudo

NOTA:  $k$  = Constante cinética de pseudo-primeira ordem.

### 4.3 Efeito combinado dos metais

O efeito combinado dos três metais (Ni + Cd + Zn) no crescimento *C. vulgaris* e na remoção de nutrientes foi avaliado. Os resultados relativos ao crescimento e produção de biomassa, bem como os resultados relativos à remoção de nutrientes encontram-se de seguida. O ensaio onde decorreu o cultivo *semi-batch* encontra-se presente neste capítulo, visto ser considerado uma variação do efeito combinado dos metais.

#### 4.3.1 Produção de biomassa

Os resultados obtidos relativos ao crescimento da microalga no ensaio da mistura de metais encontram-se descritos na Tabela 11. Pela análise dos resultados obtidos é notório que a mistura de metais afeta negativamente o crescimento da *C. vulgaris*. Comparando as concentrações inicial e máxima de biomassa obtidas nas culturas com a mistura de metais, conclui-se que não houve crescimento da cultura visto que a diferença entre estes valores não é significativa. No geral, este ensaio obteve valores inferiores aos reportados pela literatura, nomeadamente a taxa específica de crescimento para o ensaio de controlo, que deveria estar dentro da gama de 0,550-1,872 d<sup>-1</sup> (Chang *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015). Contudo, este facto também se verificou nos ensaios dos metais simples. Nesta situação, a percentagem de inibição foi elevada, todavia já seria expectável visto que se trata de uma mistura de metais, em que cada um individualmente já tem um efeito inibitório considerável.

#### 4.3.2 Remoção de nutrientes e metais

Os resultados referentes à remoção de nutrientes encontram-se na Tabela 12. Não havendo crescimento da cultura, seria de esperar que a remoção de nutrientes fosse menor. A eficiência de remoção de azoto e fósforo neste ensaio foi de 6,00 e 9,73%, com taxas de remoção e 0,0670 e 0,0499 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respetivamente. Pela análise da Tabela 12, verifica-se que os rendimentos específicos de biomassa se encontram dentro da gama reportada pela literatura, que no caso do azoto é 4,1-75,2 g<sub>b</sub>·g<sub>N</sub><sup>-1</sup> e no do fósforo é 20-230 g<sub>b</sub>·g<sub>P</sub><sup>-1</sup> (Pereira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015). Pode-se atribuir esta diminuição de concentração de nutrientes no meio à assimilação dos mesmos por parte da microalga.

Tabela 11: Parâmetros de análise do crescimento das microalgas do ensaio IV.

Ensaio	X <sub>i</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	X <sub>max</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	P <sub>x,max</sub> (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	μ ± t <sub>α/2</sub> *σ (d <sup>-1</sup> )	I <sub>μ</sub> (%)
IV (Controlo)	0,112	0,593	225	0,28 ± 0,07	-
IV (Mistura)	0,113	0,137	6,25	0,03 ± 0,02	89,3

NOTA: X<sub>i</sub> = Concentração inicial de biomassa; X<sub>max</sub> = Concentração máxima de biomassa obtida; σ = Desvio-padrão; I<sub>μ</sub> = Percentagem de inibição da taxa específica de crescimento; P<sub>x,max</sub> = Produtividade máxima obtida; μ = Taxa específica de crescimento; t<sub>α/2</sub> = Valor de t-student com 90% de significância.

Tabela 12: Parâmetros referentes à remoção de azoto e de fósforo do ensaio de mistura.

Ensaio	ER <sub>N-NO3</sub> (%)	TR (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/N</sub> (g <sub>b</sub> ·g <sub>N</sub> <sup>-1</sup> )	ER <sub>P-PO4</sub> (%)	TR (mg·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	Y <sub>X/P</sub> (g <sub>b</sub> ·g <sub>P</sub> <sup>-1</sup> )
IV (Controlo)	77,0	0,859	79,5	98,2	0,504	136
IV (Mistura)	6,00	0,0670	49,6	9,73	0,0499	66,6

NOTA: ER = Eficiência de remoção; Y = Rendimento específico de biomassa; TR = Taxa de remoção.

Relativamente à remoção de metais, a variação temporal da concentração do metal em solução e da quantidade adsorvida à biomassa apresenta-se na Figura 15. Neste ensaio, o modelo cinético de pseudo-primeira foi também determinado e o valor das suas constantes, bem como as eficiências de remoção obtidas encontram-se na Tabela 13. Analisando a Figura 15A, verifica-se novamente que a concentração diminui com maior significado nas primeiras 24 h. A variação da concentração de Ni não foi significativa em relação aos outros metais. O Zn foi o metal que sofreu um decréscimo de concentração mais elevado nas primeiras 24 h, diminuindo em cerca de 71%. A diminuição da concentração de Cd também foi elevada, correspondendo a uma percentagem de cerca de 60%.

Em relação à quantidade adsorvida na biomassa (Figura 15B) e tendo em conta que a variação da concentração de Ni no meio foi baixa, a quantidade adsorvida também tem um valor baixo. O valor máximo de  $q$  obtido foi cerca de 5 mg·g<sup>-1</sup>. A quantidade máxima adsorvida de Zn foi de cerca 11 mg·g<sup>-1</sup>. Este valor obtido é significativamente mais elevado do que no ensaio III (Zn) concluindo que a adsorção de Zn é favorecida na presença de outros metais. O mesmo acontece com Cd e para o Ni, onde a presença de outros metais beneficia a adsorção. Esta vantagem já tinha sido descrita por Pena-Castro *et al.* (2004), que descobriu que a remoção de Cd era melhorada na presença de Cr e Cu.

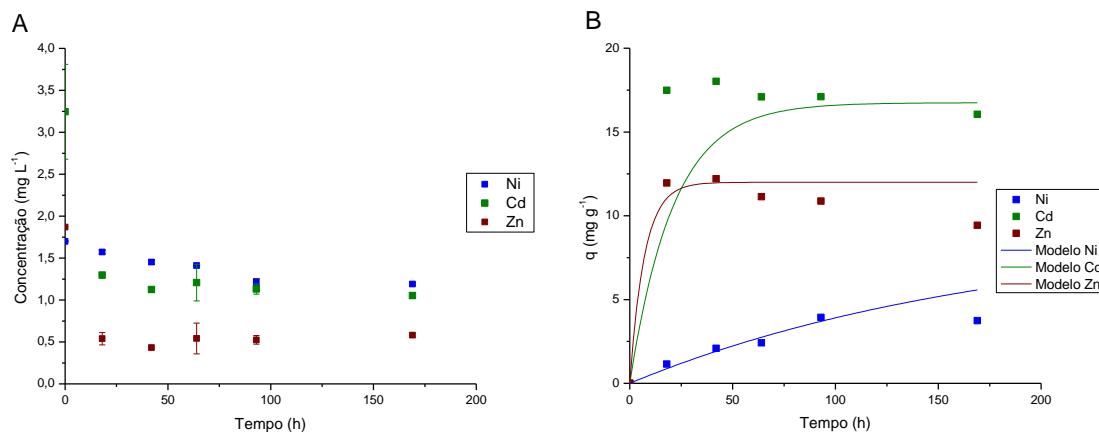


Figura 15: Variação temporal da concentração (no meio e adsorvida na biomassa) de Ni, de Cd e de Zn.

Tabela 13: Parâmetros cinéticos do modelo de pseudo-primeira ordem e eficiências de remoção dos metais.

Metal	$k_{1,ads} \pm t_{\alpha/2} * \sigma$ (h <sup>-1</sup> )	$q_e \pm t_{\alpha/2} * \sigma$ (mg·g <sup>-1</sup> )	ER (%)
Ni	0,006 ± 0,001	9 ± 1	30,0
Cd	0,047 ± 0,005	17 ± 8	67,6
Zn	0,14 ± 0,01	12 ± 9	69,0

NOTA:  $k_{1,ads}$  = Constante cinética de pseudo-primeira ordem;  $\sigma$  = Desvio-padrão; ER = Eficiência de remoção;  $q_e$  = Quantidade adsorvida no equilíbrio;  $t_{\alpha/2}$  = Valor de t-student com 90% de significância.

Este ensaio permitir também determinar se existe alguma preferência em relação aos metais por parte da *C. vulgaris*. Quando a mistura ocorre, e os metais estão em solução, existe uma competição para ver que metal irá adsorver à superfície da *C. vulgaris*. Para determinar a preferência da microalga teve-se em consideração dois fatores: a velocidade de adsorção (indicada pelo valor de  $k$ ) e a quantidade experimental adsorvida em base molar ( $q_e$ , em mmol·g<sup>-1</sup>). Esta quantidade adsorvida foi calculada através da razão dos resultados experimentais de equilíbrio ( $q_e$ ) e a massa molar de cada metal. Analisando a Tabela 13, os valores de  $k$  indicam uma preferência maior para o Zn, seguida do Cd e por último o Ni. Os valores de  $q_e$  indicam a mesma preferência onde os valores obtidos são 0,144 mmol·g<sup>-1</sup>, 0,142 mmol·g<sup>-1</sup> e 0,0630 mmol·g<sup>-1</sup> para o Zn, Cd e Ni, respetivamente. Em concordância com estes valores encontram-se as eficiências de remoção obtidas 69,0%, 67,6% e 30%, respetivamente. Desta forma, conclui-se que a ordem de preferência é  $Zn^{2+} > Cd^{2+} > Ni^{2+}$ , sendo o Zn o metal com maior preferência e o Ni o metal com menor.

Através da análise da Tabela 13, verifica-se que os valores obtidos da constante cinética  $k$  variam entre 0,006 e 0,14 h<sup>-1</sup>. Estes resultados demonstram que a velocidade da adsorção melhorou em relação ao ensaio III (Zn), comprovando, neste caso, o benefício do cultivo com múltiplos metais. Em termos das eficiências de remoção, estas diminuíram em relação às eficiências obtidas nos ensaios dos I, II e III. Apesar da quantidade adsorvida à biomassa ter aumentado, a mistura afeta as eficiências de remoção devido à competição pelos centros ativos. Visto que o crescimento não se verificou, não existiu formação de nova biomassa e consequentemente, novos locais de ligação. Assim, a eficiência de remoção tende a diminuir em relação aos ensaios com metais simples (I, II e III).

#### 4.3.3 Cultivo semi-batch

Este ensaio tem como objetivo simular as condições verificadas numa ETAR onde, a alimentação aos tanques de tratamento é efetuada com uma periodicidade menor. Desta forma, a cada dois dias, a cultura foi alimentada com meio fresco (com a mesma concentração de metais do ensaio anterior). Assim, o ensaio pode ser dividido em duas fases: (i) antes da adição do meio fresco; e (ii) após a adição do meio fresco.

Em relação ao crescimento, o comportamento verificado na primeira fase foi igual ao ensaio IV (Mistura - B), atingindo-se a saturação ao final do segundo dia. Contudo, não se verificou crescimento na segunda fase. Isto pode ser justificado pela saturação observada na primeira fase e pelo efeito inibitório causado pelo aumento da concentração de metal. A variação temporal da concentração de metal em solução para o cultivo em semi-batch encontra-se na Figura 16.

Na primeira fase do ensaio V (Mistura – SB) as eficiências de remoção obtidas foram 13%, 48% e 44% para Ni, Cd e Zn, respetivamente. Verifica-se que no final desta fase, o equilíbrio foi quase atingido. Na segunda fase, as eficiências de remoção de Ni, Cd e Zn diminuíram para os valores de 0%, 29% e 39%, respetivamente. A remoção de 0% de Ni pode ser justificada pelo facto de, na primeira fase o equilíbrio foi quase atingido e porque o Ni tem uma capacidade de ligação menor que os outros metais. Como verificado no ensaio IV (Mistura- B), a mesma preferência é verificada, tanto na primeira fase como na segunda.

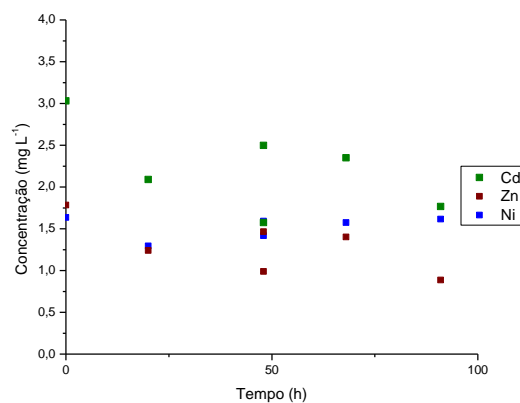


Figura 16: Variação temporal da concentração dos metais em solução no ensaio V (Mistura - SB).



## 5. Conclusões

### 5.1 Considerações gerais

Os objetivos iniciais do presente trabalho assentavam na avaliação do crescimento de microalgas e remoção de nutrientes em ambientes poluídos com metais pesados. A avaliação do crescimento é efetuada com base na taxa específica de crescimento e na produtividade em biomassa e tem como objetivo verificar em que medida, a presença dos metais inibe o crescimento. Os resultados demonstraram que o metal que mais afeta o crescimento da *C. vulgaris* é o níquel, onde a inibição foi superior a 88% para as culturas testadas. Observou-se um valor máximo de taxa específica crescimento de  $0,34 \text{ d}^{-1}$  para a cultura com Cd e para a cultura com Zn e a produtividade de biomassa máxima com o valor de  $98,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  foi obtida com Cd (o valor de  $95,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  foi obtido para Zn)

Em termos da concentração de nutrientes, esta avaliação foi efetuada com base nas eficiências de remoção. Constata-se que a presença de metais diminui a eficiência de remoção de azoto e fósforo pelas microalgas. No caso do azoto, apenas a presença de Ni ( $> 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) afeta a remoção. Em relação ao fósforo, concentrações superiores a  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ni, ou  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cd ou  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Zn provocam um efeito acentuado na remoção de fósforo. As culturas com Cd ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) obtiveram as eficiências de remoção de azoto (90,6%) e fósforo (98,7%) mais elevadas. Contudo, na presença de zinco, as remoções de nutrientes também foram significativas, apresentando eficiências de 78,4% no caso do azoto e 93,1% no caso do fósforo. Relativamente à remoção de metais, a cultura com Zn apresenta os melhores resultados, com eficiências de remoção superiores a 67%.

As isotérmicas de Langmuir descreveram os dados de equilíbrio, à exceção do ensaio III (Zn) em que a isotérmica de Freundlich foi a que melhor se ajustou aos dados de equilíbrio. Em termos de cinéticas de adsorção, os pontos experimentais ajustaram-se ao modelo cinético de pseudo-primeira ordem, e no caso do ensaio I (Ni) para uma concentração de  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , este ajustou-se ao modelo de Gompertz. As constantes cinéticas obtidas variaram entre  $0,06$  e  $0,09 \text{ h}^{-1}$ , no caso do Ni, entre  $0,03$  e  $0,11 \text{ h}^{-1}$ , no caso do Cd e entre  $0,015$  e  $0,071 \text{ h}^{-1}$ , no caso do Zn.

No ensaio IV (Mistura – *batch*), verificou-se a existência de uma preferência de ligação da *C. vulgaris* em relação aos metais ( $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ ) sendo superior para o Zn e inferior para o Ni. No ensaio V (Mistura – *semi-batch*), verificou-se uma diminuição da capacidade de adsorção pela *C. vulgaris* em cerca de 12% da primeira para a segunda fase. Em suma, verifica-se um potencial de produção de biomassa pela *C. vulgaris* na presença de certos metais pesados.

## 5.2 Recomendações de trabalhos futuros

Este estudo demonstrou o potencial de microalgas no tratamento de efluentes na presença de alguns metais pesados. O efeito da concentração do metal (individual ou da mistura) foi analisado em termos do crescimento da cultura e remoção de nutrientes. Neste trabalho, elevadas remoções de azoto e fósforo foram obtidas em algumas culturas testadas. Apesar destes bons resultados, a avaliação do comportamento da cultura em ambiente exterior deve ser efetuada. A variabilidade diária e sazonal da temperatura e intensidade luminosa tem uma forte influência nas taxas de crescimento da microalga e consequentemente na remoção dos nutrientes do efluente testado. Outra variável importante a ser testada é a concentração inicial da cultura. Para valores superiores ao testado nesta cultura, será possível reduzir o efeito inibitório do meio de cultura, promovendo desta forma a multiplicação celular e o aumento da capacidade de adsorção de metais e a eficiência de remoção de azoto e fósforo. A melhoria do tratamento do efluente seria observada até ao valor de concentração de biomassa associada à limitação de transmissão de luz no interior da cultura. Por limitação do tempo associado ao desenvolvimento deste trabalho, não foi possível avaliar a integração da produção de biomassa e tratamento de efluentes com outras espécies de microalgas. A *C. vulgaris* foi escolhida para este estudo, visto que apresentou uma boa capacidade de tratamento de efluentes e resistência a ambientes mais adversos em diferentes estudos presentes na literatura. Outras espécies podem ser isoladas (e identificadas) de ambientes que apresentem valores elevados de concentração de certos metais. Estas apresentam maior tolerância à concentração dos metais nos efluentes, podendo proporcionar um tratamento mais eficiente. Por fim, obtendo a melhor combinação de parâmetros de cultura em efluentes simulados, esta tecnologia poderá ser testada em efluentes reais de diferentes setores industriais.

## Referências bibliográficas

- Ahluwalia, S. S., e Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource technology*, 98(12), 2243-2257.
- Aslan, S., e Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70.
- Barsanti, L., e Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*: CRC press.
- Behin, J. (2012). Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of Merox unit as pulping liquor. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(8), 1045-1051.
- Bhatti, H. N., Mumtaz, B., Hanif, M. A., e Nadeem, R. (2007). Removal of Zn (II) ions from aqueous solution using *Moringa oleifera* Lam.(horseradish tree) biomass. *Process Biochemistry*, 42(4), 547-553.
- Cai, T., Park, S. Y., e Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.
- Cañizares-Villanueva, R., Martínez-Jerónimo, F., e Espinosa-Chávez, F. (2000). Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. *Environmental toxicology*, 15(3), 160-164.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., e Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.
- Chan, A., Salsali, H., e McBean, E. (2013). Heavy metal removal (copper and zinc) in secondary effluent from wastewater treatment plants by microalgae. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(2), 130-137.
- Chang, H.-X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., e Zhu, X. (2016). Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO<sub>2</sub> biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresource technology*, 206, 231-238.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., e Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102(1), 71-81.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Chong, A., Wong, Y., e Tam, N. (2000). Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*, 41(1), 251-257.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., e Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
- Das, N., Vimala, R., e Karthika, P. (2008). Biosorption of heavy metals—an overview.
- Demirbas, A., e Demirbas, M. F. (2010). *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*: Springer Science & Business Media.
- Dinis, M. A., Monteiro, Á., e Boaventura, R. (2004). Tratamento de águas residuais. *Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia*, 41-54.
- Febrianto, J., Kosasih, A. N., Sunarso, J., Ju, Y.-H., Indraswati, N., e Ismadji, S. (2009). Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: a summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2), 616-645.
- Gonçalves, A. (2017). *Microalgal cultivation for biomass production, carbon dioxide capture and nutrients uptake*. (PhD).
- Gonçalves, A., Simões, M., e Pires, J. (2014). The effect of light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*, 85, 530-536.
- Gonçalves, A. L., Rodrigues, C. M., Pires, J. C., e Simões, M. (2016). The effect of increasing CO<sub>2</sub> concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. *Algal Research*, 14, 127-136.

- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., e Yang, J. (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella Vulgaris*. *Energy Procedia*, 61, 2012-2015.
- Gordon, R., e Seckbach, J. (2012). *The science of Algal fuels: phycology, geology, biophotonics, genomics and nanotechnology* (Vol. 25): Springer Science & Business Media.
- Gouveia, L. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels *Microalgae as a Feedstock for Biofuels* (pp. 1-69): Springer.
- Goyer, R. A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Annual review of nutrition*, 17(1), 37-50.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P., e Harrison, S. T. (2014). The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(5), 2345-2356.
- Hanif, M. A., Nadeem, R., Bhatti, H. N., Ahmad, N. R., e Ansari, T. M. (2007). Ni (II) biosorption by *Cassia fistula* (Golden Shower) biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 139(2), 345-355.
- Hinrichsen, D., Robey, B., e Upadhyay, U. D. (1998). Solutions for a water-short world. *Population Reports. Series M: Special Topics*(14), 1-31.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae-a literature review. *Vatten*, 62(1), 31.
- López, M. G.-M., Sánchez, E. D. R., López, J. C., Fernández, F. A., Sevilla, J. F., Rivas, J., . . . Grima, E. M. (2006). Comparative analysis of the outdoor culture of *Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors. *Journal of biotechnology*, 123(3), 329-342.
- Martinez, M., Sánchez, S., Jimenez, J., El Yousfi, F., e Munoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 73(3), 263-272.
- Mehta, S. K., e Gaur, J. P. (2001). Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 18(1), 1-13.
- Mueller-Rees, C., Pfaller, R., Walter, C., e Cotta, F. (2013). Tubular photobioreactor: Google Patents.
- Munoz, R., e Guieysse, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water research*, 40(15), 2799-2815.
- Nuhoglu, Y., e Malkoc, E. (2009). Thermodynamic and kinetic studies for environmentally friendly Ni (II) biosorption using waste pomace of olive oil factory. *Bioresource technology*, 100(8), 2375-2380.
- Pena-Castro, J., Martínez-Jerónimo, F., Esparza-García, F., e Canizares-Villanueva, R. (2004). Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource technology*, 94(2), 219-222.
- Pereira, S. F., Gonçalves, A. L., Moreira, F. C., Silva, T. F., Vilar, V. J., e Pires, J. (2016). Nitrogen Removal from Landfill Leachate by Microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1926.
- Raso, S., Van Genugten, B., Vermuë, M., e Wijffels, R. H. (2012). Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *Journal of applied phycology*, 24(4), 863-871.
- Saeed, A., Akhter, M. W., e Iqbal, M. (2005). Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent. *Separation and purification technology*, 45(1), 25-31.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., e Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- Salem, N. M., e Awwad, A. M. (2014). Biosorption of Ni (II) from electroplating wastewater by modified (*Eriobotrya japonica*) loquat bark. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 379-386.

- Sharma, A., e Bhattacharyya, K. G. (2005). Azadirachta indica (Neem) leaf powder as a biosorbent for removal of Cd (II) from aqueous medium. *Journal of Hazardous Materials*, 125(1), 102-112.
- Sharma, M., Thukral, N., Soni, N. K., e Maji, S. (2015). Microalgae as Future Fuel: Real Opportunities and Challenges. *Journal of Thermodynamics & Catalysis*, 6(1), 1.
- Silva-Benavides, A. M., e Torzillo, G. (2012). Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of applied phycology*, 24(2), 267-276.
- Silva, N., Gonçalves, A., Moreira, F., Silva, T., Martins, F., Alvim-Ferraz, M., . . . Pires, J. (2015). Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Research*, 11, 350-358.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., e Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Taraldsvik, M., e Mykkestad, S. (2000). The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *European Journal of Phycology*, 35(2), 189-194.
- Tchobanoglous, G., Metcalf, Eddy, Burton, F. L., e Stensel, H. D. (2003). *Wastewater engineering: treatment and reuse*: McGraw Hill.
- Travieso, L., Canizares, R., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A., Dupeyrón y, R., e Valiente, V. (1999). Heavy metal removal by microalgae. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 62(2), 144-151.
- Ugwu, C. U., e Aoyagi, H. (2012). Microalgal culture systems: an insight into their designs, operation and applications. *Biotechnology*, 11(3), 127.
- Valderrama, L. T., Del Campo, C. M., Rodriguez, C. M., de-Bashan, L. E., e Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water research*, 36(17), 4185-4192.
- Wahidin, S., Idris, A., e Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*, 129, 7-11.
- Werner, C., Correia, O., e Beyschlag, W. (2002). Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology*, 29(8), 999-1011.
- WWAP. (2016). *The United Nations World Water Development Report 2016: Water and Jobs* (9231001469). Retrieved from Paris:
- WWAP. (2017). *The United Nations World Water Development Report 2017: Wastewater: The Untapped Resource* (9231001469). Retrieved from Paris:
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., e Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
- Yun, Y. S., Lee, S. B., Park, J. M., Lee, C. I., e Yang, J. W. (1997). Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 69(4), 451-455.



# Anexos



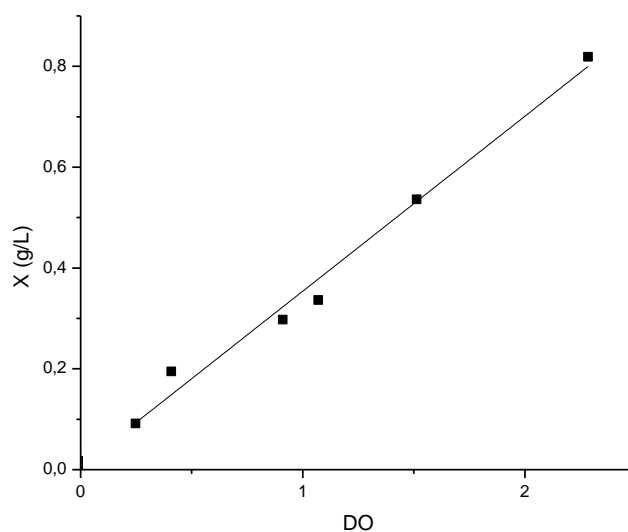
## Anexo A-I. Reta de calibração da biomassa

Os cadinhos que continham as amostras de 40 mL foram secados a 105 °C durante aproximadamente 24 horas, foram transferidos para um exsiccador (onde permaneceram cerca de 1 hora) e as suas massas foram registadas ( $m_1$ ). De seguida, foram colocados numa mufla a 550 °C durante 2 horas, foram arrefecidos lentamente e retirados para um exsiccador (por mais 1 hora), e voltaram a ser pesados ( $m_2$ ).

A diferença entre as duas últimas massas registadas ( $m_1 - m_2$ ) equivale à massa de sólidos suspensos voláteis presentes nos 40 mL de amostra. A concentração de biomassa, em peso seco, foi calculada pelo quociente entre  $m_1 - m_2$  e o volume de amostra retirado.

*Tabela A-I: Curva de calibração usada no cálculo da concentração de biomassa.*

Gama de aplicação	Reta de Calibração	R <sup>2</sup>
0,248 – 2,285	$X = 0,347DO + 0,007$	0,986



*Figura A-I: Reta de calibração da concentração de biomassa.*



## Anexo A-II. Retas de calibração usadas no AAS

Tabela A-II: Retas de calibração usadas para o cálculo da concentração das espécies de metal em cada ensaio.

Ensaio	Gama de aplicação (mg·L <sup>-1</sup> )	Reta de Calibração	R <sup>2</sup>
I (Ni)	0,4 - 3,4	$y = 0,1098x + 0,0302$ (Amostras 1-21)	0,9942
		$y = 0,1076x + 0,0297$ (Amostras 22-38)	0,9924
II (Cd)	0,2 - 1,8	$y = 0,2672x + 0,0387$	0,9917
III (Zn)	0,2 - 1,4	$y = 0,2868x + 0,0411$	0,9880
IV (Ni)	0,4 - 3,4	$y = 0,1076x + 0,0297$ (Amostras 1-8)	0,992
		$y = 0,1043x + 0,0221$ (Amostras 9-12)	0,995
IV (Cd)	0,2 - 1,8	$y = 0,3350x + 0,0633$	0,987
IV (Zn)	0,2 - 1,4	$y = 0,3178x + 0,0519$	0,985
V (Ni)	0,4 - 3,4	$y = 0,1043x + 0,0221$	0,995
V (Cd)	0,2 - 1,8	$y = 0,3350x + 0,0633$	0,987
V (Zn)	0,2 - 1,4	$y = 0,3178x + 0,0519$	0,985



## Anexo A-III. Exemplo da propagação dos erros

De forma generalizada, sendo o parâmetro  $r$  dependente de  $a$  e de  $b$ , a propagação do erro é efetuada da seguinte forma:

$$\sigma_{\bar{r}} = \sqrt{\left(\frac{dr}{da}\right)^2 (\sigma_a)^2 + \left(\frac{dr}{db}\right)^2 (\sigma_b)^2} \quad (17)$$

sendo  $dr/da$  a derivada de  $r$  em função de  $a$ ,  $\sigma_a$  o erro associado ao parâmetro  $a$ ,  $dr/db$  a derivada de  $r$  em função de  $b$ ,  $\sigma_b$  o erro associado ao parâmetro  $b$ .

Para o modelo cinético de pseudo-primeira ordem a propagação é efetuada da seguinte forma:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_{1,ads}t \Leftrightarrow y = -mt + b \quad (18)$$

Neste caso,

$$\sigma_{k_{1,ads}} = \sigma_m \quad (19)$$

$$q_e = e^b \Leftrightarrow \frac{dq_e}{db} = e^b \quad (20)$$

$$\sigma_{q_e} = \sqrt{\left(\frac{dq_e}{db}\right)^2 (\sigma_b)^2} \quad (21)$$

Relativamente aos modelos de equilíbrio de Langmuir e Freundlich, a propagação dos erros foi efetuada da seguinte forma:

$$\frac{1}{q_e} = \left(\frac{1}{q_m K_L}\right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \Leftrightarrow y = mx + b \quad (22)$$

Onde,

$$q_m = \frac{1}{b} \Leftrightarrow \frac{dq_m}{db} = -\frac{1}{b^2} \quad (23)$$

$$\sigma_{q_m} = \sqrt{\left(\frac{dq_m}{db}\right)^2 (\sigma_b)^2} \quad (24)$$

$$K_L = \frac{1}{q_m m} \Leftrightarrow \frac{dK_L}{dq_m} = -\frac{1}{mq_m^2} \text{ e } \frac{dK_L}{dm} = -\frac{1}{q_m m^2} \quad (25)$$

$$\sigma_{K_L} = \sqrt{\left(\frac{dK_L}{dq_m}\right)^2 (\sigma_{q_m})^2 + \left(\frac{dK_L}{dm}\right)^2 (\sigma_m)^2} \quad (26)$$

$$\log(q_e) = \log(K_F) + \frac{1}{n} \log(C_e) \Leftrightarrow y = mx + b \quad (27)$$

Onde,

$$K_F = 10^b \Leftrightarrow \frac{d_{KL}}{d_b} = 10^b \ln(10) \quad (28)$$

$$\sigma_{KF} = \sqrt{\left(\frac{d_{KF}}{d_b}\right)^2 (\sigma_b)^2} \quad (29)$$

$$n = \frac{1}{m} \Leftrightarrow \frac{d_n}{d_m} = -\frac{1}{m^2} \quad (30)$$

$$\sigma_n = \sqrt{\left(\frac{d_n}{d_m}\right)^2 (\sigma_m)^2} \quad (31)$$