

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Tratamento e valorização de efluentes líquidos da indústria do azeite através do cultivo de microalgas

Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente

Olga Beatriz Fernandes Teixeira

Orientadores: Professor Doutor José Alcides Silvestre Peres

Doutor Marco Paulo Gomes de Sousa Lucas



Vila Real, 2020

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Tratamento e valorização de efluentes líquidos da indústria do azeite através do cultivo de microalgas

Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente

Olga Beatriz Fernandes Teixeira

Orientadores: Professor Doutor José Alcides Silvestre Peres

Doutor Marco Paulo Gomes de Sousa Lucas

Composição do Júri:

Presidente: Professora Doutora Edna Cabecinha da Câmara Sampaio
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Vogais: Doutor Carlos Luís Leite Amor
Agência Portuguesa do Ambiente

Doutor Marco Paulo Gomes de Sousa Lucas
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Dissertação apresentada à Escola de Ciências da Vida e do Ambiente da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente.

À minha mãe...

«Be the change you want to see in the world»

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Devo agradecer aos que já caminharam e a todos os que continuam a caminhar comigo pois, de alguma forma, influenciaram as minhas escolhas e fazem parte deste percurso.

Uma palavra especial ao Professor Doutor José Alcides Silvestre Peres, por ter aceitado ser meu orientador, pela confiança, compreensão, disponibilidade, sabedoria, valiosas observações e correções feitas durante a orientação.

Também, ao Doutor Marco Lucas, pelas importantes sugestões, competência, incentivo, análise crítica e apoio constante no decorrer deste trabalho.

Muito obrigada à Eng^a. Leonilde Marchão, pela ajuda preciosa, acompanhamento, paciência, transmissão de conhecimentos e amizade.

Uma homenagem ao Sr. Adelino Teixeira, por ser o melhor pai do mundo e às estrelas da minha vida, querida mãe e mano...para sempre!

Bem hajam!

Resumo

As atividades antropogénicas são as principais responsáveis pela contaminação dos recursos hídricos, sendo que a crescente preocupação relativa à quantidade e qualidade da água de consumo, aliada à inquietação pela sustentabilidade dos ecossistemas, conduziu à necessidade de regulamentar a descarga de efluentes para o meio ambiente.

A indústria de extração de azeite é uma atividade económica particularmente relevante nos países mediterrânicos, com uma elevada geração de águas residuais normalmente denominadas de águas ruças. Estas águas caracterizam-se por uma elevada carga orgânica, reduzida biodegradabilidade e elevado carácter fitotóxico, necessitando de processos de tratamento eficientes.

As limitações técnicas e económicas têm inviabilizado um método de tratamento globalmente aceite para este efluente líquido, mas a biorremediação através de microalgas apresenta-se como vantajosa, por ser um processo ecológico, sem poluição secundária, eficaz na remoção de substâncias e que permite a reutilização da biomassa produzida.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial de biorremediação de efluentes líquidos da indústria do azeite, pelas espécies de microalgas verdes, *Chlorella vulgaris* (Cv) *Chlorella protothecoides* (Cp) e *Scenedesmus obliquus* (So) e pela cianobactéria *Arthrospira maxima* (Am). Durante este estudo foi avaliada a capacidade das microalgas removerem a carga poluente de águas de lavagem de azeitona e águas ruças, através da remoção de Carência Química de Oxigénio (CQO), polifenóis, fósforo e nitratos. A produção de biomassa microalgal foi monitorizada para ambas as águas residuais em estudo, através do peso seco e da taxa de produtividade máxima das microalgas, no final de cada tratamento.

Pela complexidade dos efluentes, percebeu-se a importância do fator diluição, partindo da base de 5% para a água ruça (AR) e 50% para a água de lavagem (AL). Para ambos os efluentes, os inóculos da *Chlorella protothecoides* (Cp) foram os que melhor responderam, com pesos máximos (X) de 783,3 mg/L e produtividade máxima (P_{Xmax}) de 165,8 mg/L/dia para a água ruça (AR) e $X = 691,6$ mg/L, $P_{Xmax} = 107,9$ mg/L/dia para a água de lavagem (AL).

As percentagens de remoção de CQO oscilaram entre os 41,8% e os 61,6% no caso da água ruça e entre os 36,2% e os 67,9%, nas culturas com água de lavagem, sendo as espécies *Scenedesmus obliquus* (So) e as *Chlorellas* (Cv e Cp) as que apresentaram os menores e os maiores resultados, respetivamente.

Devido à elevada dificuldade de degradação biológica, as percentagens máximas de remoção dos polifenóis não vão além dos 40,3% na água ruça e dos 48,1% na água de lavagem. A microalga *Arthrospira maxima* (*Am*) obteve o melhor desempenho na AR, enquanto que na AL se destacou a espécie *Chlorella protothecoides* (*Cp*).

Valores significativos de remoção, do macronutriente fósforo (P-PO₄) foram apenas verificados com a *Arthrospira maxima* (*Am*), 67,0% para a água ruça e 36,0%, para a água de lavagem de azeitona.

Relativamente aos nitratos (N-NO₃), foram obtidas taxas de remoção muito satisfatórias, com todas as microalgas. Com uma taxa de remoção de aproximadamente 84,0%, destacaram-se a *Arthrospira maxima* (*Am*) na água de lavagem e a *Scenedesmus obliquus* (*So*) na água ruça.

Apesar de serem mais favoráveis os resultados obtidos para o uso das microalgas no tratamento da água ruça, a continuação dos estudos não será exequível, se este efluente não for sujeito a um tratamento primário que possibilite a remoção da elevada toxicidade deste efluente, que induz a morte celular das microalgas ao fim de 4 dias.

Para a água de lavagem de azeitona, embora sejam menos promissores os resultados obtidos, será possível a utilização das espécies *Chlorella vulgaris* (*Cv*) e *Chlorella protothecoides* (*Cp*), no processo de tratamento desta água residual, desde que sejam ajustadas as condições ótimas de crescimento das microalgas.

Palavras-chave: Microalgas, biorremediação, água ruça, água de lavagem de azeitona, produção de biomassa algal.

Abstract

Anthropogenic activities are largely responsible for water resources contamination. Growing concern regarding the quantity and quality of drinking water, coupled with ecosystems sustainability, has led to the need for regulate the discharge of effluents into the environment.

The olive oil extraction industry is a particularly relevant economic activity in Mediterranean countries, with a high generation of waste water, commonly referred to olive mill wastewater. These waters are characterized by a high organic load, reduced biodegradability and a high phytotoxic character, requiring efficient treatment processes.

Technical and economic limitations have hindered a globally accepted treatment method for this type of effluent. Bioremediation through microalgae is useful, because is an environmentally friendly process with no secondary pollution, effective in removing substances and allowing the reuse of biomass produced.

The main objective of this work was to evaluate the potential for bioremediation of effluents from the olive oil industry, by the species of green microalgae, *Chlorella vulgaris* (Cv) *Chlorella protothecoides* (Cp) and *Scenedesmus obliquus* (So) and by the cyanobacterium *Arthrospira maxima* (Am). During this study, the ability of microalgae to remove the polluting load from olive washing and redwater waters was evaluated, by removing Chemical Oxygen Demand (COD), polyphenols, phosphorus and nitrates. The production of microalgal biomass was monitored for both wastewaters under study, through the dry weight and the maximum productivity rate of the microalgae, at the end of each treatment.

Due to the complexity of the effluents, we perceive the importance of the dilution factor, starting from the base of 5% for olive mill wastewater (OMW) and 50% for olives washing wastewater (OWW). For both effluents, *Chlorella protothecoides* (Cp) inocula responded best, with maximum weights (X) of 783.3 mg / L and maximum productivity ($P_{X_{max}}$) of 165.8 mg / L / day for olive mill wastewater and $X = 691.6$ mg / L, $P_{X_{max}} = 107.9$ mg / L / day for olives washing wastewater.

The percentages of chemical oxygen demand removal (COD) ranged from 41.8% to 61.6% in the case of olive mill wastewater and between 36.2% and 67.9% in cultures with washing water, with *Scenedesmus obliquus* species (So) and *Chlorellas* (Cv and Cp), which presented the worst and best results, respectively.

Due to difficult biological degradation, the maximum percentages for the removal of polyphenols did not exceed 40.3% in olive mill wastewater (OMW) and 48.1% in olive mill wastewater.

The microalgae *Arthrospira maxima* (*Am*) had the best performance in OMW, while in OWW the species *Chlorella protothecoides* (*Cp*) stood out.

Significant removal values of macronutrient phosphorus (P-PO₄) were only verified with *Arthrospira maxima* (*Am*), 67.0% for olive mill wastewater and 36.0% for washing water.

Regarding nitrates (N-NO₃), very satisfactory removal rates were obtained with all microalgae. With a removal rate of approximately 84.0%, *Arthrospira maxima* (*Am*) stood out in the washing water and *Scenedesmus obliquus* (*So*) in olive mill wastewater.

Although the results obtained for the use of microalgae in the treatment of olive mill wastewater seem more favourable, further studies will not be feasible if this effluent is not subjected to a more complex primary treatment, since the excessive amount of its load toxicity induces bioremediators death after 4 days.

For olive mill wastewater, although the immediate results are less promising, it is possible to use the species *Chlorella vulgaris* (*Cv*) and *Chlorella protothecoides* (*Cp*), in the process of treating this residual waste water, provided that the optimal growth conditions for the microalgae are met.

Key words: Microalgae, bioremediation, olive mill wastewater, olive wash water, algal biomass production.

Índice Geral

Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Importância e motivação.....	1
1.2. O poder da água.....	1
1.3. Objetivos.....	3
2. Estado da arte.....	5
2.1. Produção de azeite em Portugal.....	5
2.2. Principais sistemas de extração de azeite.....	6
2.3. Efluentes líquidos dos lagares de azeite.....	8
2.3.1. Caracterização das águas ruças.....	8
2.3.2. Tratamento das águas ruças.....	10
2.3.3. Enquadramento jurídico.....	13
2.3.4. Valorização das águas ruças.....	14
2.4. Microalgas.....	15
2.4.1. Produção da biomassa microalgal.....	17
2.4.2. Composição proximal das microalgas.....	25
2.4.3. Produtos não-energéticos e energéticos das microalgas.....	27
2.4.4. Algumas aplicações para as microalgas.....	27
2.4.5. Biorrefinaria baseada em microalgas.....	31
2.5. Biorremediação.....	37
2.5.1. Capacidade biorremediativa das microalgas (Ficorremediação).....	39
2.5.2. Aplicação de microalgas na indústria do azeite.....	40
3. Material e Métodos.....	43

3.1. Microalgas	43
3.1.1. Caracterização das espécies de microalgas utilizadas	43
3.2. Condições de cultura	45
3.2.1. Meios para o inóculo	46
3.3. Efluentes utilizados.....	47
3.3.1. Pré-tratamento dos efluentes utilizados.....	48
3.4. Cultivo das microalgas nos efluentes	49
3.4.1. Amostragem	50
3.5. Determinações analíticas	51
3.5.1. Determinação do peso seco e produtividade	51
3.5.2. Parâmetros físico-químicos medidos	52
4. Resultados e discussão	55
4.1. Características físico-químicas dos efluentes analisados	55
4.2. Crescimento das microalgas	58
4.2.1. Crescimento microalgal na água ruça	59
4.2.2. Crescimento microalgal na água de lavagem	60
4.2.3. Produtividade e pH.....	62
4.3. Avaliação do potencial biorremediador das microalgas nos efluentes.....	65
4.3.1. Remoção de CQO.....	65
4.3.2. Remoção de polifenóis	67
4.3.3. Variação de P-PO ₄ e N-NO ₃	69
5. Conclusões e propostas de trabalho futuro	73
Referências bibliográficas	76

Índice de Figuras

Figura 1.1. Distribuição da água na Terra (Fonte: Hipólito e Vaz, 2011).	2
Figura 1.2. População mundial 1950-2015 e cenário de projeção para 2100 (Fonte: UN/SA Population Division, 2015).	3
Figura 2.1. Produção de azeitona para azeite entre 1941 e 2019 (Fonte: INE, 2020).....	6
Figura 2.2. Processos de tratamento de efluentes de lagares de azeite (Fonte: Jerónimo, 2012).	10
Figura 2.3. Resumo do quadro legislativo para os efluentes dos lagares de azeite (APA, 2020).	13
Figura 2.4. Metabolismo das microalgas: (A) representação da fotossíntese (B) diferenças entre os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.	16
Figura 2.5. <i>Raceway open pond</i>	18
Figura 2.6. Exemplo de um fotobiorreator tubular (Fonte: Pérez, 2007).	19
Figura 2.7. Ciclo de crescimento em sistema fechado. (A) fase de latência ou lag, $\mu = 0$; (B) fase de aceleração, $\mu < \mu_{max}$; (C) fase exponencial, $\mu = \mu_{max}$; (D) fase de desaceleração, $\mu < \mu_{max}$; (E) fase estacionária, $\mu = 0$; (F) fase de morte (Adaptado de Ferreira <i>et al.</i> , 1998)	20
Figura 2.8. Classificação dos processos de rutura celular aplicáveis a microalgas (Adaptado de: Lee <i>et al.</i> , 2012).	24
Figura 2.9. Biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de microalgas (Adaptado de: Jones e Mayfield, 2012).	33
Figura 2.10. Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de: Mata <i>et al.</i> , 2010).	34
Figura 3.1. Imagem celular das espécies em estudo (A) <i>Chlorella vulgaris</i> (B) <i>Chlorella prothecoides</i> (C) <i>Scenedesmus obliquus</i> e (D) <i>Arthrospira maxima</i>	45
Figura 3.2. Inóculos das microalgas em estudo.	46
Figura 3.3. Tanques de retenção da CAOM (A) água ruça (B) água de lavagem da azeitona.	47
Figura 3.4. Efluentes na altura da recolha. (A) águas ruças e (B) água de lavagem.....	47
Figura 3.5. Observação das partículas sedimentadas (A); tinalização (B).	48
Figura 3.6. Cultura das microalgas na Água ruça (A) e na Água de lavagem (B).	50
Figura 3.7. Amostras para obtenção do filtrado.	50
Figura 3.8. Aspeto do papel de filtro após filtração a vácuo dos cultivos em água ruça (A) e água de lavagem (B).	51
Figura 4.1. Observação da presença de massas tóxicas nos inóculos: (A) <i>Chlorellas</i> ; (B) <i>Scenedesmus obliquus</i> ; (C) <i>Arthrospira maxima</i> ; (D) Controlo.	59
Figura 4.2. Variação do peso seco (X mg/L) microalgal na água ruça, em função do tempo (dia), das espécies: <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Chlorella protothecoides</i> (Cp), <i>Scenedesmus obliquus</i> (So) e <i>Arthrospira maxima</i> (Am).	60

Figura 4.3. Variação do peso seco (X mg/L) na água de lavagem, em função do tempo (dia), das espécies: <i>Chlorella vulgaris</i> (Cv), <i>Chlorella protothecoides</i> (Cp), <i>Scenedesmus obliquus</i> (So) e <i>Arthrospira maxima</i> (Am).	61
Figura 4.4. Aglomerados microalgais como resposta às condições adversas.	63
Figura 4.5. Variação de CQO em mg O ₂ /L/d (A) e percentagens de remoção (B) em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).	66
Figura 4.6. Variação dos polifenóis em mg/L/d (A) e percentagens de remoção (B) em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).	68
Figura 4.7. Evolução temporal de P-PO ₄ , mg/L (A) e taxas de remoção (B), em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).	70
Figura 4.8. Evolução temporal de N-NO ₃ , mg/L (A) e taxas de remoção (B), em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).	72

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Inquérito anual à produção de azeite (Adaptado de: INE, junho de 2019).	5
Tabela 2.2. Comparação entre os principais sistemas de extração de azeite (Fontes: Aires, 2007; Albuquerque <i>et al.</i> , 2004; Aparício e Harwood, 2013; Dermeche <i>et al.</i> , 2013).	7
Tabela 2.3. Evolução do número de lagares em exploração por sistema de extração (Fonte: INE, 2019).	8
Tabela 2.4. Características físico-químicas de efluentes de lagares de azeite segundo vários autores.	9
Tabela 2.5. Valores limite de descarga e de emissão para águas residuais industriais (Decreto-Lei nº 236/98 - Anexo XVIII).	14
Tabela 2.6. Características das diferentes formas de metabolismo das microalgas (Adaptado de: Chen <i>et al.</i> , 2011).	16
Tabela 2.7. Principais vantagens e desvantagens dos sistemas abertos (Adaptado de: Lam e Lee, 2012; Pires <i>et al.</i> , 2012; Demirbas, 2010).	19
Tabela 2.8. Principais vantagens e desvantagens dos sistemas fechados - Fotobiorreatores (Lam e Lee, 2012; Pires <i>et al.</i> , 2012; Singh e Sharma, 2012; Demirbas, 2010).	19
Tabela 2.9. Composição proximal (g/100, g MS) de algumas espécies de microalgas. (Adaptado de: Anele <i>et al.</i> , 2016; Christaki <i>et al.</i> , 2011; Madeira <i>et al.</i> , 2017 e Priyadarshani e Rath, 2012).	26
Tabela 2.10. Captura de carbono por microalgas (Congresso internacional de bioenergia, Curitiba, 2009)	29
Tabela 2.11. Remoção de azoto e fósforo em águas residuais por microalgas.	31
Tabela 2.12. Trabalhos experimentais com microalgas numa base de biorrefinaria (Fonte: Silva <i>et al.</i> , 2014).	32
Tabela 2.13. Fontes de produção de bioetanol.	35
Tabela 2.14. Vantagens e desvantagens de processos de remediação tradicionalmente utilizados. (Fonte: Moreira, 2010).	38
Tabela 2.15. Potencial de biorremediação de microalgas sobre diversos compostos.	39
Tabela 4.1. Caracterização físico-química das águas residuais em estudo (Água ruça e Água de lavagem).	55
Tabela 4.2. Valores de peso seco máximo (X_{\max} mg/L) e produtividade máxima ($P_{X_{\max}}$ mg/L/d)	62
Tabela 4.3. Variação do pH ao longo dos ensaios.	64

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ACV, avaliação do ciclo de vida

AL, águas ruças

CBO, carência bioquímica de oxigénio (mg O₂/L)

CE, Comissão Europeia

COI, Conselho Oleícola Internacional

COT, carbono orgânico total (mg C/L)

CQO, carência química de oxigénio (mg O₂/L)

CT, carbono total

DOP, denominação de origem protegida

GEE, gases com efeito de estufa

LNEG, Laboratório Nacional de Energia e Geologia

NO₃, nitratos (mg NO₃/L)

POA, processos de oxidação avançados

P-PO₄, ortofosfatos (mg PO₄/L)

PT, polifenóis totais

PVC, policloreto de vinilo

P_x, produtividade de biomassa (mg/L/d)

SST, sólidos suspensos totais

UE, União Europeia

VLE, valor limite de emissão

VMA, valor máximo admissível

X, concentração de biomassa (mg/L)

μ, taxa de crescimento específica (dia)

1. Introdução

1.1. Importância e motivação

Numa altura em que o mundo segue um caminho insustentável, as metas ambientais apoiam-se na mudança radical de comportamentos, nas soluções tecnológicas e na utilização de recursos para uma economia circular, pois o desenvolvimento sustentável depende do equilíbrio dinâmico entre a prosperidade económica, a inclusão social e a proteção ambiental.

O termo base «Ecodesenvolvimento» foi apresentado na Conferência de Estocolmo em 1972 e é usado para descrever o desenvolvimento ecológico através da gestão positiva do ambiente para benefício humano e da natureza (Gilpin, 1997), tendo em conta as necessidades atuais e das gerações futuras.

Estimando-se que em 2050 a população mundial se aproxime dos nove mil milhões (Savitz, 2007), serão necessários recursos de cinco planetas como a Terra e isso é impossível!

Não podemos correr o risco de testar até onde o nosso planeta poderá resistir, pois as consequências podem ser irreversíveis. Devemos ampliar a nossa consciência sobre a complexidade dos sistemas que regem a natureza e repensar sobre a atual relação entre o ser humano e o ambiente que o rodeia.

1.2. O poder da água

A água é um recurso natural, fundamental para a Humanidade e essencial a todas as formas de vida.

Do ponto de vista químico, falamos de um composto formado por dois átomos de hidrogénio e um átomo de oxigénio, cuja fórmula molecular se representa por H₂O. Um solvente universal que permite misturas com outras substâncias e que tem o poder de manter juntas as moléculas da sua superfície ou de as transportar se estiver em movimento.

Do ponto de vista físico, a água pode apresentar-se sob os estados sólido, líquido e gasoso e pode mudar de estado, pela ação da radiação solar e da força da gravidade, integrando o ciclo hidrológico da água, que consiste na sequência fechada dos processos envolvidos no movimento contínuo da água entre a Terra e a atmosfera (IST, 2018), pelos fenómenos de evaporação, evapotranspiração, condensação, precipitação, infiltração e escoamento superficial e subterrâneo.

Com um volume total de cerca de 1600 milhões km³, é o líquido mais abundante na Terra e cobre cerca de três quartos da sua superfície. Sensivelmente 15% desta água está quimicamente ligada à crosta terrestre e a restante é água livre, aproximadamente 1386 milhões km³ (Hipólito e Vaz, 2011).

A Figura 1.1. representa a importância das várias reservas hídricas na Terra, onde 97% é água salgada e apenas 3% é água doce. Destes 3%, aproximadamente 77% está retida em glaciares e neve permanente, 22% é água subterrânea e somente 1% corresponde a água superficial. Deste 1%, encontramos 61% em rios e lagos e 39% no solo e na atmosfera, o que quer dizer que apenas cerca de 0,3% de toda a água da Terra é passível de ser utilizada pelo Homem (Hipólito e Vaz, 2011).

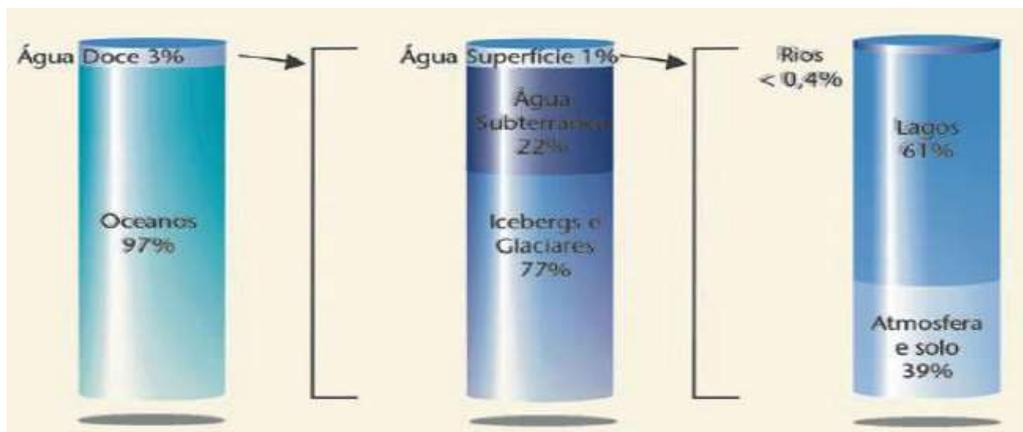


Figura 1.1. Distribuição da água na Terra (Fonte: Hipólito e Vaz, 2011).

Citando Ricardo Arnst: “Vista de longe a Terra é pura água, mas não é água pura, esta é rara e cada vez mais cara”.

Mais de 1200 milhões de pessoas não tem acesso a água potável e o crescimento da população mundial (Figura 1.2.) implica uma sobreexploração dos recursos hídricos, pelo que urge a aplicação de uma gestão criteriosa da água, traduzida na necessidade de desenvolver e investigar novos métodos de tratamento de água e de águas residuais (Peres, 2011).

Em concordância com a “Declaração Universal dos Direitos da Água”, instituída pela Organização das Nações Unidas (ONU), em 1992, a água inclui-se no património do planeta, sendo que, cada continente, cada povo, cada nação, cada região, cada cidadão é plenamente responsável aos olhos de todos.

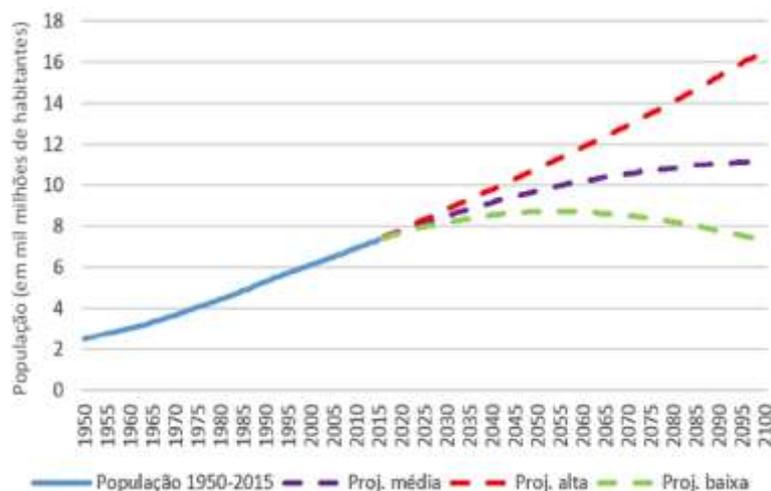


Figura 1.2. População mundial 1950-2015 e cenário de projeção para 2100 (Fonte: UN/SA *Population Division*, 2015).

1.3. Objetivos

A descarga inadequada das águas residuais e sem qualquer tipo de tratamento, nomeadamente as provenientes dos lagares de azeite, são uma ameaça à disponibilidade dos recursos hídricos.

É incontestável assegurar processos de desenvolvimento sustentáveis, ou seja, que satisfaçam as necessidades presentes, sem comprometer as gerações futuras e, nesse sentido, têm sido impostas leis que regulamentam a atividade industrial e a correspondente descarga de efluentes.

Os processos de produção de azeite geram grandes quantidades de águas residuais, conhecidas como águas ruças, que se caracterizam por uma elevada carga orgânica, sazonalidade, biodegradabilidade diminuta e natureza bactericida, refratária e fitotóxica, em consequência do elevado teor de compostos fenólicos presentes nestas águas. Estas características diminuem a eficiência dos processos de tratamento, particularmente os biológicos, pelo que nos últimos anos se tem assistido a um esforço crescente, no sentido de serem encontrados métodos de tratamento alternativos e mais eficientes (Lucas *et al.* 2013).

Recentemente, as microalgas têm sido utilizadas no tratamento de solos, como fertilizantes, na indústria alimentar e farmacêutica, no setor energético, na mitigação de CO₂ e no tratamento de efluentes.

As microalgas são de fácil manuseamento, de produção contínua e versáteis relativamente à utilização de água, podendo crescer em água doce, salgada ou em águas

residuais, permitindo a redução de custos no fornecimento de nutrientes ou na remediação das mesmas.

Este trabalho procura avaliar a capacidade de crescimento de microalgas, em efluentes líquidos da indústria do azeite (água de lavagem de azeitonas e águas ruças), ao mesmo tempo que promovem a sua depuração.

O primeiro objetivo passará pela caracterização dos efluentes utilizados, para conhecimento das suas características físicas e químicas. Os indicadores serão o cheiro, a cor, o pH, a condutividade elétrica ($\mu\text{s}/\text{cm}$), a turbidez (NTU), o total de sólidos em suspensão (SST - mg/L), a carência química de oxigénio (CQO - $\text{mg O}_2/\text{L}$), a carência bioquímica de oxigénio (CBO_5 - $\text{mg O}_2/\text{L}$), o carbono orgânico total (COT - $\text{mg C}/\text{L}$) os polifenóis totais (PT - $\text{mg ácido gálico}/\text{L}$), o fósforo ($\text{mg P}/\text{L}$), o azoto total ($\text{mg N}/\text{L}$) e os nitratos ($\text{mg NO}_3/\text{L}$).

Seguir-se-á a avaliação das condições ótimas para o crescimento das microalgas nas águas residuais em apreço e, para isso, serão testadas três espécies de microalgas verdes, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Chlorella protothecoides* (Cp), *Scenedesmus obliquus* (So) e a cianobactéria *Arthrospira maxima* (Am), inoculadas diretamente no meio em condições ótimas para o seu crescimento e à escala laboratorial.

A etapa seguinte visa o acompanhamento e análise do crescimento de cada uma das microalgas, pelo estudo da influência da taxa de diluição na sua adaptação, bem como pela medição do peso seco, CQO, polifenóis, fósforo e nitratos, taxa de produtividade máxima de biomassa e percentagem de remoção de carga orgânica do meio de crescimento. Serão, ainda, comparados os valores de pH inicial e final dos inóculos, como comprovativo do crescimento microalgal e conseqüente remoção de compostos de carbono, responsáveis pela acidificação do meio.

Por fim, será selecionada a microalga que melhor responda às adversidades do meio, com conseqüente proposta da estimativa das condições que mais se aproximam do ótimo, para a viabilidade da produção de uma quantidade de biomassa que justifique a análise do seu conteúdo lipídico, proteico e de pigmentos, com vista a potenciais aplicações, como a mitigação do efeito estufa, indústrias alimentar e farmacêutica, biofertilizantes e setor energético (bioetanol, biodiesel, biogás).

2. Estado da arte

2.1. Produção de azeite em Portugal

É na bacia do Mediterrâneo que se encontra a maior extensão oleícola a nível mundial. Uma atividade agroindustrial essencial e responsável pela quase totalidade da produção de azeite no mundo e cujo consumo tem vindo a aumentar exponencialmente, em consequência dos seus comprovados benefícios nutricionais (Aggouna *et al.*, 2016). Um produto com riqueza e herança cultural e um motor para a economia, pela criação de emprego, combate à desertificação e manutenção das populações rurais.

Em Portugal a oliveira marca a paisagem desde que há memória, com a qualidade dos solos e as variações climáticas a determinarem a diversidade e qualidade dos azeites produzidos, essencialmente nas regiões de Trás-os-Montes, Beira Interior, Moura, Ribatejo, Alentejo Interior e Norte Alentejano, que são as seis zonas de Denominação de Origem Protegida (DOP). O Alentejo representa 70% da produção nacional de azeitona para azeite, mas é Trás-os-Montes que regista o maior aumento de produção dos últimos 20 anos, com um crescimento de 23%, equivalente a cerca de 94 mil toneladas de azeitona, em vez de 76 mil toneladas (INE, 2019).

Face à campanha de 2018, que resultou em 1 094 433 hl de azeite (Tabela 2.1.), estima-se um aumento de 30% na produção de azeitona para azeite, posicionando a campanha de 2019 como a mais produtiva desde que existem registos sistemáticos, ou seja, 1941 (Figura 2.1.).

Tabela 2.1. Inquérito anual à produção de azeite (Adaptado de: INE, junho de 2019).

Período de referência dos dados	Localização geográfica (Região agrária)	Azeite produzido (hl)
2018	Portugal	1 094 433
	Entre Douro e Minho	2 166
	Trás-os-Montes	164 945
	Beira Litoral	25782
	Beira Interior	43295
	Ribatejo e Oeste	52 968
	Alentejo	803 235
	Algarve	2 043

Ressalva-se o facto de também se verificar, para o ano de 2019 e em relação a 2018, um aumento do rendimento da azeitona em azeite na ordem dos 10% (subida da funda), o que significa um aumento da produção de azeite superior ao aumento da produção de azeitona (INE, 2020). Na sua grande maioria, os lagares de azeite correspondem a pequenas e médias unidades de produção, privadas ou cooperativas, e localizam-se em todo o território nacional.



Figura 2.1. Produção de azeitona para azeite entre 1941 e 2019 (Fonte: INE, 2020).

2.2. Principais sistemas de extração de azeite

A extração desta gordura vegetal tem vindo a evoluir ao longo dos tempos, desde o processo tradicional de prensas, até aos sistemas de centrifugação de três ou duas fases. Normalmente têm em comum as etapas de limpeza, lavagem, moenda das azeitonas e, nos sistemas mais modernos, termobatedura da massa.

A qualidade do azeite começa a ser definida assim que a azeitona chega ao lagar. O fruto é descarregado sobre uma grelha para que possam ser retirados ramos ou pedras e, a seguir, soprado para eliminação das folhas (Aires, 2007). Segue-se a lavagem com água fria que elimina toda a terra e deixa a azeitona em condições de ser moída. É retirada uma amostra para análise laboratorial e a matéria-prima é pesada. A moenda permite a libertação das gotas de azeite que se encontram na polpa da azeitona e dá-se a formação de uma espécie de pasta, que é batida lenta e continuamente a menos de 30°C durante cerca de 45 minutos (termobatedura), facilitando a separação das fases oleosa e aquosa, com consequente aumento da percentagem de azeite disponível (Aparício e Harwood, 2013). A pasta encontra-se em condições de sofrer a separação total de fases sólida e líquida, pelo que é nesta altura que os processos de extração de azeite se diferenciam. No final ocorre a separação da fase oleosa (azeite) da fase aquosa por decantação e/ou centrifugação.

A Tabela 2.2., resume as características mais relevantes, vantagens e desvantagens dos três principais sistemas de extração de azeite.

Tabela 2.2. Comparação entre os principais sistemas de extração de azeite (Fontes: Aires, 2007; Albuquerque *et al.*, 2004; Aparício e Harwood, 2013; Dermeche *et al.*, 2013).

Sistema tradicional de prensas		
Principais características	Vantagens	Desvantagens
O método mais antigo; Uso de capachos (discos filtrantes) onde é espalhada a massa; Pilha de capachos comprimida por prensa hidráulica; Parte sólida (bagaço da azeitona) retida nos capachos; Parte líquida (mosto oleoso) drenada; Separação do azeite da água por decantação ou centrifugação; Produtos finais: azeite virgem + bagaço de azeitona seco + águas ruças (água de lavagem, água de vegetação, água adicionada ao processo para facilitar a separação das fases).	Menor investimento inicial; Baixo consumo de energia; Baixa humidade do bagaço de azeitona (35%); Utilização de baixas temperaturas; Menor volume de água do que no sistema contínuo de três fases; Menor produção de bagaço de azeitona (400 kg por tonelada de azeitona laborada).	Processo descontínuo; Produtividade limitada; Requer muita mão-de-obra; Dificuldade de higienização ao longo de todo o processo; O equipamento ocupa muito espaço.
Sistema de centrifugação de três fases		
Principais características	Vantagens	Desvantagens
Desenvolvido nos anos 70; Extração do azeite por centrifugação; A massa é encaminhada para um <i>decanter</i> (centrifugadora horizontal) que funciona a alta velocidade e separa a fração sólida (bagaço da azeitona) da líquida (água e azeite); Adição de água morna (20-25°C) ao <i>decanter</i> , na proporção massa/água entre 1:0,4 e 1:0,7 (m ³ /m ³) para não interferir no teor fenólico nem no rendimento do produto final; Produtos finais: azeite virgem + bagaço de azeitona seco + águas ruças.	Sistema de extração contínuo; A área ocupada é muito menor do que no sistema tradicional de prensas; Requer pouca mão-de-obra; Possibilidade de automatização; Elevada capacidade de laboração; Produção de azeite com menor acidez.	Maior produção de águas ruças (1 a 1,2 m ³ por tonelada de azeitona, enquanto o sistema de prensas produz 0,4 a 0,6 m ³ de águas ruças por tonelada de azeitona laborada); Maior consumo de energia; Maior consumo de água; Maior custo no investimento; Perda de componentes antioxidantes para a fase da água; Maior risco de contaminação ambiental.
Sistema de centrifugação de duas fases		
Principais características	Vantagens	Desvantagens
Surgiu nos anos 90; Utiliza um <i>decanter</i> de duas fases onde ocorre a centrifugação; Não necessita de água para a separação entre as fases líquida e sólida; Produtos finais: azeite virgem + bagaço de azeitona húmido + águas ruças em pequena quantidade (água de lavagem).	O sistema mais “ecológico”; Sistema de extração contínuo; Produção de reduzidas quantidades de águas residuais (0,2 m ³ de efluente líquido por tonelada de azeitona); Azeite com maior teor de antioxidantes; Elevada capacidade de laboração; Pouca mão-de-obra; Possibilidade de automatização; Pouco espaço para montagem das máquinas.	Necessidade de pessoal especializado; Maior quantidade de bagaço de azeitona (800 kg por tonelada de azeitona laborada); Alguns problemas com o bagaço de azeitona húmido.

Atualmente e de acordo com a Tabela 2.3., o sistema de extração mais utilizado é o contínuo de duas fases, verificando-se uma queda abrupta na utilização do sistema tradicional de prensas, explicada pelo desaparecimento da quase totalidade de lagares mais antigos que não conseguiram acompanhar as exigências impostas pela legislação.

Tabela 2.3. Evolução do número de lagares em exploração por sistema de extração (Fonte: INE, 2019).

Anos	Tipo de sistema de extração				
	Total	Tradicional	Contínuo duas fases	Contínuo três fases	Outros
1995	1 125	991	63	57	14
2005	603	342	128	133	0
2015	495	184	215	90	6
2018	486	140	261	80	5

2.3. Efluentes líquidos dos lagares de azeite

A extração de azeite gera um elevado volume de efluente líquido que, se negligenciado, se transforma num grave problema de poluição ambiental. Cada efluente deve ser avaliado quantitativa e qualitativamente e devem ser definidas medidas não só para reduzir o respetivo caudal de efluente e a carga poluente na origem, como também para assegurar o destino e tratamento do mesmo.

Com base no conhecimento das implicações ambientais, o setor do azeite tem vindo a desenvolver estratégias de gestão ecoeficientes, que visam a contenção do consumo de recursos, o controlo dos impactes ambientais e a valorização dos produtos e serviços. Os planos assentam na Avaliação do Ciclo de Vida (ACV), uma metodologia utilizada em todo o mundo, no apoio ao desenvolvimento sustentável e onde a sinergia produtos/tecnologias permite identificar e implementar medidas mais acertadas (Figueiredo *et al.*, 2015).

A atividade dos lagares resume-se essencialmente à obtenção de azeite a partir da azeitona e ao efluente líquido gerado por esta laboração, designado de águas ruças. Este efluente é uma mistura de água de vegetação do fruto e efluentes líquidos do processamento da azeitona, apresentando um elevado poder contaminante, em consequência do excessivo conteúdo orgânico e da baixa biodegradabilidade resultante da presença de compostos fenólicos (Peres e Santos, 1998).

2.3.1. Caracterização das águas ruças

As águas ruças apresentam uma composição complexa e fazem parte do conjunto de efluentes mais problemáticos nos países localizados na orla mediterrânica (Peres e Santos, 1998).

De acordo com o Conselho Oleícola Internacional (COI), consistem no resíduo líquido resultante do processo de produção de azeite, que incorpora a água de constituição da azeitona, a água de adição, a água de lavagem e uma percentagem variável de elementos sólidos.

De composição variável e dependente de fatores como as condições climáticas, grau de maturação da azeitona ou processo de extração do azeite, caracteriza-se pela cor escura e por conter diversas substâncias dissolvidas e em suspensão (Rodrigues *et al.*, 2015).

Um efluente com pH ácido e com elevada condutividade, cuja constituição típica por peso é: água (83 - 94%), matéria orgânica (4 - 16%) e sais minerais (0,4 - 2,5%).

A parte orgânica refere-se particularmente ao teor de lípidos ou gorduras, açúcares, substâncias azotadas, poliálcoois, ácidos voláteis, pectinas, taninos e polifenóis que dificultam os processos biológicos de depuração devido à sua atividade antimicrobiana (Rima *et al.*, 2004; Lafka *et al.*, 2011; Rahmanian *et al.*, 2014) e aos sais minerais nomeadamente fosfatos, carbonatos, sódio e potássio. Os compostos fenólicos são de baixo peso molecular (monoméricos) e de alto peso molecular (poliméricos). Os primeiros e apesar de serem tidos como biodegradáveis são responsáveis pela atividade fitotóxica e antimicrobiana das águas ruças, enquanto que aos segundos é atribuída a responsabilidade pela cor escura do efluente, menor toxicidade e biodegradabilidade reduzida (Assas *et al.*, 2000).

Estima-se que a nível mundial sejam produzidos 30 milhões de m³/ano, deste efluente extremamente poluente (Peres, 2007), com elevados valores de CQO e CBO₅, de natureza recalcitrante (Tabela 2.4.), ampla dispersão geográfica dos pontos de origem, diferentes sistemas de extração e carácter sazonal (novembro a fevereiro).

Tabela 2.4. Características físico-químicas de efluentes de lagares de azeite segundo vários autores.

Parâmetro	Unidades	Lucas e Peres, 2009	Alver <i>et al.</i> , 2015	Amaral-Silva <i>et al.</i> , 2016
Sistema de extração		Prensas	Três fases	Duas fases
pH	-	4,3	4,96	10
CQO	mg O ₂ /L	60 500	27 444	12 180
CBO ₅	mg O ₂ /L	10 200	4 500	615
Teor fenólico	mg C ₆ H ₅ OH/L	560	7 940	547
SST	mg/L	6 800	7 940	2 060
Azoto total	mg/L	-	181,49	-
Biodegradabilidade (CBO ₅ /CQO)	-	0,17	0,16	0,05

2.3.2. Tratamento das águas ruças

Quando descarregadas diretamente nos cursos de água ou no solo, as águas ruças causam uma séria destruição ambiental, nomeadamente a alteração da cor e contaminação das águas superficiais e subterrâneas, a devastação da vida aquática, a toxicidade nas plantas, a alteração da qualidade e decréscimo da fertilidade dos solos, para além dos maus odores (Mert *et al.*, 2010), pelo que têm vindo a intensificar-se os esforços para o desenvolvimento de sistemas de depuração eficientes.

Em consequência da complexidade deste efluente, ainda não foi encontrada a fórmula ideal para o seu tratamento e posterior valorização, sendo que até agora as intervenções praticadas são catalogadas de térmicas, físicas, biológicas e físico-químicas (Rahmanian *et al.*, 2014), verificando-se o aumento da eficiência do tratamento, quando utilizados mais do que um processo. A Figura 2.2. é representativa dos principais processos de tratamento das águas ruças.



Figura 2.2. Processos de tratamento de efluentes de lagoas de azeite (Fonte: Jerónimo, 2012).

São muito utilizadas as chamadas lagoas de evaporação (lagunagem), onde evapora a fase líquida da água ruça, em condições favoráveis de temperatura e humidade. Um processo simples, mas que requer cuidados com a impermeabilização do tanque, para evitar infiltrações (Ferraz, 2012) e que se mostra pouco eficaz, pois praticamente não reduz a carga orgânica nem a toxicidade do efluente (Amaral-Silva *et al.*, 2016), para além da geração de uma elevada quantidade de lamas, maus odores, proliferação de insetos, libertação de gases tóxicos para o ambiente, contaminação das águas subterrâneas e diminuição da superfície arável (Rahmania *et al.*, 2014; Peres e Santos, 2009).

É viável a aplicação direta do efluente no solo após a correção prévia do pH para rega de culturas arbóreas ou arbustivas de forma a economizar água potável, mas deve acontecer entre os meses de março e novembro e sem serem ultrapassados os 80 m³/ha/ano (Pinto, 2003).

Os processos físicos são, normalmente, postos em prática como pré-tratamento, com a finalidade de remover as partículas sólidas (Rahmanian *et al.*, 2014). Embora o uso das tecnologias de filtração de membranas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa) tenha vindo a crescer substancialmente, no tratamento das águas ruças, os custos de manutenção são excessivos, devido às incrustações que se desenvolvem nas membranas (*fouling*) e à consequente colmatação (Rahmanian *et al.*, 2014, Gebreyohannesa *et al.*, 2016).

Mais vantajosos, a nível ambiental, são os processos biológicos aeróbios e anaeróbios, onde são utilizados microorganismos que crescem no meio. No entanto, o cariz sazonal das águas ruças, a sua elevada toxicidade e difícil degradação (Brito e Rangel, 2008; Martins *et al.*, 2010), faz com que estes processos também não sejam totalmente eficazes, embora diminuam a carga orgânica e produzam menor quantidade de lamas.

De entre os processos físico-químicos mais viáveis economicamente, estão a precipitação e a neutralização, mas apenas se consegue uma diminuição dos valores de CQO entre os 20 e 30% (Rahmanian *et al.*, 2014).

A conquistar cada vez mais aprovação, estão os processos de oxidação avançados (POA), que se evidenciam pela formação de radicais livres fortemente reativos. Estes, em consequência do seu forte poder oxidante, possuem a capacidade de reação com a generalidade dos compostos orgânicos que constituem o efluente, conduzindo potencialmente à sua mineralização (Stasinakis, 2008).

A aplicação do processo de Fenton no tratamento de águas ruças tem vindo a ser cada vez mais explorada, tendo em conta que não requer elevados valores de temperatura nem de alta pressão e também não são necessários equipamentos demasiadamente complexos que onerem o processo de degradação da matéria orgânica presente no efluente.

Este processo é influenciado pela concentração de Fe²⁺ e de H₂O₂, pelo pH inicial do efluente e pela temperatura da reação, ou seja, tem por base a formação de radicais hidroxilo (HO[•]) originados pela reação de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), na presença de iões de ferro em condições ácidas.

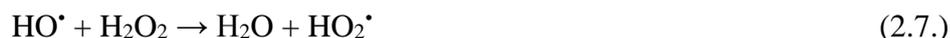
Verifica-se a mistura de H₂O₂ com sais de ferro II, formando radicais hidroxilo (HO[•]):



Uma vez gerados, os radicais hidroxilo atacam virtualmente todos os compostos orgânicos (Lucas e Peres, 2011), numa sequência complexa de reações, em meio aquoso:



Por sua vez, os íons Fe^{3+} podem catalisar o H_2O_2 , formando-se O_2 e H_2O , participar na regeneração de íons de Ferro II e produzir radicais, conforme as equações (2.3.) a (2.7.).



A equação (2.7.) mostra que o H_2O_2 pode iniciar a reação ou pode consumir radicais HO^\bullet . Por sua vez, estes podem oxidar compostos orgânicos (RH) pela extração de prótons H^+ e produção de radicais R^\bullet , que são muito reativos e podem ser oxidados:



Os radicais livres formados na reação (2.8.) podem ser oxidados pelo Fe^{3+} (2.11.), reduzidos pelo Fe^{2+} (2.12.) ou, dimerizados (2.13.):



Podem verificar-se reações simultâneas, nomeadamente com os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} formados nas reações (2.11.) e (2.12.), que reagem com os íons hidróxido (OH^-), formando complexos de hidróxido de ferro II e hidróxido de ferro III, que podem apresentar-se em diversas formas mais ou menos hidratadas conforme o pH do meio.

2.3.3. Enquadramento jurídico

“Cuidar da água é essencial para preservar a vida.”

Em Portugal e na generalidade dos países industrializados existe legislação para proteção dos recursos disponíveis e que tem em conta os impactes causados pelos resíduos de cada atividade. O quadro legislativo para os efluentes da indústria extrativa do azeite é resumido pela Figura 2.3.

Decreto-Lei 236/98 de 1 de agosto	Estipula objetivos, critérios e normas para proteção do meio aquático e melhoramento da qualidade das águas.
Despacho conjunto nº 118/2000, de 3 de fevereiro	Programa para a prática de medidas de modernização ambiental no setor dos lagares de azeite.
Despacho conjunto nº 626/2000, de 6 de junho	Definição de normas para a utilização das águas ruças na rega de solos agrícolas.
Lei da Água (Lei nº 58/2005, de 29 de dezembro)	Definida com o propósito de minimizar o consumo e assegurar a manutenção da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, bem como a proteção de todos os recursos hídricos.
Despacho nº 8276/2007, de 9 de maio	Deliberação da estratégia nacional para os efluentes Agropecuários e Agroindustriais, com vista ao tratamento e valorização dos seus efluentes.

Figura 2.3. Resumo do quadro legislativo para os efluentes dos lagares de azeite (APA, 2020).

O Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto revogou o Decreto-Lei nº 74/90 de 7 de março, com introdução do conceito de Valor Limite de Emissão (VLE), em vez de Valor Máximo Admissível (VMA).

O VLE exprime a massa, em unidades específicas para cada parâmetro, a concentração ou o nível de emissão da matéria, que não deve ser excedido, aquando da descarga no meio aquático e no solo. A Tabela 2.5. apresenta os VLE segundo o Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto para parâmetros típicos da caracterização de efluentes.

Tabela 2.5. Valores limite de descarga e de emissão para águas residuais industriais (Decreto-Lei nº 236/98 - Anexo XVIII).

Parâmetro	VLE	Unidades
pH	6 - 9	Escala de Sorensen
CQO	150	mg O ₂ /L
CBO ₅	40	mg O ₂ /L
SST	60	mg/L
Fenóis	0,5	mg C ₆ H ₅ OH/L
Azoto total	15	mg N/L
Fósforo total	10	mg P/L

Cada município tem autonomia para definir os limites de descarga em coletor municipal, mas por norma todos se regem pelas características de um esgoto doméstico bruto, onde:

CQO = 1000 mg O₂/L, CBO₅ = 500 mg O₂/L e SST = 1000 mg/L.

Igualmente importante é referir a Lei nº 50/2006, de 29 de agosto, que faz referência à aplicabilidade das contraordenações ambientais e o Decreto-Lei nº 174/2008 que imputa responsabilidades pelos danos ambientais causados.

2.3.4. Valorização das águas ruças

Tem sido crescente o esforço de valorização das águas residuais dos lagares de azeite, de modo a conseguir acrescentar-se-lhes valor comercial. No entanto, ainda não foi encontrada uma solução eficaz e economicamente sustentável, tendo em conta que se tem mostrado muito difícil reduzir os valores de CQO de 30 000 - 100 000 mg/L para números aproximados do valor limite de emissão legislado (150 mg O₂/L).

Pode referir-se a bioconversão deste detrito em fertilizantes e biopolímeros, a indústria de produtos alimentares para animais, ou o mercado dos biocombustíveis, mas a realidade aponta para a necessidade de mais estudos laboratoriais e de eficiência (Dermeche *et al.*, 2013).

A comunidade científica tem explorado a recuperação de compostos antioxidantes naturais, também presentes nos compostos fenólicos das águas ruças, com especial interesse para as indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica, na medida em que são eficientes em frustrar a oxidação lipídica em alimentos e interditar reações de oxidação nos sistemas biológicos, com conseqüente prevenção e tratamento de doenças (Dermeche *et al.*, 2013; Leouifoudi *et al.*, 2015).

A valorização destas águas residuais poderá ainda passar pela sua reutilização, após tratamento, de acordo com o Decreto-Lei n.º 119/2019 de 21 de agosto, que “estabelece o regime jurídico de produção de água para reutilização, obtida a partir do tratamento de águas residuais, bem como da sua utilização”.

O aproveitamento de águas residuais tratadas promove o bem-estar ambiental, social e económico. Uma boa prática de gestão da água, que contribui para o uso sustentável dos recursos hídricos, com redução das emissões de gases com efeito de estufa, alívio da pressão decorrente da diminuição dos volumes captados e menores custos de investimento e energia, em linha com os princípios da economia circular.

2.4. Microalgas

O termo microalgas não possui valor taxonómico e engloba microorganismos algais com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, sendo que a sua caracterização sistemática significa a consideração de uma série de critérios (Raven *et al.*, 2001), nomeadamente a natureza química dos produtos de reserva, os constituintes da parede celular, a ocorrência de células flageladas e os processos de formação do núcleo (Tomaselli, 2004).

Falamos de estrutura celular procariótica, com representação nas divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta* e de estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta*, *Heterokontophyta*, *Cryptophyta* e *Dinophyta* (Derner *et al.*, 2006).

Pese embora as desigualdades estruturais e morfológicas, o metabolismo de todas as microalgas é análogo ao das plantas e podem ser encontradas em água doce, salgada ou no solo, sendo consideradas responsáveis por mais de 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2004). Presume-se que existam mais de 100 000 espécies de microalgas, ainda que apenas 35 000 dessas espécies sejam conhecidas (Richmond e Hu, 2013).

As células das microalgas podem produzir a sua própria energia utilizando luz e dióxido de carbono (autotróficas), podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, no qual usam compostos orgânicos como energia e fonte de carbono e podem utilizar, simultaneamente, a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia e dióxido de carbono e o substrato orgânico como fontes de carbono - cultivo mixotrófico (Chojnacka e Marquez-Rocha, 2004).

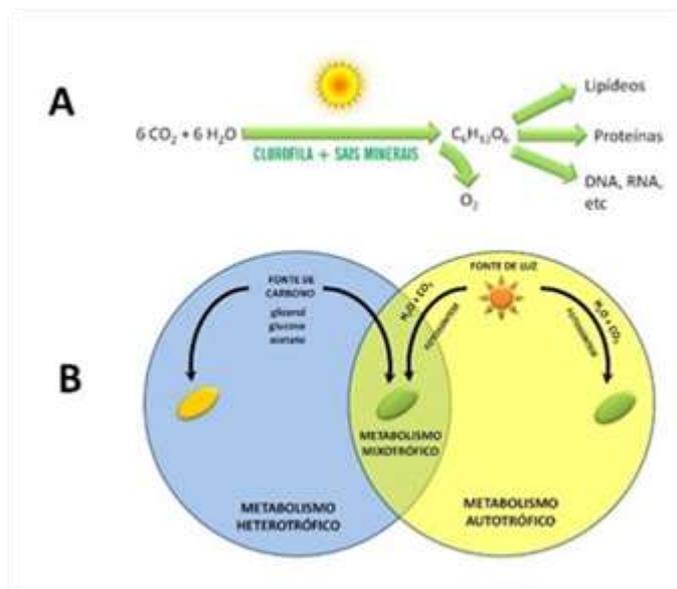


Figura 2.4. Metabolismo das microalgas: (A) representação da fotossíntese (B) diferenças entre os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

A fotossíntese (processo autotrófico) é a componente chave da conversão da radiação solar e do CO₂ absorvido pelos cloroplastos em trifosfato de adenosina (ATP) e O₂, que é então usado na respiração para produzir energia e apoiar o crescimento. No processo heterotrófico, os substratos de carbono orgânico substituem a energia luminosa, permitindo um maior controlo do crescimento (Brennan e Owende, 2010).

Nas culturas mixotróficas verifica-se a redução da fotoinibição e a melhoria das taxas de crescimento, dando-se a integração de componentes fotossintéticos e heterotróficos durante o ciclo diurno, que reduz o impacto da perda de biomassa durante a ausência de luz e diminui a quantidade de substâncias orgânicas utilizadas durante o crescimento (Brennan e Owende, 2010).

Tabela 2.6. Características das diferentes formas de metabolismo das microalgas (Adaptado de: Chen *et al.*, 2011).

Metabolismo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Autotrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou Composto orgânico	Inorgânico ou Orgânico
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânico

Variados estudos mostram os benefícios do cultivo mixotrófico em relação a outros sistemas. Culturas mixotróficas de microalgas (*Chlorella* sp. e *Nannochloropsis* sp.), que usam glicose como fonte de carbono, mostraram-se muito mais eficientes na produção de biomassa e lipídios do que as culturas fotoautotróficas e heterotróficas (Cheirsilp e Torpee, 2012).

Um trabalho adicional mostrou que *Chlorella vulgaris* cultivada em sacarose com luz, sob condições mixotróficas, superou a produtividade lipídica em comparação com outros modos de crescimento (Rattanapoltee e Kaewkannetra, 2014). Ainda Mandal e Mallick, 2009, mostraram que culturas de *Scenedesmus obliquus* suplementadas com glicose apresentaram maior rendimento de biomassa e lipídios que culturas sem suplementação.

As microalgas requerem pequenas áreas de cultivo, feito de forma contínua e em pouco tempo. Dispensam a utilização de agrotóxicos e precisam de cuidados simples, nomeadamente reposição mineral, controlo de pH, ajuste de luminosidade e disponibilidade de nutrientes (Bertoldi *et al.*, 2008). Podem utilizar o CO₂ como fonte de carbono para se multiplicarem e produzirem compostos de interesse, contribuindo para a diminuição dos GEE (Gases de Efeito Estufa), responsáveis pelos efeitos do aquecimento global.

A biomassa obtida a partir do cultivo de microalgas possui grande importância nutricional, económica e ecológica, podendo ter como destino as indústrias alimentar, farmacêutica e da biorrefinaria (Radmann e Costa, 2008).

2.4.1. Produção da biomassa microalgal

A primeira crise petrolífera, na década de setenta, marcou o início do grande interesse pela utilização de microalgas nas energias renováveis (Mata *et al.*, 2010).

É fundamental ter em conta a espécie de microalga a ser utilizada e onde será cultivada, bem como os aspetos biológicos (1) e económicos (2) associados. A considerar: (1) a exigência nutricional da microalga, que deve ser capaz de crescer em meios de cultivo de baixo custo; resistência da espécie a fatores físicos e químicos; produtividade da biomassa, indicativa da taxa de ganho de massa total da microalga, num determinado volume e em determinado período de tempo $\rightarrow \text{massa}(m)/(\text{volume}(v)*\text{tempo}(t))$; conteúdo e produtividade de lípidos, proteínas, hidratos de carbono e estabilidade da genética do material. (2) a disponibilidade da espécie de interesse; custos de aquisição da microalga e custos de manutenção da cultura.

As microalgas podem ser cultivadas usando métodos mais controlados, ou seja, em laboratório, ou em tanques ao ar livre, com volumes e características diversas, devendo haver

um equilíbrio entre eficiência e custos operacionais. A formação da biomassa microalgal resulta diretamente da fotoconversão, isto é, da transformação química da energia luminosa que incide sobre o organismo, em biomassa, estando fortemente condicionada pela localização dos meios de produção.

2.4.1.1. Técnicas de cultivo

Os sistemas abertos são os mais simples e com menores custos de instalação, indo desde lagoas sem qualquer mecânica de mistura, até aos *raceway ponds* (RWP, Figura 2.5.) que são tanques de recirculação a céu aberto, com *turf scrubber*. Nos *raceways* podem ser utilizadas microalgas filamentosas que se desenvolvem sobre uma tela por onde flui uma solução com excesso de nutrientes (Bjerk, 2012). São sistemas construídos por materiais acessíveis como o PVC, mas apresentam como principal limitação a elevada profundidade. Não permitindo a penetração da luz na totalidade do seu volume, limitam os cálculos da produtividade de microalgas (Benemann e Oswald, 1996).

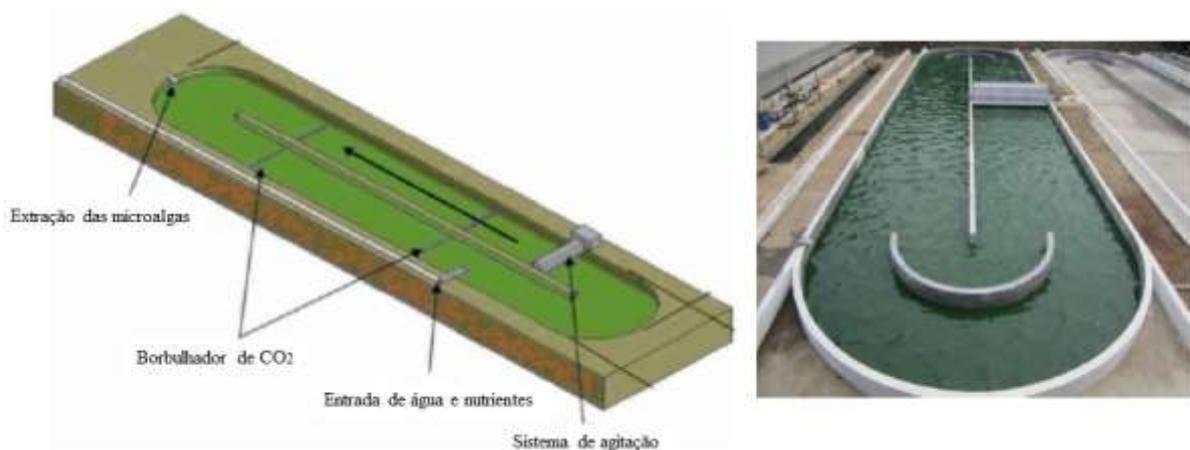


Figura 2.5. *Raceway open pond.*

Nos sistemas fechados, o principal sistema de cultivo em grande escala são os fotobiorreatores (Bjerk, 2012). Estes sistemas consistem em reatores transparentes de vidro ou plástico, convencionalmente tubulares (Figura 2.6.) e com o objetivo de maximizar a exposição da biomassa à luz. Nos fotobiorreatores é possível controlar a quase totalidade dos parâmetros bióticos e abióticos, tais como o pH, a temperatura, a velocidade de agitação e o arejamento.

As Tabelas 2.7. e 2.8. resumem as principais vantagens e desvantagens, apresentadas pelos sistemas aberto e fechado.

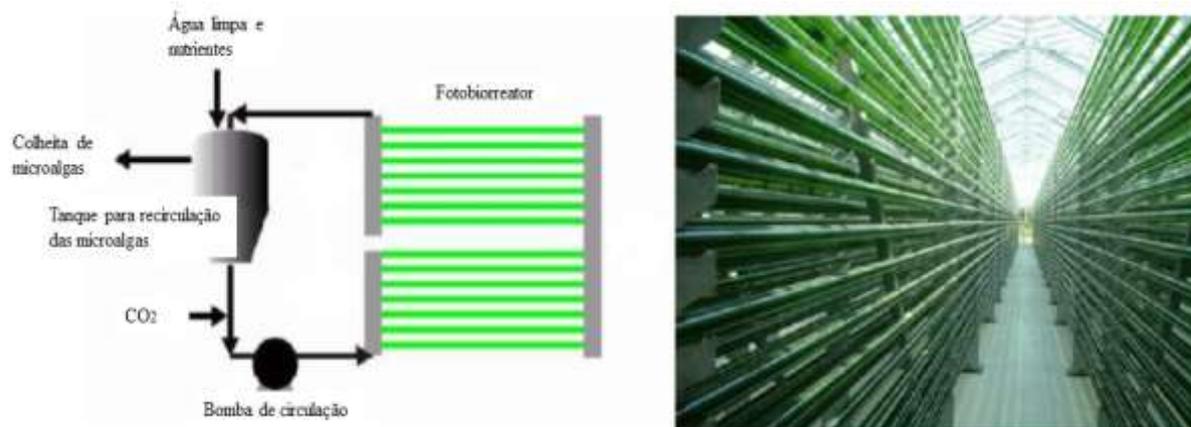


Figura 2.6. Exemplo de um fotobiorreator tubular (Fonte: Pérez, 2007).

Tabela 2.7. Principais vantagens e desvantagens dos sistemas abertos (Adaptado de: Lam e Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012; Demirbas, 2010).

Vantagens	Desvantagens
Menor investimento	Necessidade de grandes extensões de terra
Simplicidade na operação	Dependência das condições climáticas
Menores custos de produção	Elevado grau de contaminação
Baixos custos energéticos	Dificuldade de controlo dos parâmetros operacionais
	Taxa de evaporação excessiva
	Menor produtividade

Tabela 2.8. Principais vantagens e desvantagens dos sistemas fechados - Fotobiorreatores (Lam e Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012; Singh e Sharma, 2012; Demirbas, 2010).

Vantagens	Desvantagens
Maior produtividade e concentração de biomassa	Elevado investimento
Controlo do pH, temperatura, nutrientes e CO ₂	Elevados consumos energéticos
Tempo de colheita mais curto / Viabilidade de produção de monoculturas	Investimento arrojado
Menor área de implantação	Complexidade na operação
Maior uniformidade na produção	Forte dependência do ângulo da incidência solar
Baixo grau de contaminação	
Menores perdas de gás carbónico	
Possibilidade de produção de compostos biofarmacêuticos complexos	

Por norma, o estudo do crescimento dos organismos é realizado em descontínuo e em sistema fechado (*batch*). A inoculação no meio de cultura com a fonte de energia apropriada, conduz ao crescimento que, por sua vez, apresenta fases típicas e de acordo com a figura 2.5.

A fase de crescimento corresponde a um aumento exponencial da densidade populacional em que todos os constituintes da biomassa aumentam com a mesma taxa específica (μ).

A representação gráfica do logaritmo natural da densidade populacional em função do tempo - crescimento exponencial - traduz uma relação linear em que o seu declive corresponde ao valor da taxa específica de crescimento, permitindo o cálculo de evolução dos organismos e em função das condições do meio de crescimento (Ferreira *et al.*, 1998).

Uma vez determinada a curva de crescimento para cada estirpe e para determinadas condições, é possível estimar a densidade à qual uma cultura se deve encontrar, antes de ser transferida para novo meio.

Em meios compostos por mais do que um substrato, verifica-se a repressão catabólica que conduz a fases de latência para adaptação a cada um dos substratos - crescimento diáuxico.

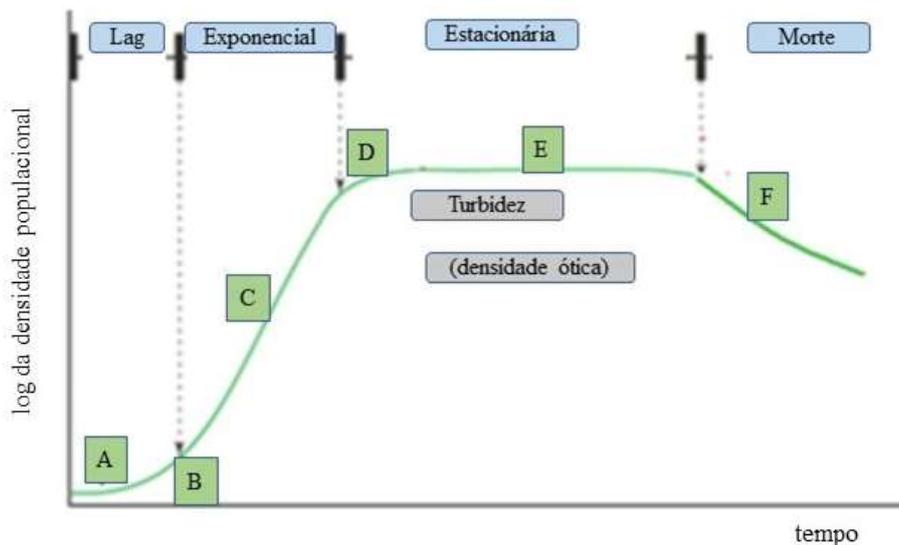


Figura 2.7. Ciclo de crescimento em sistema fechado. (A) fase de latência ou lag, $\mu = 0$; (B) fase de aceleração, $\mu < \mu_{max}$; (C) fase exponencial, $\mu = \mu_{max}$; (D) fase de desaceleração, $\mu < \mu_{max}$; (E) fase estacionária, $\mu = 0$; (F) fase de morte (Adaptado de Ferreira *et al.*, 1998)

2.4.1.2. Colheita

A recuperação ou colheita consiste na remoção da biomassa microalgal do meio de cultivo, dando-se a separação sólido-líquido, através de processos físicos (sedimentação, centrifugação, filtração ou ultrafiltração), químicos (floculação, coagulação ou flotação) ou biológicos. A escolha da técnica de colheita depende das propriedades das microalgas e do sistema de cultivo (tamanho das partículas, densidade celular, qualidade dos produtos desejados), bem como dos recursos operacionais e financeiros.

Praticamente todos os métodos de produção de biomassa microalgal originam soluções diluídas, com 0,02 a 0,05% de sólidos. Numa primeira fase são aglutinadas as microalgas em suspensão, habitualmente por processos de sedimentação por gravidade, floculação ou flotação e, numa segunda fase, procede-se à concentração da biomassa recorrendo-se à filtração, centrifugação ou agregação ultrassónica (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

O início da separação da suspensão das microalgas é determinante na redução do consumo energético da colheita. Estudos de avaliação do ciclo de vida (ACV), nos quais foram utilizadas as técnicas de centrifugação ou filtração por prensagem revelaram um gasto de 90% de toda a energia utilizada no ACV, inviabilizando estes processos na colheita das microalgas à escala comercial (Lam e Lee, 2012).

A flotação baseia-se no borbulhar de ar através da suspensão das microalgas, fazendo com que estas se aglomerem à superfície (Parmar *et al.*, 2011). Uma técnica que se mostra mais eficiente do que a sedimentação e que, apesar de dependente dos valores de pH e da força iónica, pode ser melhorada pela adição de sais polieletrólitos e sais de alumínio ou ferro (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

A técnica de sedimentação ou decantação requer muito espaço e revela-se muito morosa, uma vez que tem por base a diferença de densidade meio/partículas, o que nas microalgas é muito similar. Por exemplo, a *Chlorella* sp. tem uma densidade 1,070 g/cm³, muito próxima da densidade da água a 20°C (água doce 0,998 g/cm³ ou água salgada 1,025 g/cm³), estimando-se um tempo médio de sedimentação de 0,1 a 0,2 m/dia para todas as microalgas verdes e diatomáceas (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

O processo de submissão das células microalgais em suspensão a uma onda ultrassónica, a rápida sedimentação pela força da gravidade quando o campo é desligado. Contudo, este processo de separação por ultrassons ainda se encontra em desenvolvimento, sendo para já difícil a sua aplicação em larga escala (Suali e Sarbatly, 2012).

Na filtração recorre-se a um filtro ou membrana que retém as partículas sólidas em suspensão no fluído. Uma técnica que pode revelar-se demorada, mas eficiente, nomeadamente no caso da *Arthrospira* sp., onde as células são relativamente grandes e é fácil separar a biomassa da água por filtração. Uma alternativa amplamente utilizada é o processo de filtração de fluxo tangencial, no qual o fluxo principal é paralelo à membrana filtrante e perpendicular ao fluxo permeado (Pires *et al.*, 2012). Este método apresenta elevados custos de manutenção, devido à substituição das membranas e à bombagem, consumindo bastante energia (0,3 a 2 kWh/m³), mas é já utilizado em larga escala (Abdelaziz *et al.*, 2013B).

A floculação (floculação química, biofloculação e eletrofloculação) consiste no aumento do tamanho dos agregados de células, por adição de um composto destabilizante das partículas em suspensão - floculante, que posteriormente depositam por gravidade (Suali e Sarbatly, 2012). É muito utilizada nas culturas de microalgas, por ser rápida, simples e com custos mais reduzidos, embora se verifique contaminação da biomassa, o que limita a sua aplicação (Pires *et al.*, 2012). Os floculantes mais eficazes são os de elevado peso molecular, normalmente polímeros, que podem ser naturais ou sintéticos (Suali e Sarbatly, 2012). Para tornar o processo mais eficiente, o coagulante deve estar eletricamente carregado com carga positiva, uma vez que as células das microalgas têm sempre carga negativa. Desta forma as cargas opostas atraem-se e ficam em suspensão por longos períodos de tempo, mesmo sem agitação. A floculação permite atingir eficiências de colheita superiores a 90% e densidades de biomassa da ordem dos 15 g/L (Pires *et al.*, 2012).

Quando são libertados iões metálicos dos elétrodos, sem que a biomassa microalgal seja contaminada, falamos do processo de eletrocoagulação e os custos são reduzidos (Pires *et al.*, 2012). Como as microalgas são dotadas de carga negativa, aproximam-se do ânodo e formam agregados que ascendem à superfície com a ajuda das bolhas de oxigénio que resultam da eletrólise da água (Poelman *et al.*, 1997), permitindo recuperar a quase totalidade da biomassa microalgal.

A centrifugação consiste na separação das partes sólida e líquida pela força centrífuga e é o processo mais utilizado em laboratório, uma vez que é rápida e não são necessários reagentes para se conseguir a deposição das partículas suspensas no líquido. O elevado gasto energético acaba por ser compensado pela elevada eficiência, que ronda os 95 a 100% para centrifugações de 13 000 g e 80 a 90% de eficiência para centrifugações entre 500 - 1000 g (Abdelaziz *et al.*, 2013B), mas o risco de danos na estrutura celular é um ponto fraco.

2.4.1.3. Secagem

A biomassa microalgal recuperada possui, ainda, muita humidade e passa por um processo de desidratação que pode ser:

- a) Em estufa → exposição a um fluxo contínuo de ar quente, entre 12 a 24 horas e a uma temperatura compreendida entre os 70 e os 100°C (Ferreira *et al.*, 2013);
- b) Em liofilizador → a biomassa microalgal é congelada abaixo do ponto supercrítico e submetida a baixas pressões (1 kPa) e temperaturas (- 40°C) permitindo que os cristais de gelo sublimem. É um procedimento muito caro, mas que permite manter as propriedades originais da biomassa (Lee *et al.*, 2012).
- c) Em secador solar → elevada dependência das condições climáticas, falta de controlo operacional, necessidade de muito espaço e tempo. No entanto, segundo Ferreira *et al.*, 2014, foi concebido pelo Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) um protótipo de secador solar (SECMAD) com uma capacidade para 0,28 m³ e uma superfície de coletor solar de 0,8 m², que permite secar cerca de 1 a 2 kg de biomassa microalgal. Verifica-se o decréscimo da humidade de 85 para 5%, em 3 a 4 horas, bem como a possibilidade de operar com uma pequena ventoinha de 20 W para forçar a ventilação de ar.
- d) Por nebulização → bombeamento da solução e/ou suspensão para um atomizador com consequente encaminhamento das gotículas, em forma de spray, para uma câmara de secagem com ar quente, na qual as partículas passam de líquidas a sólidas e, posteriormente, recolhidas num sistema de recolha de pó (Braga, 2005).
- e) *Drum-drying* → consiste na utilização de um tambor cilíndrico que gira continuamente e sobre o qual é feito um aquecimento uniforme, a vapor e sem contacto com o produto. É aplicada uma fina partícula da biomassa no exterior do tambor, aquecido apenas o interior do mesmo e, a cada rotação, os flocos secos são raspados por uma lâmina. Em 1984, Shelef, Sukenike e Green, utilizaram um tambor de superfície 0,5 m², com capacidade evaporativa de 20 L/h/m² de biomassa com concentração inicial de 30% em sólidos e consumo de 52 kWh. Escolheram a espécie *Scenedesmus* sp. e obtiveram excelentes resultados na extração do óleo da sua biomassa, porque à semelhança do que acontece na liofilização, esta técnica auxilia a ruptura celular e a desidratação da biomassa.

2.4.1.4. Rutura celular e extração

A rutura celular sucede à secagem da biomassa microalgal e permite a melhor extração dos compostos que se pretende valorizar. Por se tratar de organismos muito pequenos e com parede celular, são aplicados procedimentos físicos, químicos ou enzimáticos (Figura 2.6.).

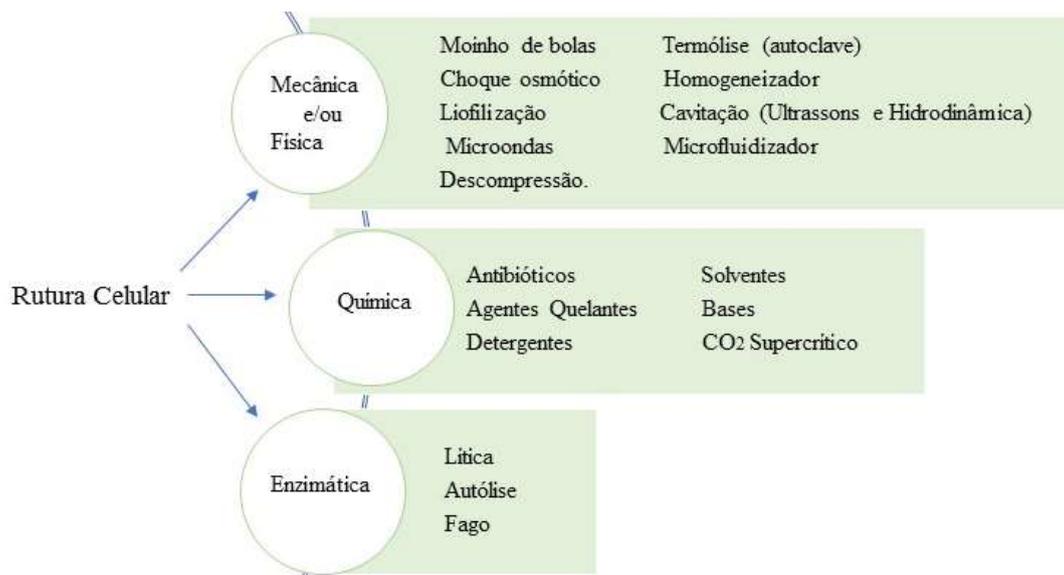


Figura 2.8. Classificação dos processos de rutura celular aplicáveis a microalgas (Adaptado de: Lee *et al.*, 2012).

Do ponto de vista energético, os processos físicos ou mecânicos são mais exigentes do que os químicos e enzimáticos, mas acabam por ser mais utilizados, por estarem menos dependentes da espécie de microalga, por permitirem contaminações inferiores dos compostos extraídos e por não provocarem desnaturação das enzimas e proteínas presentes nas células.

Para a extração dos compostos da biomassa microalgal, os métodos mais utilizados são:

1 - Extração acelerada por solvente (ASE): consiste na aplicação de solventes orgânicos, a pressão e temperatura inferiores ao seu ponto de ebulição, permitindo remover lípidos e pigmentos. É uma técnica com cerca de 30 anos e assemelha-se à normal extração por solventes químicos, pelo método Soxhlet, pois são utilizados os mesmos solventes e a biomassa é identicamente colocada num cartuxo e submetida ao fluido extrator a temperaturas entre os 50 e 200°C, cerca de 5 a 10 minutos e pressão compreendida entre as 34 e 204 atm. Segue-se a utilização de um co solvente, em forma de gás comprimido, para remover a amostragem para outro reservatório (Cooney *et al.*, 2009).

Um ensaio para aprimorar esta técnica na extração de antioxidantes da *Spirulina platensis* atestou que entre hexano, éter de petróleo, etanol e água, o etanol era o solvente mais

eficiente no processo. Foi igualmente determinado que os parâmetros com maior e menor influência na extração são a temperatura e o tempo, respetivamente (Herrero, *et al.*, 2005).

2 - Extração com solventes químicos: também apelidado de método Soxhlet, é o mais frequente para a biomassa microalgal, caracterizado pelas altas seletividade e solubilidade do solvente químico com os lípidos.

O solvente mais comum é o n-hexano, mas também se usam o metanol, o etanol e uma mistura de metanol com clorofórmio. No entanto, esta técnica apresenta desvantagens que passam pela toxicidade dos solventes e pelo facto de os mesmos derivarem de combustíveis fósseis, à exceção do etanol que pode ser obtido de fontes renováveis (Lam e Lee, 2012).

3 - Extração com CO₂ supercrítico: a extração com fluidos supercríticos tem por base o atingir de uma determinada fase, chamada de supercrítica, posicionada para além do ponto crítico de um fluido, na qual desvanece a separação das fases líquida e gasosa e fica somente uma fase homogénea (Sawangkeaw *et al.*, 2010). Nesta fase, a temperatura e a pressão alteram as propriedades termofísicas (densidade, viscosidade, difusidade) e o fluido converte-se num super solvente. O CO₂ é exímio na extração de produtos farmacêuticos relacionados com microalgas (Lam e Lee, 2012) e distingue-se de outros solventes químicos por não ser tóxico, não proporcionar ambiente oxidativo, por possuir baixa temperatura crítica (aproximadamente 31°C), por ter elevada difusividade e baixa tensão superficial e, ainda, por ser fácil separá-lo após a extração, à temperatura ambiente. Num trabalho realizado por Nobre *et al.*, 2013 com a espécie *Nannochloropsis* sp., a extração com CO₂ supercrítico foi mais eficiente, verificando-se maior rendimento em lípidos e pigmentos do que na utilização do método Soxhlet quer com o solvente n-hexano quer com o etanol.

2.4.2. Composição proximal das microalgas

As microalgas caracterizam-se pela riqueza em macronutrientes, micronutrientes e compostos bioativos - aminoácidos, ácidos gordos polinsaturados, lípidos, hidratos de carbono estruturais e não estruturais, vitaminas, minerais, antioxidantes e pigmentos (Batista *et al.*, 2013; Bennamoun *et al.*, 2015), sendo que a todas as concentrações se encontram dependentes do género, da espécie, do tempo de cultivo, das necessidades metabólicas, bem como das exigências físico-químicas e nutricionais de crescimento (Spolaore *et al.*, 2006).

No que respeita aos fatores físico-químicos, evidenciam-se (a) a intensidade da luz, que perturba a realização de fotossíntese, as funções celulares e a formação de polissacarídeos e de

ácidos gordos (Hu, 2004; Kumar *et al.*, 2014); (b) o pH, que prejudica categoricamente o crescimento (Kumar *et al.*, 2014); e (c) a temperatura, que causa impactos na composição em lípidos, aminoácidos, e carotenoides das microalgas (Hu, 2004).

No mesmo seguimento, a disponibilidade de nutrientes condiciona fortemente o desenvolvimento das microalgas, especialmente o azoto (N), o fósforo(P) e o ferro (Fe).

A carência em N e P promove a diminuição do teor de clorofilas e o aumento da produção de hidratos de carbono e lípidos, respetivamente, enquanto o Fe, que é um micronutriente relevante na composição bioquímica das células, pode intervir na fotossíntese, na respiração, na síntese de ADN e na fixação do azoto (Hu, 2004).

Por sua vez, o tempo de cultivo de cada espécie de microalga desencadeia a acumulação de biomassa, de lípidos, de ácidos gordos polinsaturados e de compostos lipofílicos, como os pigmentos (Hu *et al.*, 2015).

Na sua generalidade, a matéria seca (MS) das microalgas é composta por 12 a 71% de proteína (Christaki *et al.*, 2011), 10 a 57% de hidratos de carbono, maioritariamente polissacarídeos, como celulose e amido (Chen *et al.*, 2013), e 6 a 86% de lípidos, particularmente esteróis e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6 (Spolaore *et al.*, 2006), conforme podemos observar na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Composição proximal (g/100, g MS) de algumas espécies de microalgas. (Adaptado de: Anele *et al.*, 2016; Christaki *et al.*, 2011; Madeira *et al.*, 2017 e Priyadarshani e Rath, 2012).

Microalga	Proteína	Hidratos de carbono totais	Fibra	Lípidos
<i>Arthrospira platensis</i>	60,3-65,8	16,8-23,6	0,50-1,80	1,80-7,30
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62,0	23,0	ND	3,00
<i>Chlorella vulgaris</i>	41,0-58,0	12,0-29,8	0,40-14,4	10,0-34,8
<i>Diacronema vikianum</i>	57,0	32,0	ND	6,0
<i>Dunaliella bioculata</i>	49,0	4,00	ND	8,00
<i>Dunaliella salina</i>	39,0-61,0	14,0-32,0	ND	14,0-20,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	29,0	14,0	ND	11,0
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48,0	27,0	ND	15,0
<i>Isochrysis</i> sp.	27,0-45,4	13,3-18,0	< 18,0	17,2-27,3
<i>Micractinium reisseri</i>	14,6	30,1	10,7	32,3
<i>Nannochloris bacillaris</i>	13,8	27,2	25,9	35,4
<i>Nannochloropsis granulata</i>	35,0	14,9	ND	28,5
<i>Porphyridium</i> sp.	29,7-38,5	26,5-57,0	0,30-0,50	6,10-14,0
<i>Scenedesmus</i> sp.	28,5	36,4	27,7	11,5
<i>Schizochytrium</i> sp.	12,1	32,0	0,60	38,0-71,1
<i>Spyrogira</i> sp.	6,0-20,0	33,0-64,0	ND	11,0-21,0
<i>Spirulina maxima</i>	60,0-71,0	8,00-16,0	ND	4,00-9,00
<i>Tetracystis</i> sp.	13,2	27,7	26,2	36,1

ND - não determinado

2.4.3. Produtos não-energéticos e energéticos das microalgas

As microalgas possuem a capacidade de elaborar produtos não energéticos, como carboidratos, proteínas e bioprodutos de elevado valor, como pigmentos, vitaminas e ácidos gordos polinsaturados. *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, são as microalgas com maior interesse comercial e as que são produzidas em maior escala (Brennan e Owende, 2010).

A forte dependência dos combustíveis baseados no petróleo, que é finito, e a crescente preocupação com os impactos ambientais provocaram o aumento da procura por biocombustíveis, com a conseqüente expansão de novas alternativas de energias renováveis, que conciliem a supressão da necessidade de novas tecnologias com ideias ambientalmente aceitáveis e com a capacidade de aproveitamento de resíduos (Singh, 2010).

As microalgas podem ser usadas para a produção de biocombustíveis líquidos (bioetanol, biodiesel, biobutanol e bio óleo) ou biocombustíveis gasosos (biometano, biohidrogénio, gás), sendo a fotossíntese a base todos os processos sintéticos de biocombustíveis e onde se verifica a conversão de energia solar em biomassa, produtos de armazenamento de carbono e/ou H₂ (Beer *et al.*, 2009).

2.4.4. Algumas aplicações para as microalgas

A diferente composição das microalgas dá origem a diferentes aplicações da sua biomassa e podem ser usadas como matéria-prima para a obtenção de vários produtos.

A alimentação animal é um dos possíveis destinos das microalgas, se atendermos ao elevado teor em proteína e aminoácidos essenciais (Kovač *et al.*, 2013). Por exemplo a *Chlorella*, que regista valores proteicos na ordem dos 50 a 60%, equipara-se aos valores de proteína apresentados por leveduras, proteína do leite e soja (Kovač *et al.*, 2013). Uma séria candidata, por exemplo, à produção de bagaço de soja, ajudando a diminuir a dependência da importação deste alimento pela União Europeia (UE).

Os hidratos de carbono das microalgas incluem uma porção de fibra dietética, ou seja, são hidratos de carbono estruturais (Gutiérrez-Salmeán *et al.*, 2015), favoráveis à flora microbiana do intestino dos animais.

No teor de fibra total e apesar do mesmo se situar entre os 36 e os 95% dos hidratos de carbono totais, as microalgas apresentam baixo teor em hemicelulose e nenhuma lenhina

(Tibbetts *et al.*, 2015), depreendendo-se que a sua parede celular é fortemente digestível, embora variável entre espécies.

As microalgas são, ainda, fonte relevante de lípidos, singularmente de ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e ómega-6. Dos ácidos gordos polinsaturados ómega-3, destacam-se o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA), com propriedades nutracêuticas e que têm sido associados a efeitos benéficos na saúde humana - redução da doença vascular cerebral, arteriosclerose, processos inflamatórios e doenças metabólicas como a obesidade e o cancro (Calder, 2006; Colomer *et al.*, 2007; Larsson *et al.*, 2004). O DHA é maioritariamente produzido por espécies heterotróficas, como *Schizochytrium limacinum*, e o EPA principalmente produzido por espécies autotróficas, como *Phaeodactylum tricornutum* e *Nannochloropsis* sp. (Adarme-Vega *et al.*, 2012).

Também encontramos nas microalgas minerais como o sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre e iodo (Christaki *et al.*, 2011; Priyadarshani e Rath, 2012) e vitaminas, como retinol, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, ácido ascórbico e tocoferol (Christaki *et al.*, 2011; de Jesus Raposo e de Morais, 2015; Priyadarshani e Rath, 2012).

Ainda, pigmentos como clorofila, ficobiloproteínas e carotenoides, que possuem um importante efeito antioxidante (Christaki *et al.*, 2011), utilizados em cosmética e como pró-vitaminas (Trivedi *et al.*, 2015).

No mercado de alimentos saudáveis, encontramos a biomassa de microalgas comercializada sob a forma de comprimidos ou em pó, como aditivos alimentares. *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* são as microalgas dominantes no mercado (Brennan e Owende, 2010).

2.4.4.1. Aplicações ambientais: mitigação de CO₂ e tratamento de águas residuais

Em larga escala, a produção combinada de energia renovável e recursos materiais com aplicações ambientais exclusivas para mitigação de emissões de gases com efeito de estufa (GEE) e tratamento de águas residuais centram o interesse da pesquisa com microalgas (Trivedi *et al.*, 2015).

Nos últimos anos a mitigação biológica de CO₂ tem sido alvo de grande atenção, tendo em conta os elevados níveis de poluição industrial. O uso de gases de combustão como fonte de CO₂ para o crescimento de microalgas fornece uma alternativa muito promissora às atuais

estratégias de mitigação de emissões de GEE e existem estudos que comprovam o grande poder de assimilação de CO₂, por parte das microalgas *Chlorella* e *Scenedesmus obliquus* (Trivedi *et al.*, 2015; Brennan e Owende, 2010).

No processo de fotossíntese, as microalgas transformam o dióxido de carbono em hidratos de carbono e oxigénio, na presença de água e luz ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{luz} \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{O}_2$), mas a biofixação do CO₂ permite, também, a produção de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos.

Para o êxito das microalgas na captura e fixação de carbono é fundamental, não só a sua adaptação aos meios de cultura de menor custo, como também resistência a contaminações e à toxicidade do próprio meio. As espécies melhor adaptadas devem corresponder com uma elevada taxa de crescimento, de captura e de transformação do CO₂ em biomassa de fácil remoção e passível de gerar produtos secundários de valor económico.

Na Tabela 2.10., encontram-se algumas espécies de microalgas que demonstram a capacidade de captura de dióxido de carbono, ressaltando-se que o género *Chlorella* retém até 60% de CO₂, para valores de pH 3-7, temperatura entre os 15 e os 45°C e tempo de duplicação de 2,5 a 8 horas (Markley *et al.*, 2006).

Tabela 2.10. Captura de carbono por microalgas (Congresso internacional de bioenergia, Curitiba, 2009)

Espécie	Produtividade de carbono (ton/(ha.ano))	CO₂ equivalente (ton/(ha.ano))
<i>Chlorella</i> sp.	182	667,94
<i>Spirulina</i> sp.	107	392,69
<i>Scenedesmus obliquus</i>	102,7	376,91
<i>Spirulina platensis</i>	44	161,48
<i>Botryococcus braunii</i>	42,8	157,08
<i>Nannochloropsis oculata</i>	32	117,44
<i>Tetraselmis strain</i>	27,37	100,45

Muitas espécies de microalgas possuem a capacidade de se desenvolverem no seio de águas residuais, porque conseguem utilizar o carbono orgânico, em conjunto com azoto, fósforo e metais pesados presentes nesses efluentes (Brennan e Owende, 2010).

Um processo económico, que requer pouca energia, permite a remoção dos metais pesados, promove a reciclagem eficiente de nutrientes tendo em conta que a biomassa produzida é útil para diversas aplicações e que acrescenta valor, na vertente dos biocombustíveis.

O processamento químico de águas residuais ou o uso de sistemas de lamas ativadas são os métodos convencionais de tratamento mais utilizados, mas o uso das microalgas tem crescido em todo o mundo, através do uso de lagoas de estabilização convencionais ou lagoas de algas

de elevado rendimento (elevado poder gerador de biomassa microalgal), que são mais desenvolvidas e eficientes (Pittman *et al.*, 2011).

São várias as matérias que causam a poluição de um curso de água, principalmente compostos orgânicos e nutrientes e, nesse sentido, a descarga de águas residuais tratadas deve cumprir a legislação ambiental, não ultrapassando os limites estabelecidos.

Todos os compostos orgânicos presentes numa água residual comportam, pelo menos, um átomo de carbono, que pode ser oxidado química e biologicamente para gerar dióxido de carbono (CO₂).

Na oxidação química falamos da CQO e quando é aplicada a oxidação biológica falamos da CBO₅, que correspondem aos testes de consumo de oxigénio. As microalgas podem consumir esses compostos orgânicos, atingindo elevadas taxas de remoção (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

As águas residuais tendem, também, a conter elevadas quantidades de nutrientes, particularmente azoto e fósforo, o que favorece o crescimento das microalgas, pois são fundamentais para o processo metabólico das mesmas.

Geralmente, uma maior concentração de azoto conduz a uma taxa de crescimento superior, desde que a presença de fósforo no meio não seja inferior ao valor mínimo limitante. Apesar da remoção de azoto ser mais evidente, por normalmente se encontrar em maior percentagem nas águas residuais, a remoção de fósforo também é altamente eficiente. A otimização da razão N/P é fundamental para a rentabilidade do processo, tendo em conta que a limitação de azoto pode conduzir a uma taxa de crescimento inferior, mas pode aumentar a produtividade em lípidos. Esta situação é comercialmente vantajosa para a posterior recolha da biomassa com vista à produção de biocombustíveis (Griffiths *et al.*, 2014).

Perceber as cinéticas de remoção de nutrientes permite compreender melhor o modo como os mesmos são assimilados pelas microalgas, permitindo calcular o tempo de retenção em lagoas ou nos reatores, pela velocidade dessa assimilação e, conseqüentemente, dimensionar processos em maior escala.

A maioria dos estudos defende que as microalgas removem o azoto mais depressa do que assimilam o fósforo, o que conduz à importância de se conhecer melhor os mecanismos que intervêm nesses processos e de que forma fatores como a concentração inicial no meio, pH e temperatura afetam o desempenho das microalgas, na assimilação e remoção de nutrientes.

A Tabela 2.11. exhibe as percentagens de remoção de fósforo (P) e azoto (N), de algumas espécies de microalgas.

Tabela 2.11. Remoção de azoto e fósforo em águas residuais por microalgas.

Espécie	Meio de cultura	Duração (d)	Azoto total		Fósforo total		μ/d	Ref.
			Ci (mg/L)	% Rem.	Ci (mg/L)	% Rem.		
<i>Chlorella</i> sp.	Municipal e lama digerida	12-28	36-197	51-96	3,5-4,0	95-96	0,11-0,13	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Micractinium</i> sp.	Municipal e lama digerida	12-28	36-198	46-93	3,5-4,1	95-96	0,11-0,13	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial (pecuária)	20	56	52	13,5	57	0,19	(Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2013)
<i>M. reisseri</i>	Municipal e indústria Mineira	15	56	97	15,8	83	0,25	(Ji <i>et al.</i> , 2014)
<i>Scenedesmus</i> sp.	Artificial	13	2,5-25	45-99	0,1-2,0	99	-	(Xin <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. zofingiensis</i>	Industrial (pecuária)	10	17-148	69-83	18-156	85-100	0,29-0,49	(Zhu <i>et al.</i> , 2013)

Ci - concentração inicial; μ - taxa de crescimento

O leque de águas residuais que podem ser tratadas através das microalgas abrange as águas residuais urbanas e industriais, como os efluentes da indústria do azeite. As microalgas também são eficazes na absorção de metais pesados contaminantes, como chumbo, mercúrio, estanho, cádmio, bromo e arsênico (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

No entanto, devido às concentrações geralmente baixas de N e P e elevado teor de toxinas, as taxas de crescimento de algas apresentam-se reduzidas em muitas águas residuais industriais, mas conseguem acumular lipídios nas células que podem atingir concentrações muito elevadas (Pittman *et al.*, 2011), favoráveis à produção de biocombustível (biodiesel).

2.4.5. Biorrefinaria baseada em microalgas

O conceito da biorrefinaria engloba a produção de produtos químicos e mercadorias de maior valor, além de combustíveis e energia, pela otimização de recursos, maximização do lucro e benefícios e, ainda, minimização dos resíduos (Trivedi *et al.*, 2015).

São três os fatores que mais influenciam a sustentabilidade do processo de produção de biocombustíveis a partir de microalgas: o balanço de energia e carbono, os custos de produção e os impactes ambientais (Slade, 2013). De forma a tornar mais sustentável este processo e aumentar a viabilidade económica, para além da produção ser feita num conceito de

biorrefinaria, as estruturas produtivas deverão ser implantadas junto de instalações fabris e zonas de tratamento de efluentes, beneficiando dos nutrientes e dispondo de CO₂ (Slade, 2013).

Desta forma, as biorrefinarias baseadas em microalgas podem desempenhar um papel importante na mudança de economias e criar muitas oportunidades no negócio global de microalgas, associando-se o avanço tecnológico, fundamental para a eficiência e otimização de todas as etapas da produção, pois aspetos como a energia consumida nos sistemas de cultivo, na colheita, na secagem e na extração são cruciais na análise económica (Jones e Mayfield, 2012). A coprodução de produtos de elevado valor agregado, juntamente com os benefícios ambientais, como biorremediação da água e mitigação de CO₂, poderiam compensar os altos custos de produção do cultivo em massa de microalgas e apoiar uma verdadeira bioeconomia (Gouveia *et al.*, 2014), pois a análise económica tem sido o principal constrangimento no que respeita à passagem dos estudos laboratoriais para a escala industrial.

Têm sido desenvolvidos alguns projetos à escala piloto (Tabela 2.12.), entre os quais a possibilidade de produzir pigmentos de elevado valor, com posterior extração de óleos para produção de biodiesel e utilização final da restante biomassa da microalga *Nannochloropsis* sp. para produção de biohidrogénio (Nobre *et al.*, 2013), mas a vertente económica inviabiliza qualquer um deles, a menos que se encontrem formas mais em conta de realizar a colheita e o processamento da biomassa algal (Abdelaziz *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2013).

Tabela 2.12. Trabalhos experimentais com microalgas numa base de biorrefinaria (Fonte: Silva *et al.*, 2014).

Biodiesel	Bioetanol	Biogás	BioH ₂ - auto e heterotroficamente	Pigmentos	Farinha de algas	Glicerina	Bioeletricidade	Ref.
x							x	Subhadra e Edwards, 2010
x				x				Campenni <i>et al.</i> , 2013
								Liu <i>et al.</i> , 2012
								Mostafa <i>et al.</i> , 2012
x		x						Collet <i>et al.</i> , 2011
								Ehimen <i>et al.</i> , 2011
x			x	x				Sialve <i>et al.</i> , 2009
	x	x						Nobre <i>et al.</i> , 2012
								Kim <i>et al.</i> , 2013
x		x			x	x		Subhadra e Grinson-George, 2011
			x					Mussnug <i>et al.</i> , 2010
			x					Ferreira <i>et al.</i> , 2012

2.4.5.1. Biocombustíveis

“O séc. XIX foi o século do carvão, o séc. XX foi o século do petróleo... terá de surgir uma alternativa para sustentar a economia do séc. XXI.”

(Tim Flannery em “We are the weather makers”)

Nos dias de hoje, é uma prioridade, mas também um desafio, fornecer ao mundo fontes de energia limpa. A biomassa terrestre é uma das principais fontes dessa energia renovável, mas o seu desenvolvimento e implementação em larga escala pode por em risco o benigno uso da terra e causar impactos muito negativos (Comissão Europeia, 2015).

O potencial e a vantagem das microalgas em dar resposta à crescente procura de energia global tem merecido a atenção de todo o mundo. A sua floração pode ser um fenómeno natural, mas a eutrofização causada pelas atividades humanas é a principal causa, sendo que as microalgas podem atingir valores de produtividade de biomassa por hectare maiores do que qualquer planta terrestre e não competem com as atividades para terras aráveis.

O facto de as microalgas possuírem a capacidade de acumular frações lipídicas acima de 60% do seu peso seco, torna-as o centro de interesse para a produção industrial de biocombustíveis.

No entanto, e apesar de vários estudos afirmarem que os biocombustíveis produzidos a partir de microalgas conseguem competir com os combustíveis fósseis, os maiores obstáculos são o investimento no equipamento e os custos operacionais associados ao consumo de energia e nutrientes (Slade e Bauen, 2013).

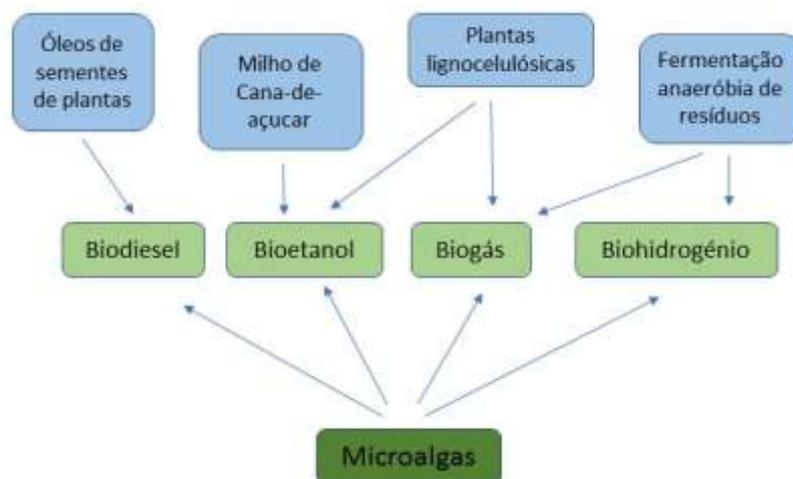


Figura 2.9. Biocombustíveis que podem ser produzidos a partir de microalgas (Adaptado de: Jones e Mayfield, 2012).

2.4.5.2. Biodiesel

O biodiesel é o combustível derivado das microalgas que tem vindo a receber maior atenção e a sua produção é seccionada em várias etapas (Figura 2.8.).

O método inicia-se com a seleção da espécie de microalga e consequente implementação do seu sistema de cultivo. Após o crescimento da microalga, a sua biomassa é colhida e processada para a extração do óleo que, através de reação química, produzirá o biodiesel (Carolino, 2011).

A transesterificação é o processo através do qual os óleos ou gorduras de origem vegetal ou animal são transformados em biodiesel, ou seja, numa mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME). Estas gorduras são compostas por 90 a 98% de triglicéridos, alguns mono e diglicérideos e ácidos gordos livres, para além de uma quantidade residual de fosfolípidos, carotenoides, tocoferóis, água e compostos de enxofre (Amaro *et al.*, 2011).

Segundo Mata *et al.*, 2010, a transesterificação é uma reação química que inclui três passos reversíveis em série, em que os triglicérideos são convertidos em diglicérideos, que por sua vez são convertidos em monoglicérideos e estes transformados em ésteres (biodiesel) e glicerol (subproduto).

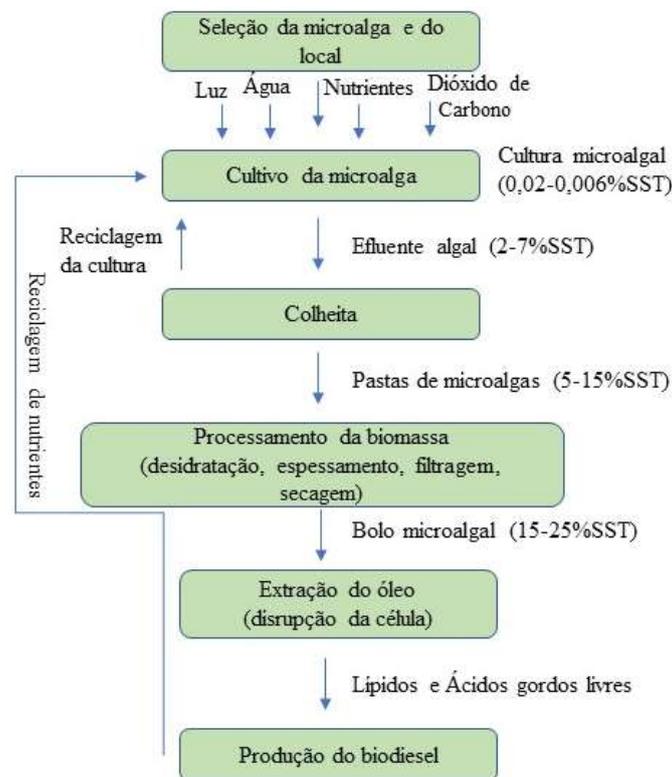


Figura 2.10. Etapas do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Adaptado de: Mata *et al.*, 2010).

2.4.5.3. Bioetanol

De entre os biocombustíveis disponíveis, o bioetanol destaca-se por apresentar menor toxicidade, ser facilmente biodegradável e emitir menos poluentes, podendo ter várias fontes, de acordo com a Tabela 2.13.

Tabela 2.13. Fontes de produção de bioetanol.

Bioetanol		
1ª Geração	2ª Geração	3ª Geração
Produzido a partir de matérias-primas, como a cana-de-açúcar, milho ou beterraba sacarina.	Produzido a partir de biomassa lignocelulósica (madeira, palhas de arroz e de milho) e resíduos agroindustriais.	Produzido a partir da biomassa microalgal.

Em consequência do elevado teor em açúcares sob a forma de polissacarídeos (na parede celular e em amido) e do baixo conteúdo em lenhina e hemiceluloses, a biomassa microalgal apresenta elevado potencial para a produção do bioetanol, sendo o maior desafio libertar os hidratos de carbono que se encontram na parede celular, por extrusão ou corte mecânico, de forma a torná-los açúcares fermentáveis (Eldalatonny *et al.*, 2016).

Para produzir bioetanol a partir da biomassa microalgal, as principais fases são o cultivo, colheita, pré-tratamento e/ou hidrólise, fermentação e destilação (Silva *et al.*, 2018). A hidrólise da biomassa acontece por ação de ácidos e enzimas, enquanto que a fermentação conta com o auxílio de leveduras (p.e. *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae*) que a transformam em etanol hidratado, que a seguir é desidratado (Suali e Sarbatly, 2012).

Algumas das espécies de microalgas mais promissoras para a produção de bioetanol são a *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirogyra* e *Spirulina* por ser possível induzi-las a produzir mais de 50%, em peso seco, de amido e glicogénio utilizável como matéria-prima para a produção de bioetanol (John *et al.*, 2011).

Entre 2012 e 2017, foi desenvolvido o projeto DEMA (*Direct Ethanol da MicroAlgae*), que consiste na produção de bioetanol diretamente da cianobactéria *Synechocystis* sp. PCC 6803, que possui a capacidade de converter cataliticamente energia solar, água e CO₂ em bioetanol. Mais recentemente, outro projeto avaliou a produção de bioetanol a partir de *Hindakia tetrachotoma* MEO₃ cultivada em diferentes concentrações de águas residuais (0, 25, 50, 75 e 100%) num fotobiorreator plano e fases de hidrólise ácida, alcalina e enzimática para

sacarificação da microalga, obtendo-se $0,11 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ e $94 \pm 2,2\%$ de rendimento da biomassa microalgal, após 36 h de fermentação (Onay, 2019).

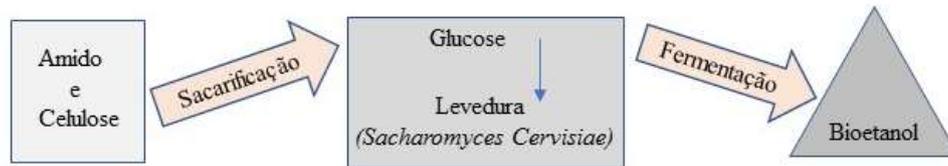


Figura 2.9. Sistema simplificado da sacarificação e fermentação da microalga (Fonte: Onay, 2019).

Em 2019, os maiores produtores de etanol combustível foram os Estados Unidos, o Brasil, a Europa e a China, com valores de 60, 33, 5,5 e 4,5 milhões de m^3 , respectivamente (Garside, 2020).

2.4.5.4. Biogás e biohidrogénio

O biogás é um biocombustível composto de CH_4 , CO_2 , H_2S , vapor de água e outros gases, como N_2 e H_2 e é produzido através da decomposição anaeróbia da matéria orgânica, o que implica que a biomassa de microalgas seja apropriada para ser utilizada como substrato. Essa digestão anaeróbia, tem como fontes de carbono os hidratos de carbono e as proteínas presentes na constituição das microalgas, ocorre na ausência de oxigénio e é catalisada por bactérias, leveduras ou fungos, a temperatura e pH adequados.

No entanto, a utilização do biogás como fonte energética é limitada pela presença de impurezas como o sulfureto de hidrogénio (H_2S) e o dióxido de carbono (CO_2), que baixam o seu poder calorífico, dificultam a sua compressão pelo aumento de acidez e inviabilizam economicamente o seu transporte. Por outro lado, o CO_2 é passível de ser biologicamente convertido em matéria orgânica por microrganismos fotossintetizantes, como as microalgas, o que quer dizer que estas podem também funcionar como purificadores deste biocombustível.

O biometano pode ser utilizado diretamente como biocombustível gasoso ou para gerar eletricidade, enquanto a restante biomassa é utilizada para produzir biofertilizantes (Jones e Mayfield, 2012).

O hidrogénio (H_2) detém a maior quantidade de energia por unidade de peso (142 kJ/kg) em relação a qualquer outro combustível (Ferreira *et al.*, 2018) e pode ser produzido pelas microalgas verdes, por biofotólise direta ou indireta.

Na primeira situação é gerado diretamente após a rutura das moléculas de água, em consequência da presença de luz no processo de fotossíntese, com libertação de O_2 , enquanto

que a biofotólise indireta implica a fragmentação da molécula de carboidratos, previamente sintetizada pelo sistema biológico com existência de água e dióxido de carbono captado da atmosfera, com consequente libertação de H₂ e CO₂ (Gonçalves *et al.*, 2015).

O biohidrogénio pode então ser diretamente produzido por microalgas fotossintéticas, através da fotofermentação nos sistemas anaeróbios que incluem a oxidação da ferredoxina pela enzima hidrogenase, mas é um processo complicado devido à concorrência de outros metabolismos. Nesse sentido, o objetivo passa por descobrir-se uma hidrogenase enérgica que seja capaz de competir e mostrar eficiência na produção de biohidrogénio, para que possa ser viável comercialmente (Jones e Mayfield, 2012). Aferido o potencial da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*, cultivada em águas residuais, para a produção de H₂ através da fermentação com ausência de luz, foram obtidos valores de 390 mL H₂/g (Ferreira *et al.*, 2018).

2.5. Biorremediação

As técnicas de remediação visam promover a qualidade global do ambiente que, por sua vez, tem vindo a ser severamente agredido pelos resíduos resultantes da atividade antropogénica. Aos processos através dos quais os organismos vivos reduzem ou removem poluentes do ambiente, chama-se biorremediação e como biorremediadores surgem as bactérias (Guo *et al.*, 2010), os fungos (Singh, 2006), as plantas (Vidali, 2001), as algas (Olguín, 2003) e até os organismos geneticamente modificados (Ezezika e Singer, 2010). Ressalva-se que, quando o objetivo é remediar uma massa de água, as algas ganham uma maior relevância (Hermann *et al.*, 2013).

Mecanismos simples, de baixo custo e que envolvem, apenas, recursos naturais. Quando a biorremediação é realizada no próprio local falamos numa biorremediação *in-situ* e quando os efluentes estão sujeitos a transporte referimo-nos a uma biorremediação *ex-situ*, permitindo esta um maior controlo das variáveis, o que faz com que seja largamente utilizada no tratamento de águas residuais (Metcalf e Eddy, 2003).

Um dos mais sérios problemas ambientais é a contaminação dos cursos de água por efluentes domésticos e industriais, correndo-se o risco de se inviabilizar a utilização deste recurso tão fundamental à manutenção da vida.

A poluição dos recursos hídricos pode ser física, química e também biológica, pois o uso de fertilizantes e a descarga de efluentes com elevada carga orgânica ocasionam o fenómeno de eutrofização, que consiste no crescimento e desenvolvimento descontrolado de organismos

autotróficos, cuja biomassa decomposta deteriora todo o sistema aquático, pela diminuição do oxigénio dissolvido, estreitamente ligado ao crescimento dos decompositores anaeróbios da biomassa (Valente *et al.*, 2018). Neste sentido, são imperativas medidas de tratamento, mas muitas vezes inviabilizadas pelo elevado preço dos métodos convencionais, pela ineficácia da remoção da carga de nutrientes e de metais pesados, bem como da falta de fiscalização pelas entidades competentes.

A Tabela 2.14. faz referência aos métodos tradicionalmente utilizados na descontaminação de efluentes (Moreira, 2010).

Tabela 2.14. Vantagens e desvantagens de processos de remediação tradicionalmente utilizados. (Fonte: Moreira, 2010)

Processo	Mecanismos de ação	Vantagens	Desvantagens
Precipitação química	Uma substância solúvel é convertida em outra insolúvel por reação química ou por mudanças na composição do solvente. Como ocorre na remoção de fosfatos e outros sais pela adição de coagulantes contendo ferro e/ou alumínio.	Simplex Baixo custo	Não efetiva para concentrações elevadas Difícil separação Pouco efetiva Produce lamas
Oxidação e redução biológica	Redução e/ou oxidação de matéria orgânica por meio da aplicação de consórcio de microrganismos.	Baixo custo	Quando sistemas biológicos são aplicados, a taxa de conversão é lenta e dependente das condições climáticas
Oxidação e redução química	Aplicação de oxidantes químicos como H ₂ O ₂ , O ₃ , Cl ₂ , ClO ₂ e KMnO ₄ . Utilizado na oxidação e redução de metais, bem como na desinfecção e remoção de odor da água.	Mineralização	Requer agentes químicos
Tratamento eletroquímico	Imposição de uma diferença de potencial e/ou corrente elétrica a um sistema composto de cátodo, ânodo e eletrólito. Pode promover destruição anódica do cianeto, ao mesmo tempo que promove remoção catódica dos metais pesados.	Recuperação do metal	Aplicado para elevadas concentrações Custo elevado
Osmose reversa	Uma fonte de pressão externa é aplicada, fazendo com que a água, por meio de uma membrana semipermeável, se encaminhe da solução mais concentrada para a mais diluída.	Efluente puro	Necessita de elevadas pressões Custo elevado
Troca iónica	Resinas de troca iónica são aplicadas, podendo liberar iões sódio ou hidrogénio (resinas catiónicas) bem como hidroxilo (resinas aniónicas) e apreender catiões e aniões, respetivamente.	Efetivo Recuperação do metal	Sensível a presença de partículas Resinas de elevado custo
Adsorção	Adsorção com carvão ativado, zeólito, biomassa, resina polimérica, e oxi-hidróxido metálico	Adsorventes convencionais	Não efetivo para alguns metais
Evaporação	Separação da água dos demais compostos presentes na mesma por meio da passagem da água do estado líquido para estado gasoso.	Efluente puro	Custo elevado Produce lamas

Assim, é cada vez maior o interesse na aplicação de uma biomassa alternativa em processos de biorremediação, podendo esta efetivar a remoção de nutrientes e metais pesados e, ainda, alavancar o seu potencial económico através da biorrefinaria.

2.5.1. Capacidade biorremediativa das microalgas (Ficorremediação)

As microalgas revelaram-se o centro das atenções, por serem microorganismos cuja eficiência fotossintética supera em larga escala a dos vegetais superiores, por terem a capacidade de usar carbono orgânico e inorgânico (Franco *et al.*, 2013) e por serem produtoras exímias de proteínas, óleos e outros compostos de interesse para a biorremediação, incluindo biossorção (retenção de compostos em soluções aquosas) (Bertoldi *et al.*, 2008). Em diversos estudos a microalga *Spirulina platensis* tem apresentado capacidade de remoção de iões metálicos de soluções aquosas (Doshi *et al.*, 2007).

A Tabela 2.15. resume alguns trabalhos dedicados ao estudo da eficiência de algumas espécies de microalgas como biorremediadoras.

Tabela 2.15. Potencial de biorremediação de microalgas sobre diversos compostos.

Espécie	Composto	Remoção (%)	Efluente	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Fósforo inorgânico	84 ^[a]	Águas negras	Slompo, 2018
	Azoto amoniacal	49 ^[a]		
	Fósforo inorgânico	80-88 ^[b]		
	Azoto amoniacal	64-82 ^[b]		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Nitratos	72,40	Ambientes aquáticos	Pimenta, 2012
	Fosfatos	76,13		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Oxitetraciclina	97	Água do mar	Santaeufemia <i>et al.</i> , 2016
<i>Chlorella</i> sp.	Cádmio	48,7	Vinhos	Matsunaga <i>et al.</i> , 1999
<i>Chlorella</i> sp.	Dióxido de carbono	60	Indústria siderúrgica	Chiu <i>et al.</i> , 2011
	Óxido de nitrogénio	70		
	Dióxido de enxofre	50		
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Synechocystis salina</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	Azoto Fósforo	≅ 100 ≅ 100	Monoculturas com otimização das variáveis	Gonçalves <i>et al.</i> , 2016
<i>Scenedesmus</i> sp.	Amónia Nitratos Fosfato	70-98	Esgoto doméstico	Nayak <i>et al.</i> , 2016
	Oxigénio químico			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Amónia	>97	Águas residuais de aves	Oliveira <i>et al.</i> , 2018
	Fosfato	>97		
<i>Chlamydomonas biconvexa</i> <i>Tetranephris</i> sp.	Azoto Fósforo	≥60 ≥90	Agroindústria óleo de palma	do Nascimento, 2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	Azoto	90,6	Doméstico e industrial	dos Santos, 2017
	Fósforo	98,7		
	Zinco	85,4		
<i>Spirulina platensis</i>	Cobre	99	Industrial	Reck <i>et al.</i> , 2018
	Zinco	95		
<i>Spirulina platensis</i>	Cromo (VI)	62	Biomassa inativa	Dal Magro <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	Amónia	82,2	Efluente hidropónico laboratorial	da Silva, 2006
	Fósforo	51,9		
	Ferro	88,2		
	Manganês	79,5		
	Cobre	58,2		
	Zinco	60,9		

^a Sem aplicação de CO₂; ^b com aplicação de CO₂.

Os estudos comprovam a capacidade remediadora das microalgas, tanto de nutrientes como de metais pesados, revelando-se uma alternativa de baixo custo, poderosa e eficaz, quando comparada com métodos correntes de biorremediação. A abundância de espécies microalgais, que abrangem diferentes intervalos de parâmetros, nomeadamente pH, temperatura e CO₂ dissolvido serve de incentivo para novas pesquisas, pois para além do foco na remoção de compostos poluentes em vários efluentes, ambicionam-se composições com base na biomassa concebida na biorremediação, que tornariam a produção de compostos de valor agregado largamente bio-sustentável (Figura 2.10.).



Figura 2.10. Aplicação da biomassa microalgal resultante da biorremediação de efluentes.

2.5.2. Aplicação de microalgas na indústria do azeite

A aplicação de resíduos agroindustriais na produção de biomassa microalgal passou a ser de grande interesse, tendo em conta a diminuição dos custos inerentes à adição de nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das microalgas, uma vez que estes potenciais meios de cultura são caracterizados por elevadas concentrações de azoto, fósforo e carbono orgânico, os nutrientes microalgais mais relevantes (Chen *et al.*, 2015). O elevado teor de carbono orgânico promove a transição do autotrofismo para o mixotrofismo ou para o heterotrofismo, diminuindo a necessidade de luz, que por sua vez induz a produção de biomassa em reatores convencionais (Pagnanelli *et al.*, 2014).

Sendo a produção de azeite uma atividade agroindustrial particularmente ativa na bacia do Mediterrâneo e que se caracteriza pela geração de elevados volumes de águas residuais, têm vindo a ser realizados cada vez mais estudos para o seu aproveitamento, tendo em conta a

riqueza em nutrientes essenciais, mas que não podem ser diretamente utilizados como fertilizante, devido à presença de fenóis, que para além do seu efeito fitotóxico, inviabilizam a atividade microbiana (Dermeche *et al.*, 2013). Uma área de investigação onde ainda há muitas linhas por traçar, mas que tem conhecido alguns avanços, com destaque para os trabalhos abaixo referidos.

Na segunda metade do ano 2000, o espanhol S. Sánchez e a sua equipa debruçaram-se sobre o tratamento do resíduo líquido da indústria de extração do azeite, em sistema de três fases e ao que chamam de “*alpechín*”, através do uso da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, num biorreator e em diferentes concentrações do efluente. As culturas foram expostas a um ciclo de iluminação de 12h, com condições de pH 6,5, temperatura 30°C e agitação de 180 rpm. Para 0,5 L de meio de cultura e iluminação contínua, a taxa de crescimento da microalga ficou abaixo da expectável, embora a microscopia tenha revelado um aumento substancial do tamanho das células, atribuído à inibição pelo conteúdo polifenólico do efluente. Com menos luz, as células respondem com maior síntese de clorofila e o baixo teor em proteína poderá ser explicado pela baixa concentração de azoto, da água residual. O aumento de fornecimento de CO₂, por arejamento da cultura, não influenciou a fase de crescimento linear, após o crescimento exponencial, expondo a total dependência da luz.

Em 2006, o grupo de trabalho de Hodaifa experimentou o crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* (CCAP 276/3A), na água de lavagem resultante da extração de azeite num sistema de centrifugação contínua de duas fases. Após determinação do baixo teor de azoto deste efluente, concluíram que o mesmo é um fator limitante no que respeita ao crescimento desta microalga e á produção de proteína, inviabilizando a hipótese de qualquer diluição do meio nutriente. No entanto, e apesar da forte inibição ao crescimento, que resultou numa baixa produtividade de biomassa, o conteúdo de ácidos gordos pode valer a pena. Foi ainda destacado o facto de que o uso de *S. obliquus* reduz os valores de CBO₅ em 67,4%, para uma diluição de 25%, enquanto que no efluente puro esta redução é de apenas 35,5%.

O cultivo da cianobactéria *Arthrospira platensis* (Spirulina) em águas ruças tratadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) foi experimentado em 2011 (Markou *et al.*, 2011). O efeito positivo demonstrado por esta adição correspondeu à diminuição da concentração de polifenóis e da turbidez, tornando as águas ruças mais adequadas ao crescimento da microalga em estudo. A produção máxima de biomassa foi equivalente a 1696 mg/L e obtida para uma diluição de 10%, suplementada com 1 g/L de NaNO₃ e 5 g/L de NaHCO₃. Contudo, percebeu-se que a adição de NaHCO₃ não tem efeito significativo, indicando que o único nutriente limitante nesta

água residual é o azoto, pois o carbono é fornecido pelos compostos orgânicos das águas residuais. Foi demonstrado, ainda, uma redução da CQO de 73,18% e de 91,19% para carboidratos, enquanto fenóis, fósforo e nitratos atingiram a percentagem zero em alguns ensaios. Pese embora o sucesso do efeito positivo do NaOCl para o crescimento da *Arthrospira platensis* em águas ruças e comprovada a ação desta microalga na remoção de alguns poluentes orgânicos e inorgânicos, o método suscita questões ambientais que conduzem à necessidade de um tratamento menos agressivo, na redução dos polifenóis e da turbidez, das águas residuais.

Di Caprio *et al.*, 2015, investigou o cultivo da cepa microalgal *Scenedesmus* sp. com água ruça e não esterilizado, obtendo provas de robustez da cepa em relação a contaminações, o que potencia a sua aplicação em escala industrial. Concluiu que a adição de azoto inorgânico pode prevenir a diminuição da taxa de crescimento específica da microalga e, por outro lado, que a presença elevada de azoto e a degradação dos fenóis, pela concentração de sais minerais, promovem o crescimento destas microalgas. Ainda, que a produtividade da *Scenedesmus* sp. é inversamente proporcional ao aumento da concentração da água residual, por relação direta à maior carga de polifenóis.

Mais recentemente, foi trabalhada a possibilidade de tratamento das águas residuais resultantes da indústria do azeite, através da combinação de processos. Numa primeira fase, floculação-sedimentação por Floccudex CS-51 e microfiltração com auxílio de uma membrana de 0,2 μm , seguindo-se o tratamento biológico por microalgas (Hodaifa *et al.*, 2020). Ensaios realizados à escala laboratorial, em reatores de tanque descontínuo agitado e para os quais foi selecionada a microalga *Scenedesmus obliquus*, em diferentes diluições das águas ruças (5, 10, 25, 50, 75 e 100%) e em água ultrapura como meio de cultura. O tratamento primário permitiu elevados níveis de remoção global de matéria orgânica e inorgânica, o que resultou num meio de cultura com menor turbidez, cor e partículas coloidais, favorecendo a iluminação da cultura. Estas condições permitiram a melhor adaptação da microalga *S. obliquus*, com registos animadores da taxa de crescimento específico máximo ($\mu\text{m} = 0,035/\text{h}$) e da produtividade de biomassa ($P_x = 0,896 \text{ mg/L/h}$). Para a diluição a 50%, as percentagens de remoção foram de $\leq 67,4\%$ para o COT, 95,8% para o carbono inicial, 98,2% para o azoto total e 59,1% para os polifenóis, sendo que esta medição foi realizada para uma diluição de 10%. Igualmente importante, foi a constatação de uma biomassa final rica em compostos energéticos, com alto teor de carboidratos e lípidos (72,5% para águas ruças a 5% e 44,9% para águas ruças a 100%).

Um trabalho com viabilidade para ser aplicado à escala industrial, mas onde se terá que ter em conta as condições naturais de temperatura e iluminação.

3. Material e Métodos

3.1. Microalgas

Neste estudo foram utilizadas três espécies de microalgas verdes, *Chlorella vulgaris* (INETI 58, 90 LNEG_UB, Portugal), *Chlorella protothecoides* (cepa 25, UTEX Coleção Cultura, Universidade de Austin, Texas, USA), *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07, Universidade de Coimbra - Coleção Cultura, Portugal) e a cianobactéria *Arthrospira maxima* (Setchell & Gardner, LB 2342), fornecidas pelo Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG).

3.1.1. Caracterização das espécies de microalgas utilizadas

3.1.1.1. *Chlorella vulgaris* (Cv)

Foi em 1890 que Martinus Beijerinck identificou a espécie *Chlorella vulgaris*, como sendo a primeira microalga com um núcleo bem definido e que pertence à seguinte classificação científica: Domínio: Eukaryota, Reino: Protista, Filo ou Divisão: Chlorophyta, Classe: Chlorophyceae, Ordem: Chlorococcales, Família: Chlorellaceae, Género: Chlorella, Espécie: *Chlorella vulgaris*.

É uma microalga verde, eucariótica que cresce essencialmente em água doce (Queiroz *et al.*, 2008), atinge entre 2 e 10 µm de diâmetro e possui alta eficiência fotossintética.

Em condições normais apresenta uma forma de vida unicelular, mas em condições adversas tem tendência para formar agregados ou colónias.

A principal forma de reserva desta microalga é o amido e pode acumular pigmentos como a clorofila a e b, e carotenoides (Bertoldi *et al.*, 2008; Ohse *et al.*, 2008, Queiroz *et al.*, 2008).

Reproduz-se por divisão binária ou zoosporia (Ohse *et al.*, 2008), sendo vista como fonte potencial de alimento e de energia.

3.1.1.2. *Chlorella protothecoides* (Cp)

Atualmente mais conhecida por *Auxenochlorella protothecoides*, detém a classificação científica: Domínio: Eukaryota, Reino: Viridiplantae, Filo ou Divisão: Chlorophyta, Classe:

Chlorophyceae, Ordem: Chlorellales, Família: Chlorellaceae, Género: Auxenochlorella, Espécie: *Auxenochlorella protothecoides*.

Uma microalga verde que sobrevive nos mais variados ambientes, de forma heterotrófica e que necessita de tiamina (vitamina B₁) para o seu crescimento.

Caracteriza-se por possuir uma camada trilaminar de parede externa, com ausência de micro-compartimentos subcelulares (pirenóides), possuindo a capacidade de acumular um elevado teor em lípidos.

É destacada, em vários estudos, para a produção de biocombustíveis e para o tratamento de águas poluídas.

3.1.1.3. *Scenedesmus obliquus* (So)

Esta espécie de clorófita pertence à classificação científica: Domínio: Eukaryota, Reino: Protista, Filo ou Divisão: Chlorophyta, Classe: Chlorophyceae, Ordem: Sphaeropleales, Família: Scenedesmaceae, Género: Scenedesmus, Espécie: *Scenedesmus obliquus*.

Falamos de uma microalga verde comum, que habita as águas doces e ocorre como população única no plâncton.

As células na colónia ocorrem em múltiplos de dois, sendo quatro ou oito células as mais comuns e a sua morfologia pode variar em função do meio. A textura da parede e os espinhos nas células marcam a diferença entre as espécies, sendo que as células uninucleadas têm um único cloroplasto laminado (Lee, 2008).

As cepas destas microalgas adquiriram mais atenção pela sua facilidade de cultivo, vantagens economicamente confiáveis e alta produtividade de biomassa.

Um estudo recente mostrou que os hidrolisados de proteína de *S. obliquus* apresentam um grande potencial como ingredientes antioxidantes nutracêuticos e como agentes terapêuticos contra CVB₃ (Afify *et al.*, 2018).

3.1.1.4. *Arthrospira maxima* (Am)

Previamente conhecida por *Spirulina maxima*, é uma cianobactéria que se caracteriza pela formação de filamentos compostos por várias células (pluricelulares), enrolados em hélice levógira e que predomina em lagos tropicais ou outras águas alcalinas, ricas em carbonatos e bicarbonatos. Estes filamentos ou tricomas são envolvidos por uma bainha fina, cujas paredes transversas podem ser vistas sob microscopia ótica (Guglielmi *et al.*, 1993) e variam de tamanho

e morfologia conforme as condições de crescimento, oscilando entre os 500 μm de comprimento e 6 - 12 μm de diâmetro. Não possuem heterocistos e não fixam o N_2 , mas possuem alta eficiência quântica de PSII e o complexo de oxidação de água *in vivo* mais rápido de todos os fototróficos oxigenados (~ 5 vezes mais rápido do que algas e plantas e até mesmo algumas outras cianobactérias) (Ananyev *et al.*, 2005).

Esta espécie é exclusiva da América Central e tem como classificação científica: Domínio: Bacteria, Reino: Monera, Filo ou Divisão: Cyanobacteria, Classe: Cyanophyceae, Ordem: Oscillatoriales, Família: Phormidiaceae, Género: *Arthrospira*, Espécie: *Arthrospira maxima*.

Uma microalga azul, onde as proteínas representam até 74% da massa seca e onde se destaca o potencial de coloração dos seus pigmentos (essencialmente beta-caroteno e clorofila), de grande interesse para as indústrias alimentar, farmacêutica e de cosméticos.

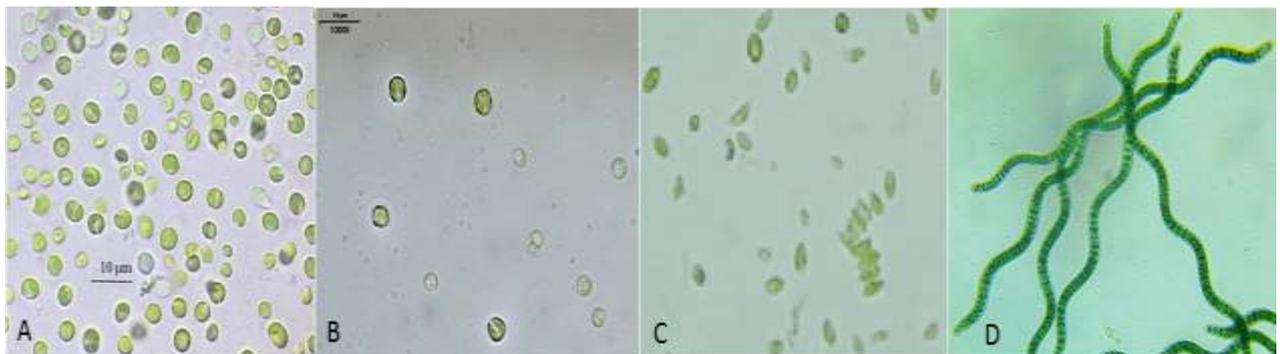


Figura 3.1. Imagem celular das espécies em estudo (A) *Chlorella vulgaris* (B) *Chlorella prothecoides* (C) *Scenedesmus obliquus* e (D) *Arthrospira maxima*.

3.2. Condições de cultura

As microalgas foram mantidas em meio líquido padrão (ponto 3.2.1.), numa incubadora (New Brunswick Scientific Co. Inc EDISON NJ EUA) a cerca de 25 °C, com uma agitação de 100 rpm e iluminação contínua fornecida por uma lâmpada LED de luz branca (Philips 18 W), fornecendo uma intensidade de luz média de 20 - 25 $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (medida com um medidor Phywe Lux).

A agitação é imprescindível para a homogeneização dos nutrientes e para evitar a sedimentação da biomassa, sendo o período de incubação de 8 a 12 dias, dependendo da espécie em estudo.

3.2.1. Meios para o inóculo

- a) As duas cepas de *Chlorella* foram mantidas em meio inorgânico contendo por litro: 1,25 g de KNO_3 , 1,25 g de KH_2PO_4 , 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaHCO_3 , 0,012 g de solução de $\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$ e 10 ml de solução de oligoelementos ou elementos traço (Chu). A composição do meio Chu consiste em: 286 mg/L H_3BO_4 , 154 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 39 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 9 mg/L $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- b) A estirpe de *Scenedesmus* foi mantida em meio Bristol cuja composição por litro corresponde a: 250 mg NaNO_3 , 75 mg K_2HPO_4 , 33 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 175 mg KH_2PO_4 , 25 mg NaCl , 60 mg $\text{Fe} \cdot \text{EDTA}$ e 10 ml de solução de oligoelementos.
- c) O meio, também inorgânico e preparado para a *Arthrospira* consistiu em: 2,5 g/L de NaNO_3 , 16,8 g/L de NaHCO_3 , 1g/L de NaCl , 1g/L de K_2SO_4 , 0,5 g/L de K_2SO_4 , 0,08 g/L de $\text{Na} \cdot \text{EDTA}$, 0,053 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 10 ml de solução dos elementos traço.

Antes da inoculação, todos os meios foram autoclavados (Sanyo Labo Autoclave) a 121°C , durante 15 minutos. De forma a evitar a precipitação de complexos de sal devido às elevadas temperaturas no processo de autoclavagem, KH_2PO_4 e NaHCO_3 foram autoclavados separadamente e misturados em condições assépticas após o arrefecimento.



Figura 3.2. Inóculos das microalgas em estudo.

3.3. Efluentes utilizados

Os efluentes líquidos da indústria extratora de azeite utilizados neste trabalho, foram a água ruça e a água de lavagem da azeitona. Estas águas resultaram da campanha de produção de azeite 2019/2020 e foram recolhidas no dia 21 de fevereiro de 2020, na Cooperativa Agrícola dos Olivicultores de Murça C.R.L. (CAOM), onde é utilizado o sistema de extração de duas fases e cujos resíduos resultantes são conduzidos para dois tanques de retenção (Figura 3.3.).



Figura 3.3. Tanques de retenção da CAOM (A) água ruça (B) água de lavagem da azeitona.

As amostras de água residual recolhidas (água ruça e água de lavagem de azeitona) foram armazenadas em câmara de refrigeração a 4°C até à sua utilização como meio de cultivo das microalgas, com prévio ajuste à temperatura ambiente.

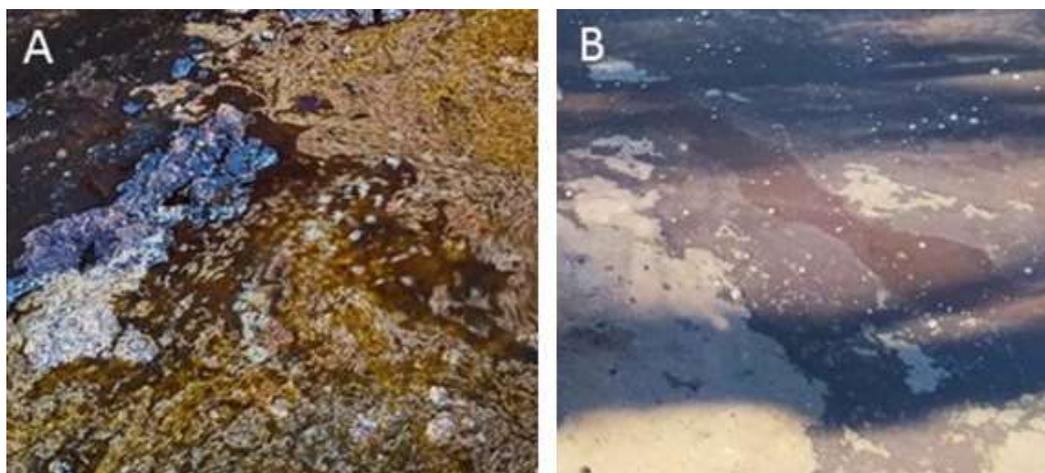


Figura 3.4. Efluentes na altura da recolha. (A) águas ruças e (B) água de lavagem.

3.3.1. Pré-tratamento dos efluentes utilizados

O pré-tratamento é uma etapa muito importante, pois permite a eliminação dos constituintes de maiores dimensões das águas residuais, cuja presença pode provocar problemas na manutenção e funcionamento dos diferentes processos, operações e sistemas auxiliares de uma estação de tratamento de águas residuais.

Neste trabalho, de modo a promover a sedimentação (Figura 3.5. (A)) dos sólidos suspensos presentes nas águas residuais, foram colocados no frigorífico dois copos com cerca de 500 ml de cada um dos efluentes, durante 24 h.

Foi possível observar a flutuação dos sedimentos menos densos à superfície, bem como a deposição dos sedimentos de densidade superior. Notou-se, ainda, a existência de alguma gordura nas águas ruças, resultante do processo de produção do azeite.

Por decantação foi separada a fração líquida das águas residuais dos sólidos sedimentados no fundo dos dois copos, sem adição de qualquer produto químico.

Seguiu-se a esterilização fracionada por vapor de água (calor húmido), pelo chamado método da tindalização (Figura 3.5. (B)), através do qual conseguimos manter praticamente todos os nutrientes da amostra, bem como elevadas proporções das suas qualidades organolépticas.

Repetimos 2h de aquecimento, à temperatura de 80°C, durante três dias consecutivos com períodos de arrefecimento progressivo entre eles para a eliminação de todos os microorganismos na forma vegetativa e esporulada.



Figura 3.5. Observação das partículas sedimentadas (A); tindalização (B).

A água ruça a utilizar no crescimento das microalgas, apresentava cor bastante escura e cheiro intenso e foi caracterizada pela determinação de diferentes parâmetros físico-químicos (ponto 5.5.2), nomeadamente o pH, a condutividade, a turbidez, o total de sólidos em suspensão (SST), a carência química de oxigénio (CQO), a carência bioquímica de oxigénio (CBO₅), o carbono orgânico total (COT) os polifenóis totais, o fósforo (P) e o azoto (N).

Foram considerados os mesmos parâmetros para a caracterização da água de lavagem, que apresentava coloração menos carregada e cheiro menos acentuado.

3.4. Cultivo das microalgas nos efluentes

Preliminarmente, como *screening* das microalgas, foram inoculadas as quatro espécies na água ruça pré-tratada (decantação e tinalização), diluída a 5 e 10%. A diluição foi realizada com água destilada e suplementada com meio inorgânico, para garantir que não existia limitação de nutrientes.

No caso da água de lavagem foram inoculadas as quatro espécies no efluente pré-tratado, diluído a 50%. Para a diluição foi, também, usada água destilada em conjunto com o meio inorgânico correspondente a cada espécie de microalga, de forma a assegurar a presença adequada de nutrientes necessários.

As culturas das microalgas foram incubadas em frascos Erlenmeyer de 250 ml, com 130 ml de efluente, no agitador orbital (New Brunswick Scientific) e nas mesmas condições utilizadas na manutenção do inóculo (ponto 3.2.).

Os inóculos foram culturas de microalgas na fase exponencial, previamente cultivadas no meio de cultura apropriado para cada estirpe (ponto 3.2.1.). A curva de crescimento das microalgas atinge o seu máximo após 10 a 12 dias do início da cultura.

Foi estabelecida a curva de calibração para cada espécie de microalga, com base no método espectrofotométrico ($\lambda = 540$ nm), para se poder relacionar o valor de absorvância obtido com o peso seco da biomassa microalgal.

Na preparação dos Erlenmeyers com água ruça e água de lavagem, foi adicionado um volume de inóculo calculado de forma a obter-se uma concentração inicial aproximada de 150 mg biomassa/L (5% (v/v) do inóculo) e 5% (v/v) de meio de micronutrientes, em condições de

assepsia numa câmara de biossegurança de nível II (MICROFLOW Advanced Biosafety Cabinet - Class II).

Os ensaios foram realizados em duplicado para cada espécie de microalga e, para controlo, foi utilizado efluente sem inóculo.

Os frascos foram fechados com tampas de algodão, permitindo a difusão do ar e a dinâmica de crescimento das microalgas foi acompanhada diariamente.



Figura 3.6. Cultura das microalgas na Água ruça (A) e na Água de lavagem (B).

3.4.1. Amostragem

Na câmara de fluxo laminar e com o uso da chama para evitar contaminações, pipetamos cerca de 5 ml de cada um dos frascos de Erlenmeyer (Figura 3.7.), para determinação do crescimento microalgal, pelo cálculo do peso seco.

Para avaliar a eficiência do tratamento dos efluentes com as microalgas, foram analisados os seguintes parâmetros: CQO, polifenóis, fósforo (ortofosfatos) e nitratos.



Figura 3.7. Amostras para obtenção do filtrado.

3.5. Determinações analíticas

3.5.1. Determinação do peso seco e produtividade

O peso seco (X) foi determinado por filtração das amostras, com filtros de retenção de partículas $1,6 \mu\text{m}$ (VWR European Cat. No. 516-0861 - microfibras de vidro, 47 mm), tarados após 1h na estufa a 105°C , para eliminação de qualquer impureza. Registrado o peso do filtro limpo (P_i), foi efetuada a filtração e o conjunto (filtro + amostra) voltou à estufa, à mesma temperatura, permanecendo aí de um dia para o outro (Figura 3.8.). Após arrefecimento, no exsiccador, foi realizada nova pesagem (P_f) e obtido o peso seco de cada amostra, pela diferença entre P_f e P_i , dividido pelo volume da amostra (V_{amostra}), ou seja,

$$X = (P_f - P_i) / V_{\text{amostra}} \quad (\text{Eq. 3.1.})$$

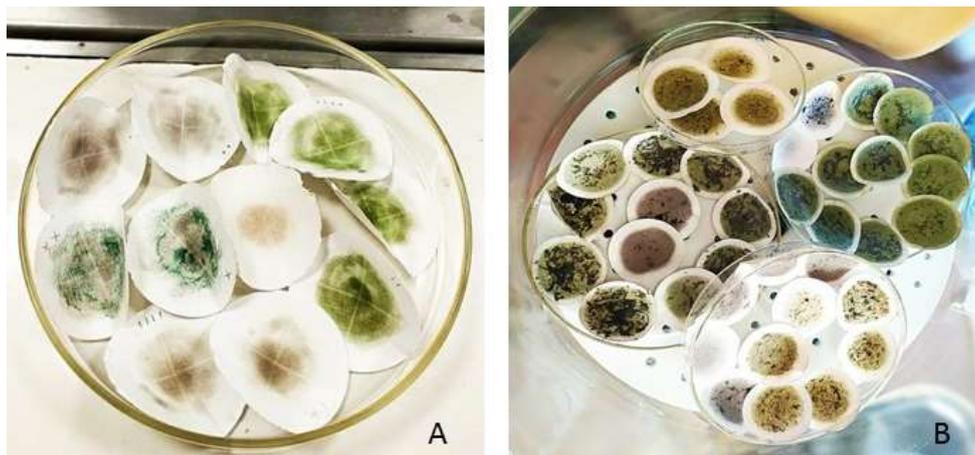


Figura 3.8. Aspeto do papel de filtro após filtração a vácuo dos cultivos em água ruça (A) e água de lavagem (B).

É fundamental que os nutrientes presentes no meio de cultivo correspondam às necessidades nutricionais das microalgas, para que se efetive o crescimento das mesmas e possa falar-se em produção. Para o cálculo da produtividade máxima de biomassa volumétrica (P_X mg/L/dia) tivemos por base a equação:

$$P_X = (X_t - X_0) / (t - t_0) \quad (\text{Eq. 3.2.})$$

Onde, X_t é o peso seco (mg/L) no tempo t (dia) e X_0 é o peso seco inicial (mg/L) no tempo t_0 (dia).

3.5.2. Parâmetros físico-químicos medidos

A turbidez (turbidímetro 2100N IS, HACH), o total de sólidos em suspensão (espectrofotômetro portátil, HACH), o potencial de redução de pH e oxidação (medidor de pH 3510, Jenway) e a condutividade elétrica (condutivímetro portátil, VWR C030) foram determinados de acordo com a metodologia dos Standard Methods para a análise de água e efluentes (APHA, 1998).

3.5.2.1. Carência química de oxigênio

Um dos testes mais utilizados na análise da carga poluente de uma água residual é a (CQO), que traduz a quantidade equivalente de oxigênio consumido (em mg O₂/L), na oxidação química da matéria orgânica presente numa água ou água residual, depois transformada em dióxido de carbono e água.

A CQO foi medida de acordo com o Standard Methods 5220 D (APHA, 1998), realizada num reator de CQO da HACH Co. e usado um espectrofotômetro HACH DR 2400 para a medição colorimétrica ($\lambda = 600$ nm). As soluções padrão foram diluídas 100x, 200x e 250x, no caso das águas ruças e 10x, 50x e 100x para a água de lavagem, de forma a perceber-se se cada uma delas interfere com a quantidade de oxigênio consumido na oxidação química.

3.5.2.2. Carência bioquímica de oxigênio

A CBO traduz-se na quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica, presente numa amostra de água ou água residual, através de um consórcio de microrganismos aeróbios, num período de 5 dias (CBO₅), a uma temperatura de 20°C (Peres, 2009). Para a sua determinação foi utilizado um sistema manométrico OxiTop, que utiliza um sensor eletrónico de pressão, permitindo guardar automaticamente os valores para cada um dos dias e evita a utilização do mercúrio. O procedimento teve como base o método respirométrico adaptado do Standard Methods (APHA, 1998) (método 5210 D) seguindo o manual do equipamento (System OxiTop Control, 1998). Este método mede direta e continuamente o oxigênio consumido pelos microrganismos a partir do ar ou de um ambiente enriquecido com oxigênio, num recipiente fechado, sob condições de temperatura e agitação constantes. A quantificação utilizando este sistema é baseada na medição de variação de pressão num sistema fechado, visto que os microrganismos consomem o oxigênio e produzem CO₂. Para as águas ruças as amostras a analisar foram sujeitas a diluições de 10x, 20x e 30x, a partir de uma solução já diluída 3x

(gama 4000 de CQO), de forma a entrarem na gama proposta de CBO₅, enquanto que para a água de lavagem, não se realizou qualquer diluição, para a gama 6000 de CQO.

A relação entre a CBO₅ e a CQO traduz a biodegradabilidade, ou seja, a capacidade de degradação, por microorganismos decompositores, dos compostos poluentes presentes na água residual. Para os efluentes utilizados neste trabalho, verificamos um rácio CBO₅/CQO muito próximo de zero, o que torna inviável um tratamento biológico dos mesmos, sem o auxílio de processos mais complexos.

3.5.2.3. Carbono Orgânico Total

O COT mede o teor de carbono presente num determinado efluente, sendo a sua análise a mais adequada para determinar o teor de matéria orgânica, uma vez que tem em consideração todos os seus diferentes estados de oxidação.

Recorreu-se a um equipamento da marca Shimadzu, modelo TOC-L CSH, onde as amostras aquosas são cataliticamente oxidadas a CO₂, a uma temperatura de 680°C. O CO₂ é transportado por uma corrente de ar até ao detetor de infravermelhos para determinação da sua concentração, obtendo-se o Carbono Total (CT). Posteriormente, a amostra é novamente injetada, sendo acidificada com ácido fosfórico (H₃PO₄), convertendo os carbonatos e bicarbonatos em CO₂, que é novamente quantificado, obtendo-se o Carbono Inorgânico (CI). A concentração do COT é obtida pela diferença de valores entre os valores de CT e de CI, expressa em mg C/L.

As amostras do nosso estudo integraram uma diluição de 100x e 50x, para as águas ruças e água de lavagem, respetivamente.

3.5.2.4. Polifenóis Totais

O conteúdo total de polifenóis (mg de ácido gálico/L) foi aferido pelo método de Folin-Ciocalteu, adaptado por Singleton e Rossi (1965), que se baseia na formação de complexos de cor azul, aquando da redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungsténico na presença de compostos fenólicos. Para a leitura da absorvância ($\lambda = 765 \text{ nm}$) no espectrofotómetro UV-Vis e de forma a não exceder os limites de gama comportável, a amostra de efluente foi diluída 40x, 60x e 80x (água ruça) e 10x, 50x e 100x (água de lavagem).

3.5.2.5. Fósforo

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para os animais e para as plantas, sendo que a sua assimilação por estas acontece na forma inorgânica, ou seja, na forma de ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e H_3PO_4). No entanto, em quantidades excessivas ou sem tratamento adequado, acarreta sérios prejuízos ao meio ambiente.

Para a determinação do fósforo total é necessário realizar inicialmente uma digestão e posteriormente encontrar um método colorimétrico que se ajuste á gama de concentrações desejada. O fósforo total, apresentado na forma de ortofosfato, após oxidação eficaz da matéria orgânica, foi medido de acordo com o método do ácido ascórbico, Standard Methods 4500-PE (APHA, 1998) e a amostragem experimentou as seguintes diluições: P (água ruça) - 1000x e P (água de lavagem) - 50x.

3.5.2.6. Nitratos

Se por um lado, os nitratos são compostos de azoto (N) essenciais na formação da biomassa das plantas e animais, por outro, são considerados um poluente nas águas superficiais e subterrâneas que potencialmente irão servir para consumo humano. Surgem nos ecossistemas aquáticos em consequência da aplicação de fertilizantes agrícolas, descargas de resíduos domésticos e industriais e poluição atmosférica por azoto, podendo causar a eutrofização do meio hídrico.

Embora o NO_3^- não seja a fonte preferencial de azoto para as microalgas, em termos experimentais este é mais prático, uma vez que o NO_3^- não é volátil e, conseqüentemente, não ocorrem perdas. Em sentido oposto, o NH_4^+ , em função do pH, pode volatilizar sob a forma de amoníaco (NH_3).

A medição dos nitratos (NO_3^-) obedeceu ao método espectrofotométrico do 2,6-dimetilfenol (NP 4338-1/96), com diluições de: (água ruça) - 100x e (água de lavagem) - 10x.

Na presença de ácido sulfúrico e ácido ortofosfórico, os nitratos reagem com o 2,6-dimetilfenol e forma-se 4-nitro-2,6-dimetilfenol, de cor alaranjada, que pode ser espectrofotometricamente medido na zona do ultravioleta (UV). Esta reação demora cerca de 5 minutos, a leitura da absorvância da solução é para $\lambda = 324 \text{ nm}$ e o teor de nitratos calculado a partir da reta de calibração, tendo em conta o ensaio em branco.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo é apresentada a caracterização dos efluentes estudados. São também expostos e discutidos os resultados obtidos durante o tratamento destas águas residuais, com recurso às espécies de microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv), *Chlorella protothecoides* (Cp), *Scenedesmus obliquus* (So) e *Arthrospira maxima* (Am).

4.1. Características físico-químicas dos efluentes analisados

As principais características físico-químicas dos efluentes brutos, água ruça e água de lavagem, encontram-se apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Caracterização físico-química das águas residuais em estudo (Água ruça e Água de lavagem).

Parâmetro	Água ruça	Água de lavagem	Decreto-Lei n° 236/98 (VLE)
pH	5,06 ± 0,01	4,06 ± 0,01	6 - 9
CBO ₅ (mg O ₂ /L)	6050 ± 50	80 ± 10	40
CQO (mg O ₂ /L)	206 882 ± 15 332	7789 ± 706	150
(CBO ₅ /CQO)	0,03	0,01	0,5 - 0,8
COT (mg C/L)	67 130	2 382	-
Turbidez (NTU)	693	138	-
SST (mg/L)	699	118	60
Condutividade elétrica (µs/cm)	270 ± 50	357 ± 12	-
Polifenóis totais (mg ácido gálico/L)	3875 ± 20	326 ± 69	0,5
Ortofosfatos (mg P-PO ₄ /L)	487 ± 6	17,8 ± 9	10
Nitratos (mg NO ₃ /L)	548 ± 21	49,3	50
Azoto (mg N/L)	809,9	33,3	15
Cheiro	Forte	Fraco	Não detetável para 1:20
Cor	Muito escura	Escura	Não detetável para 1:20

Ambas as águas residuais requerem a correção de pH, por serem demasiado ácidas, embora de forma mais intensa na água de lavagem. Os valores habituais de pH, para este tipo de efluente, variam entre 6 e 9 e nas águas em estudo verificamos 5,06 ± 0,01 e 4,06 ± 0,01 para a água ruça e água de lavagem, respetivamente.

Sendo a CBO o parâmetro que mede a quantidade de oxigênio consumido por microrganismos aeróbios para a degradação da matéria orgânica, quanto maior a quantidade de matéria orgânica nas amostras, maior o consumo de oxigênio durante o período de incubação, logo, maior o valor da CBO₅. Para a água de lavagem o valor da CBO₅ ronda o dobro do valor permitido por lei, ou seja, 80 ± 10 mg O₂/L e, para a água ruça, o valor da CBO₅ é de 6050 ± 50 mg O₂/L. Para a análise da CBO₅ da água ruça foram realizadas diluições de 10x, 20x e 30x, a partir de uma solução já diluída 3x.

Os efluentes caracterizados apresentam valores de CQO excessivamente elevados, quando comparados com o limite legal de descarga direta na rede de esgotos (150 mg O₂/L). É indicador da elevadíssima carga de matéria orgânica e, também da dificuldade de tratamento destas águas residuais. Superior em mais de 26 vezes na água ruça ($206\ 882 \pm 15\ 332$ mg O₂/L) do que na água de lavagem (7789 ± 706 mg O₂/L).

A biodegradabilidade é traduzida pelo quociente CBO₅/CQO e quando o seu valor se encontra entre 0,5 e 0,8, significa que o efluente pode ser tratado biologicamente, pois é passível de degradação por microrganismos. Pelos valores de CBO₅/CQO obtidos para a água ruça (0,03) e da água de lavagem (0,01) depreendemos, imediatamente, a dificuldade de tratamento das nossas águas residuais por processos de tratamento biológico.

A elevada carga de matéria orgânica faz com que o COT, carbono orgânico total, apresente valores de 67 130 mg C/L para água ruça e 2382 mg C/L, uma vez que quantifica diretamente o carbono dessa matéria orgânica.

Para a propriedade ótica que faz com que a luz seja espalhada e absorvida e não transmitida em linha reta através da amostra - a turbidez - os valores de 693 NTU foram obtidos para a água ruça e 138 NTU para a água de lavagem. Estes valores são explicados pela existência de uma elevada quantidade de material em suspensão na água ruça, bastante superior à matéria em suspensão na água de lavagem. Significa que na água de lavagem poderá ser mais viável o autotrofismo, enquanto que na água ruça o heterotrofismo será a única opção de obtenção de energia pelas microalgas, devido à elevada dificuldade de penetração de luz.

A quantidade de partículas sólidas em suspensão (SST) determina a qualidade de uma água e a legislação menciona que esta quantidade não pode ultrapassar os 60 mg/L. Com valores de SST de 699 mg/L para a água ruça e de 118 mg/L para a água de lavagem, urge a aplicação de mecanismos de remoção dessas partículas sólidas, por exemplo pelo uso de filtros ou membranas.

A capacidade de conduzir corrente elétrica (condutividade elétrica) é superior na água de lavagem ($357 \pm 12 \mu\text{s/cm}$), o que também pode ser explicado, pelo facto de a água ruça ($270 \pm 50 \mu\text{s/cm}$) possuir um maior número de moléculas de compostos orgânicos que não dissociam em solução aquosa.

A tonalidade da cor é diretamente proporcional ao teor em compostos fenólicos, o que foi comprovado pelos resultados da nossa análise. 3875 ± 20 mg ácido gálico/L de polifenóis totais na água ruça, que apresenta uma cor muito escura e carregada (quase preta), vs., 326 ± 69 mg ácido gálico/L na água de lavagem, de coloração menos acentuada (castanho-avermelhado). Consequentemente, a água ruça é ainda mais resistente à biodegradação, pelo efeito severamente inibidor/tóxico da elevada carga fenólica, sobre os processos biológicos.

O fósforo é um dos nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas, mas em elevadas quantidades pode contribuir para a eutrofização, sendo que a decomposição da biomassa acaba por promover a deterioração de todo o sistema aquático, principalmente pela diminuição do oxigénio dissolvido. Para os efluentes analisados foi obtido um valor 27 vezes superior para a água ruça. Um valor muito elevado no caso da água ruça, mas muito menos problemático no caso da água de lavagem, onde pode mesmo enquadrar-se nos valores limite de emissão.

O azoto, maioritariamente na forma de nitratos (NO_3^-), provem, principalmente, da decomposição da matéria orgânica. Tanto para o azoto (N) como para os nitratos (NO_3^-), a diferença de valores é colossal, entre as duas águas (24 e 11 vezes superior na água ruça).

O cheiro bastante forte apresentado pela água ruça resulta da volatilização de alguns compostos (óleos essenciais) e é indicador de que já existiu alguma degradação oxidativa dos

seus compostos orgânicos. Deve-se à presença de sulfureto de hidrogénio, que resulta da fermentação anaeróbia.

É reportado na literatura que os rácios mássicos ótimos, C/N e N/P, para o crescimento das microalgas são 6 e 8, respetivamente (Hillebrand e Sommer, 1999). Neste trabalho e, para a água ruça, obteve-se C/N = 17,8 e N/P = 7,7, o que quer dizer que o azoto (N) pode vir a ser fator limitante para o crescimento das microalgas, estando o fósforo (P) com valores próximos do ótimo. Para a água de lavagem, os valores de C/N = 71,5 e N/P = 1,9, indicam que o azoto (N) é fator claramente limitante.

4.2. Crescimento das microalgas

Num primeiro ensaio, foi experimentado o crescimento das quatro espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Scenedesmus obliquus* e *Arthrospira maxima*), em água ruça diluída a 10%. O ensaio foi realizado em duplicado para cada espécie de microalga e utilizados dois controlos: efluente sem inóculo autoclavado e efluente sem inóculo, não esterilizado.

A monitorização dos valores de CQO permitiram constatar que no dia 0, tanto as culturas microalgais como os controlos, apresentavam valores superiores a 9100 mg O₂/L.

Para as espécies *Chlorella vulgaris* e *Chlorella protothecoides* verificou-se um consumo progressivo de oxigénio, sendo que ao oitavo dia apresentavam valores de 5456 mg O₂/L e 4217 mg O₂/L, respetivamente. Por outro lado, as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Arthrospira maxima* deixaram de consumir O₂ ao terceiro dia do ensaio, mostrando total inadaptação ao meio.

Nos controlos, os valores de CQO quase que duplicaram no dia 8, devido ao desenvolvimento de fungos no meio.

O cálculo do peso seco determinou a descontinuação do ensaio, uma vez que os resultados obtidos mostraram o crescimento de fungos invasores também nos inóculos, induzindo a um falso crescimento celular das microalgas.

A Figura 4.1. é ilustrativa dos espécimes que conseguiram singrar no meio de cultura, em detrimento do declínio das microalgas, que não conseguiram crescer, nas condições de agressividade do meio a que foram sujeitas.



Figura 4.1. Observação da presença de aglomerados (fungos) nos inóculos: (A) *Chlorellas*; (B) *Scenedesmus obliquus*; (C) *Arthrospira maxima*; (D) Controle.

4.2.1. Crescimento microalgal na água ruça

A determinação do peso foi realizada no dia 0, de acordo com o ponto 3.5.1. e repetida nos dias 1, 4, 8 e 10, permitindo aferir a evolução da produção de biomassa ao longo do período de cultivo, em água ruça tinalizada a 5% (AR). Ao analisarmos a Figura 4.2., podemos perceber o comportamento de cada uma das espécies de microalgas, desde o período de adaptação, fase de crescimento e morte celular.

Referimos o modo de crescimento das microalgas como heterotrófico, uma vez que as culturas são demasiado escuras para permitir a entrada de luz.

No que concerne às *Chlorellas*, enquanto que a *Chlorella vulgaris* (*Cv*) apresentou um ligeiro aumento de peso logo no primeiro dia (fase de latência), seguido de crescimento exponencial entre o dia 1 e o dia 4, no qual atingiu o peso máximo (646,6 mg/L), com morte celular até ao dia 8 (185,2 mg/L) e estabilização da situação até ao dia 10, dia com 200,0 mg/L; a *Chlorella protothecoides* (*Cp*), não mostrou crescimento do dia 0 para o dia 1, seguindo-se a sua fase de crescimento exponencial entre o dia 1 e o dia 4, onde atingiu o seu máximo de produção de biomassa (783,3 mg/L); decresceu abruptamente até ao dia 8 (145,0 mg/L), a partir do qual perdeu a capacidade de reação, conforme demonstra a linha de crescimento até ao dia 10, com um aumento de apenas 75,0 mg/L.

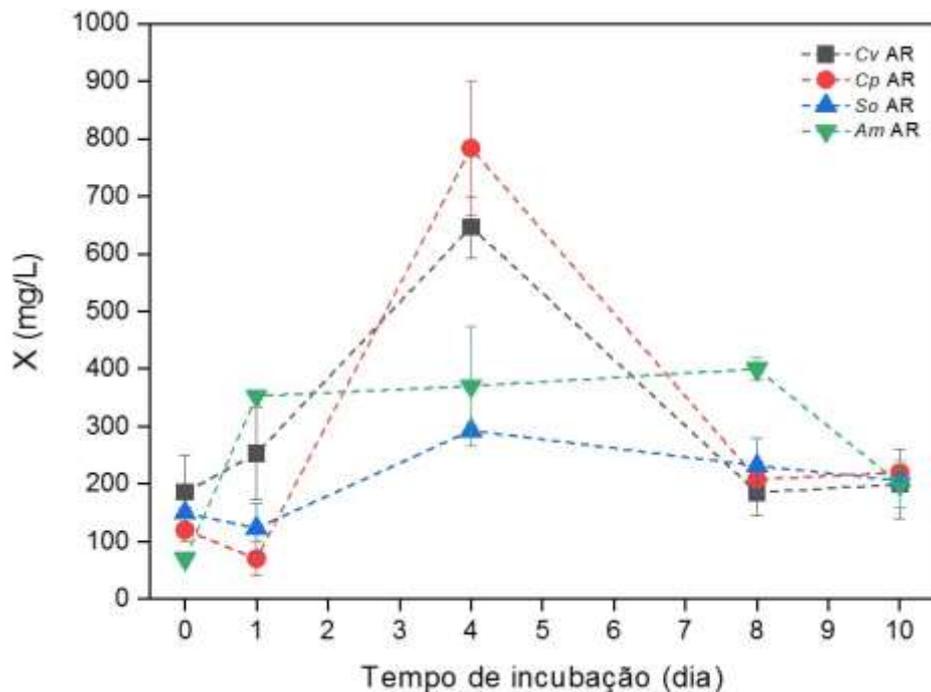


Figura 4.2. Variação do peso seco (X mg/L) microalgal na água ruça, em função do tempo (dia), das espécies: *Chlorella vulgaris* (Cv), *Chlorella protothecoides* (Cp), *Scenedesmus obliquus* (So) e *Arthrospira maxima* (Am).

A *Scenedesmus obliquus* (So), começou a reagir no primeiro dia do ensaio, com aumento progressivo no crescimento, até atingir 231,8 mg/L no dia 4, ao qual se seguiu uma fase estacionária, com 206,2 mg/L no dia 8 e 193,3 mg/L no último dia do ensaio. Embora pouco acentuada, a sua fase exponencial verificou-se entre os dias 1 e 4.

A *Arthrospira maxima* (Am), apresentou um crescimento significativo logo na fase de início do ensaio, com 213,3 mg/L ao fim do primeiro dia. A progressão do estudo significou menos capacidade adaptativa para esta espécie, com registo de 370,0 mg/L no dia 4 e 400,0 mg/L no dia 8, a seguir ao qual se obteve apenas 200,0 mg/L de biomassa.

4.2.2. Crescimento microalgal na água de lavagem

Na água de lavagem, tindalizada e diluída a 50% (AL), o comportamento de produção de biomassa, das microalgas, pode ser observado na Figura 4.3. A determinação do peso foi realizada no dia 0, de acordo com o ponto 3.5.1. e repetida nos dias 1, 2, 3, 4, 8 e 9.

Durante os primeiros 3 dias, as quatro espécies de microalgas apresentaram um comportamento similar, com diferenças pouco significativas na fase de adaptação ao meio, com baixa produtividade generalizada, reagindo à agressividade do meio. Um comportamento

oposto ao que aconteceu no cultivo da água ruça, que pode ser explicado pela maior quantidade de nutrientes disponíveis, proporcional à quantidade superior de matéria orgânica que este efluente apresenta.

A *Cv* (*Chlorella vulgaris*) iniciou a fase exponencial no dia 2, atingindo o máximo de produtividade no dia 4, com 592,5 mg/L. Ainda conseguiu aumentar até 690,0 mg/L no dia 8, mas no final do ensaio já acusava incapacidade de produção de biomassa. O comportamento da *Cp* (*Chlorella protothecoides*) foi similar, apesar de ter iniciado a maior fase de crescimento no dia 3, com um máximo de 691,6 mg/L no dia 9.

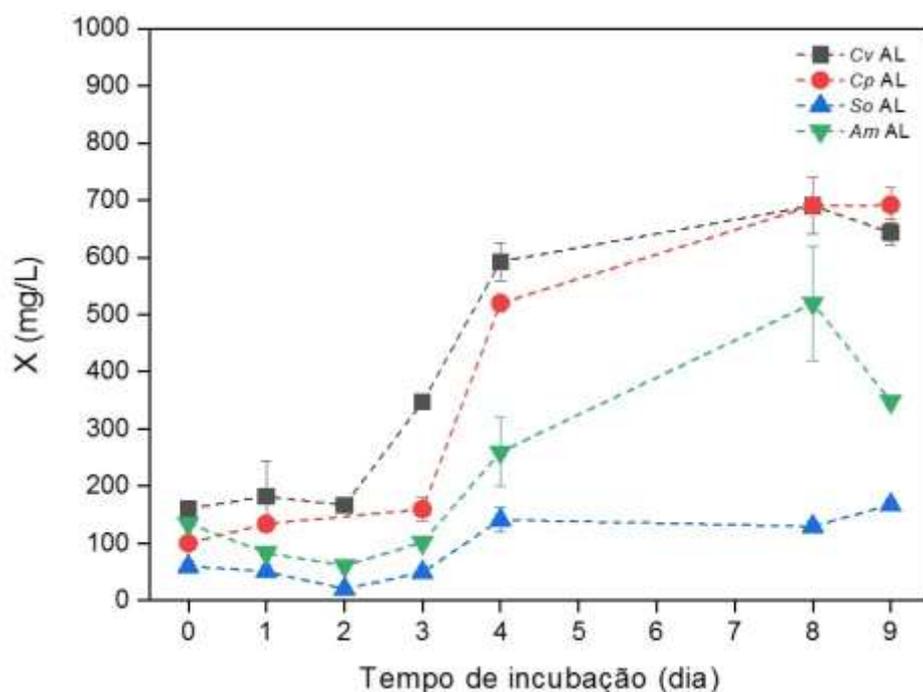


Figura 4.3. Variação do peso seco (X mg/L) na água de lavagem, em função do tempo (dia), das espécies: *Chlorella vulgaris* (*Cv*), *Chlorella protothecoides* (*Cp*), *Scenedesmus obliquus* (*So*) e *Arthrospira maxima* (*Am*).

A *So* (*Scenedesmus obliquus*) foi a espécie que, visivelmente, menos se adaptou a este meio de cultivo, uma vez que o peso máximo obtido foi de 167,6 mg/L no último dia do ensaio, dia 9. A produtividade desta microalga ficou muito aquém do esperado, não tendo sequer existido uma exponenciação do seu crescimento. A *Arthrospira maxima* (*Am*) mostrou alguma resistência ao meio de cultivo, com pesos baixos até ao dia 3. Do dia 3 para o dia 4 mais do que duplicou o seu peso, passando de 102,0 mg/L para 260,0 mg/L e até ao dia 8 cresceu exponencialmente, com registo de 520,0 mg/L nesse dia, após o qual se veio a verificar a morte celular.

4.2.3. Produtividade e pH

A produtividade média permite a estimativa da quantidade de biomassa que potencialmente se pode gerar numa cultura, mas para um processo industrial, o esperado é que as culturas permaneçam continuamente na fase exponencial, onde a cultura apresenta uma produtividade máxima. Assim, este parâmetro é crucial para a identificação das condições ótimas de cultura, pois quanto mais elevado for o seu valor, mais eficiente está a ser o crescimento.

Para o nosso estudo podemos observar, na Tabela 4.2., quais os dias em que cada uma das espécies de microalgas atingiu o peso máximo, em cada um dos efluentes, bem como os dias que corresponderam aos valores de produtividade máxima, de cada microalga e, também, para as condições do meio de água ruça e água de lavagem.

Tabela 4.2. Valores de peso seco máximo (X_{\max} mg/L) e produtividade máxima (Px_{\max} mg/L/d)

		X_{\max} (mg/L)	dia	Px_{\max} (mg/L/d)	dia
Água ruça	<i>Cv</i>	646,7 ± 75,4	4	115,1 ± 18,9	4
	<i>Cp</i>	783,3 ± 164,9	4	165,8 ± 34,1	4
	<i>So</i>	231,8 ± 68,1	8	38,3	4
	<i>Am</i>	400,0 ± 28,3	8	143,3	1
Água de lavagem	<i>Cv</i>	690,0 ± 70,7	8	107,9 ± 15,3	4
	<i>Cp</i>	691,6 ± 44,5	9	73,7 ± 3,6	8
	<i>So</i>	167,5 ± 13,3	9	20,4 ± 7,6	4
	<i>Am</i>	520,0 ± 141,4	8	48,1 ± 16,8	8

No que diz respeito aos pesos máximos obtidos para as microalgas, os valores variaram entre os 231,8 mg/L e os 783,3 mg/L no caso da água ruça e entre os 167,6 mg/L e os 691,6 mg/L para a água de lavagem.

Para a produtividade, verificou-se que os valores máximos diferiram entre 38,3 mg/L/d e 165,8 mg/L/d para a água ruça e 20,4 mg/L/d e 107,9 mg/L/d para a água de lavagem.

Verificou-se, também, que os valores em causa foram mais rapidamente atingidos no cultivo com água ruça do que com água de lavagem, ou seja, no primeiro caso a produtividade máxima aconteceu no dia 1 e 4, enquanto que para a segunda situação só se verificou nos dias 4 e 8.

Em suma, tanto no cultivo com água ruça, como no cultivo com água de lavagem, as espécies que mais biomassa produziram foram a *Chlorella vulgaris* (Cv) e a *Chlorella protothecoides* (Cp), com comportamento similar e a espécie com produção inferior de biomassa foi a *Scenedesmus obliquus* (So).

Os valores mais elevados obtidos no primeiro caso, podem ser explicados pelo facto de a água ruça ter uma quantidade superior de matéria orgânica, o que conduz a uma maior disponibilidade de nutrientes, para o crescimento das microalgas. No entanto, também verificamos que a morte celular é precoce no caso da água ruça, o que quer dizer que, e apesar da maior disponibilidade de nutrientes, a toxicidade do efluente se sobrepõe à capacidade reativa das microalgas.

Na água de lavagem, as microalgas demoram mais tempo a crescer, porque não têm disponível tanta quantidade de matéria orgânica, mas conseguem manter-se por mais tempo.

Em contrapartida, a espécie que produziu mais e em menos tempo na água ruça, foi a *Am*, com $P_{x_{max}}$ 143,3 mg/L/d, no dia 1. Esta microalga poderá ser a melhor opção para uma aplicação em grande escala, uma vez que produz mais biomassa e em menos tempo, conseguindo tirar partido da maior quantidade de nutrientes disponíveis, antes que a toxicidade do efluente se faça notar. Na água de lavagem, a espécie que mais produz em menos tempo é a Cv, embora com uma fase de adaptação mais prolongada.

Durante os ensaios e, como mostra a Figura 4.4., foi possível observar agregados da biomassa microalgal, em resposta à agressividade dos meios a que as quatro espécies foram sujeitas, pois em situações de stresse as microalgas tendem a aglomerar.



Figura 4.4. Aglomerados microalgais como resposta às condições adversas.

O pH é um fator importante no cultivo de microalgas, porque influencia o seu crescimento e a disponibilidade de nutrientes. Para além disso, também interfere com a forma como o nitrogénio amoniacal se encontra no meio.

As análises do pH, nas nossas culturas, são demonstradas na Tabela 4.3. e permitem observar a variação de resultados em cada uma delas.

Tabela 4.3. Variação do pH ao longo dos ensaios.

		pH inicial	pH final
Água ruça	Controlo	4,29	4,34
	<i>Cv</i>	4,67	7,17
	<i>Cp</i>	4,81	7,27
	<i>So</i>	4,39	5,67
	<i>Am</i>	9,37	8,38
Água de lavagem	Controlo	4,34	4,40
	<i>Cv</i>	4,79	7,79
	<i>Cp</i>	5,04	7,86
	<i>So</i>	4,13	4,43
	<i>Am</i>	9,61	9,38

Como demonstra a Tabela 4.3., o pH manteve-se praticamente inalterado nos controlos sem inóculo, em ambos os efluentes.

Tanto na água ruça como na água de lavagem, as espécies de microalgas que demonstraram maior alteração do valor do pH foram a *Chlorella vulgaris* (*Cv*) e a *Chlorella protothecoides* (*Cp*), estando este facto diretamente relacionado com o crescimento da biomassa, pois foram as espécies que mais se desenvolveram nos meios em estudo. Associado a este aumento do pH esteve, também, a alteração da cor das culturas, que se tornaram verde mais escuro, em consequência do aumento da atividade fotossintética.

Os valores de pH, para a *Scenedesmus obliquus* (*So*), quase não se alteraram na água de lavagem e verificou-se uma pequena subida na água ruça, pois foi neste efluente que esta espécie conseguiu produzir mais biomassa, conseguindo remover mais compostos de carbono, que são responsáveis pela acidificação do meio.

As pequenas descidas de pH do meio com a microalga *Arthrospira maxima* (*Am*), podem estar associadas à diminuição da quantidade de azoto total, entretanto consumido.

4.3. Avaliação do potencial biorremediador das microalgas nos efluentes

Neste ponto foi avaliada a eficácia das quatro espécies de microalgas (*Cv*, *Cp*, *So* e *Am*) na remoção de CQO, polifenóis, fósforo e azoto, em cada um dos efluentes (AR e AL) e comparativamente a controlos sem inóculo.

4.3.1. Remoção de CQO

Na Figura 4.5. podemos observar a descida gradual dos valores de CQO da AR (remoção de 24,2%) no controlo sem inóculo, pela influência de organismos (provavelmente fungos) que, entretanto, se desenvolveram no mesmo e que fazem uso do oxigénio dissolvido na matéria orgânica disponível.

As microalgas *Chlorella vulgaris* (*Cv*) e *Chlorella protothecoides* (*Cp*), apresentam um comportamento semelhante, com percentagens de remoção da CQO de 58,9% e 61,6%, respetivamente.

A elevada disponibilidade de matéria orgânica permitiu-lhes um consumo imediato, com remoção acentuada de CQO, até ao dia 4, correspondente à fase exponencial da produção heterotrófica e que coincide com o período de maior crescimento destas duas microalgas, verificado na Figura 4.2.

A mesma Figura demonstrou a morte celular destas duas espécies entre o dia 4 e o dia 8, o que quer dizer que a atividade registada para o mesmo período de tempo, pela Figura 4.6., pode ser da responsabilidade de espécies invasoras das culturas.

Ao longo do ensaio verificou-se o esbatimento da cor verde destas espécies, levando-nos a crer que a sua atividade fotossintética foi inibida pela elevada presença de carbono orgânico no meio.

A linha de remoção da *Scenedesmus obliquus* (*So*), apresenta oscilações pouco expressivas, embora com descida dos valores de CQO até ao último dia de ensaio, o que também é coincidente com o seu reduzido crescimento.

Similarmente, a microalga *Arthrospira maxima* (*Am*) apresentou remoção até ao último dia de ensaio, com maior incidência entre o dia 4 e o dia 8 (58,8 % de remoção da CQO), coincidindo, também, com a sua fase de maior crescimento (Figura 4.2.). No dia 10, esta espécie ainda apresentava cor verde, o que indica que, além do heterotrofismo, ainda existiu atividade fotossintética - mixotrofismo.

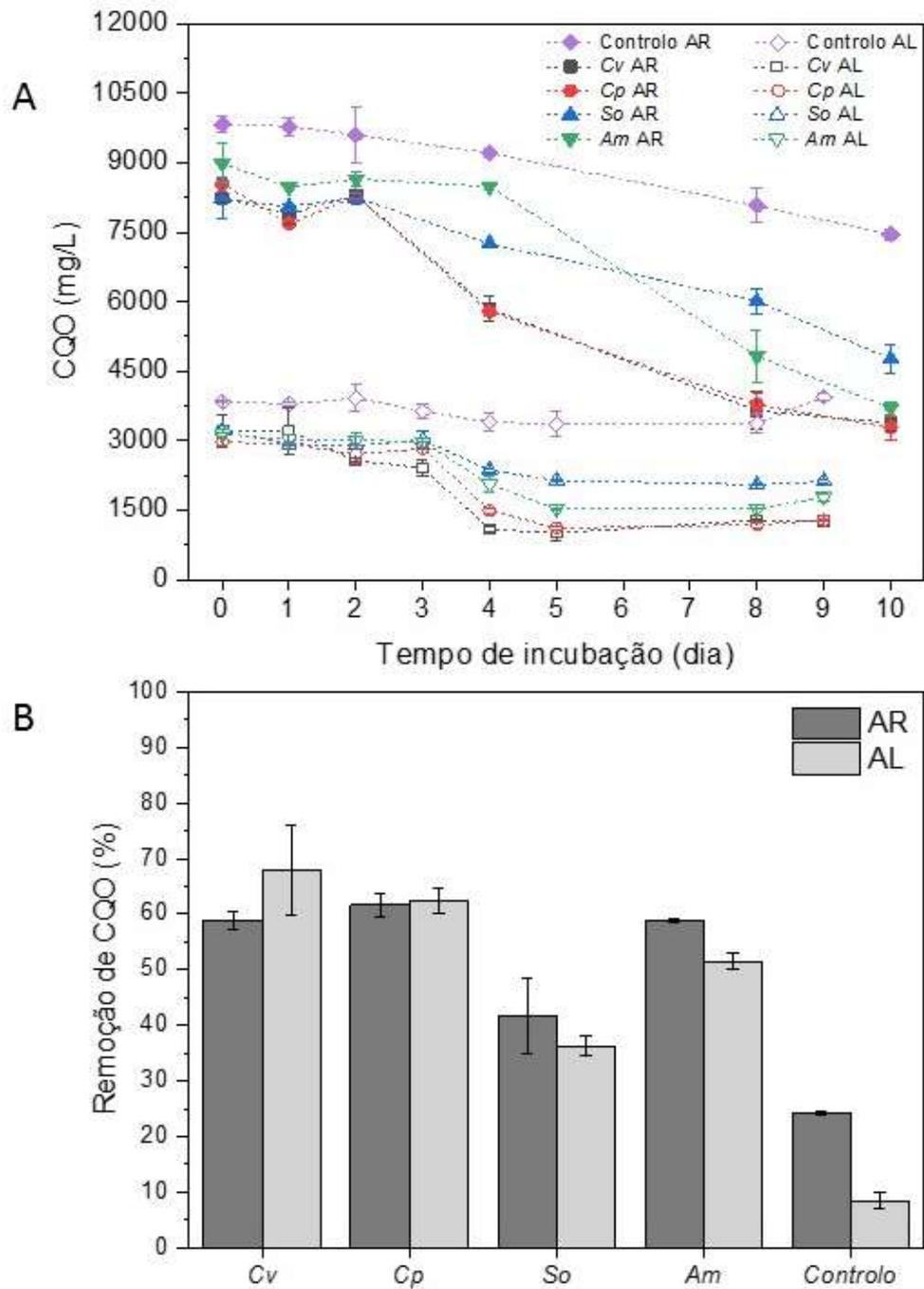


Figura 4.5. Variação de CQO em mg O₂/L/d (A) e percentagens de remoção (B) em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).

Para a água de lavagem (AL), a Figura 4.6. mostra uma linha de remoção praticamente sem oscilações, para o controlo sem inóculo, o que significa que neste efluente, diluído a 50%, não conseguiram proliferar os organismos que se desenvolveram na água ruça a 5%.

Para as quatro espécies de microalgas, as linhas de remoção são análogas e refletem o exibido na Figura 4.3. Ou seja, à remoção quase impercetível nos primeiros três dias do ensaio, seguiu-se um maior consumo, coincidente com a alteração do metabolismo das microalgas e consequente fase de maior crescimento das mesmas. O pico de remoções foi atingido no dia 4, com valores de 67,9% para a *Cv*, 62,5% para a *Cp*, 51,6% para a *Am* e 36,2% para a *So*.

Em todas as espécies se verificou a persistência da cor verde, até ao final do ensaio, mostrando claramente a combinação dos metabolismos auto e heterotrófico.

4.3.2. Remoção de polifenóis

Relativamente à remoção de polifenóis, em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL), a Figura 4.6. mostra que a expressão quantitativa destas substâncias é fator limitante.

Devido à enorme dificuldade de degradação biológica dos polifenóis, verifica-se que as microalgas demonstraram dificuldade na sua remoção, tanto na água ruça (AR), como na água de lavagem (AL).

Na água ruça, apenas a espécie *Arthrospira maxima* (*Am*) conseguiu valores de remoção mais significativos (40,3%), no primeiro dia, que correspondeu ao dia de maior crescimento.

A subida de valores, verificada a partir do dia 4 e para o controlo sem inóculo, pode dever-se a alteração da cor, que acabou por interferir com a leitura da absorvância ($\lambda = 765 \text{ nm}$).

Na água de lavagem (AL) as *Chlorellas* foram as microalgas que melhor lidaram com a elevada presença de polifenóis, com valores de remoção entre os dias 3 e 5, que atingiram os 46,6% para a *Cv* e os 48,1% para a *Cp*, intervalo esse também correspondente à fase exponencial de crescimento destas duas microalgas.

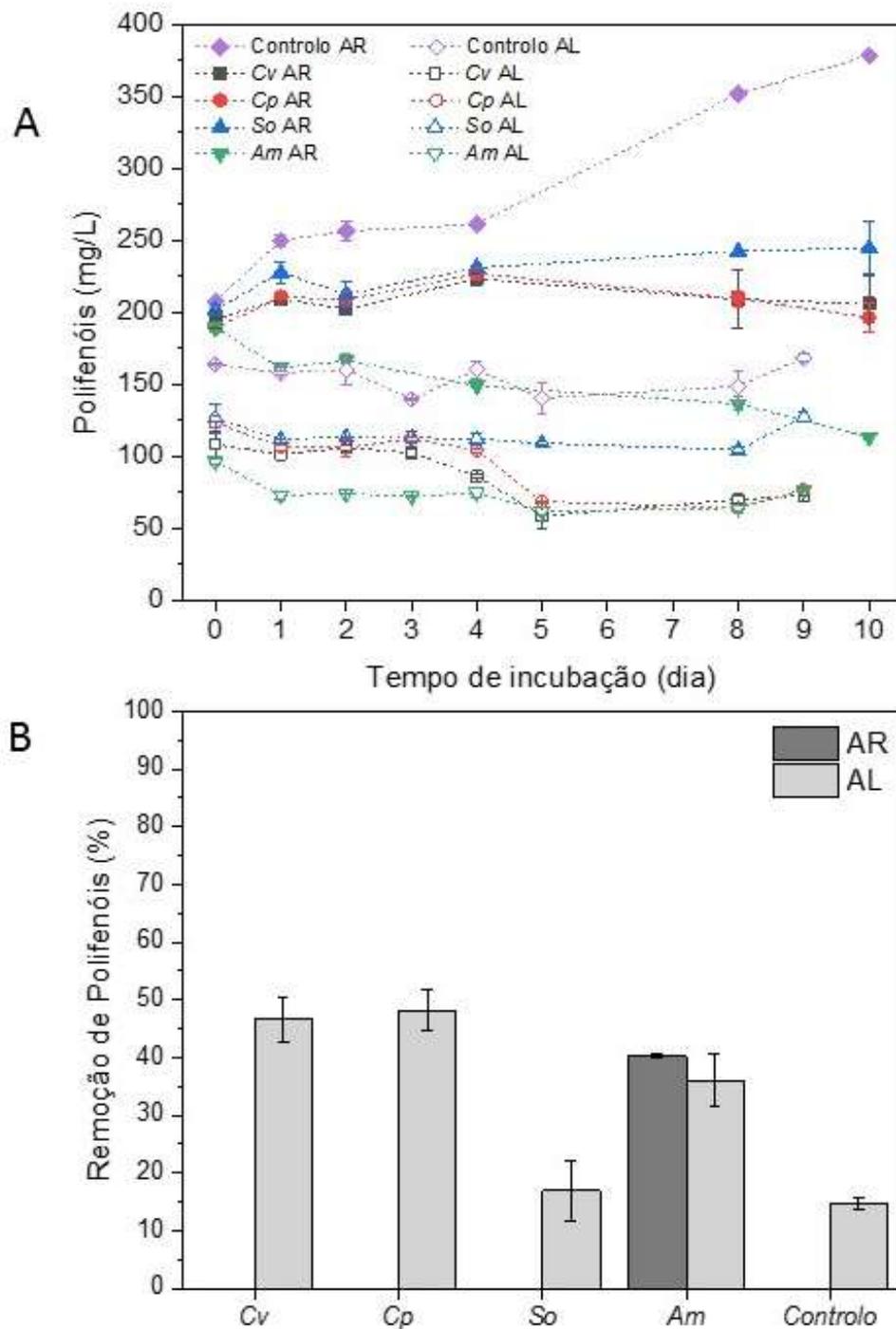


Figura 4.6. Variação dos polifenóis em mg/L/d (A) e percentagens de remoção (B) em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).

4.3.3. Variação de P-PO₄ e N-NO₃

A concentração de PO₄³⁻ no meio é um dos parâmetros mais importantes a controlar, dada a importância da razão N/P para o crescimento das microalgas, sendo que a concentração de P deverá ser suficiente para não se tornar no nutriente limitante.

A Figura 4.7. mostra a variação e remoção de P-PO₄, ao longo dos ensaios na água ruça (AR) e na água de lavagem (AL) para todas as microalgas. Para a água ruça (AR), podemos observar uma descida de valores logo nos primeiros dias e que é, ainda mais evidente, para a espécie *Arthrospira maxima* (Am) - 67,0 % de remoção, seguindo-se uma estabilização dos valores de fósforo.

Nas microalgas *Chlorella vulgaris* (Cv) e *Chlorella protothecoides* (Cp), verifica-se subida das concentrações deste macronutriente a partir do dia 5, o que pode estar relacionado com a morte celular, mostrada pela Figura 4.2.

Na água de lavagem, o maior consumo de fósforo foi verificado para a *Arthrospira maxima* (Am), a partir do dia 2, com um máximo de 36,0% de remoção.

Atribuímos o aumento, sem sentido, que se verifica na concentração de fósforo para as espécies *Chlorella vulgaris* (Cv) e *Chlorella protothecoides* (Cp), ao facto de as amostras do filtrado terem sido armazenadas durante algum tempo, antes da análise, levando à contaminação das mesmas.

O comportamento verificado para a *Arthrospira maxima* (Am), nos dois efluentes (AR e AL) e segundo Gonçalves *et al.*, 2017, deveu-se não só a consumo microalgal, mas também ao valor elevado do seu pH, uma vez que, acima de 8 pode ocorrer a precipitação do fósforo.

A percentagem de remoção de 36,9% (superior à verificada para as *Chlorellas*), observada no controlo, da água ruça, é consequência da proliferação de outros organismos heterotróficos.

A literatura diz-nos que uma análise das células das algas pode revelar na sua composição: 52,4% de carbono + 7,4% de hidrogénio + 29,7% de oxigénio + 9,2% de azoto + 1,3 de fósforo, numa base de peso seco sem cinzas (Oswald, 1988). Assim, a fórmula estequiométrica para o material celular das algas corresponde a C₁₀₆H₁₈₁O₄₅N₁₆P, explicando o processo lógico de remoção de nutrientes, principalmente P e N.

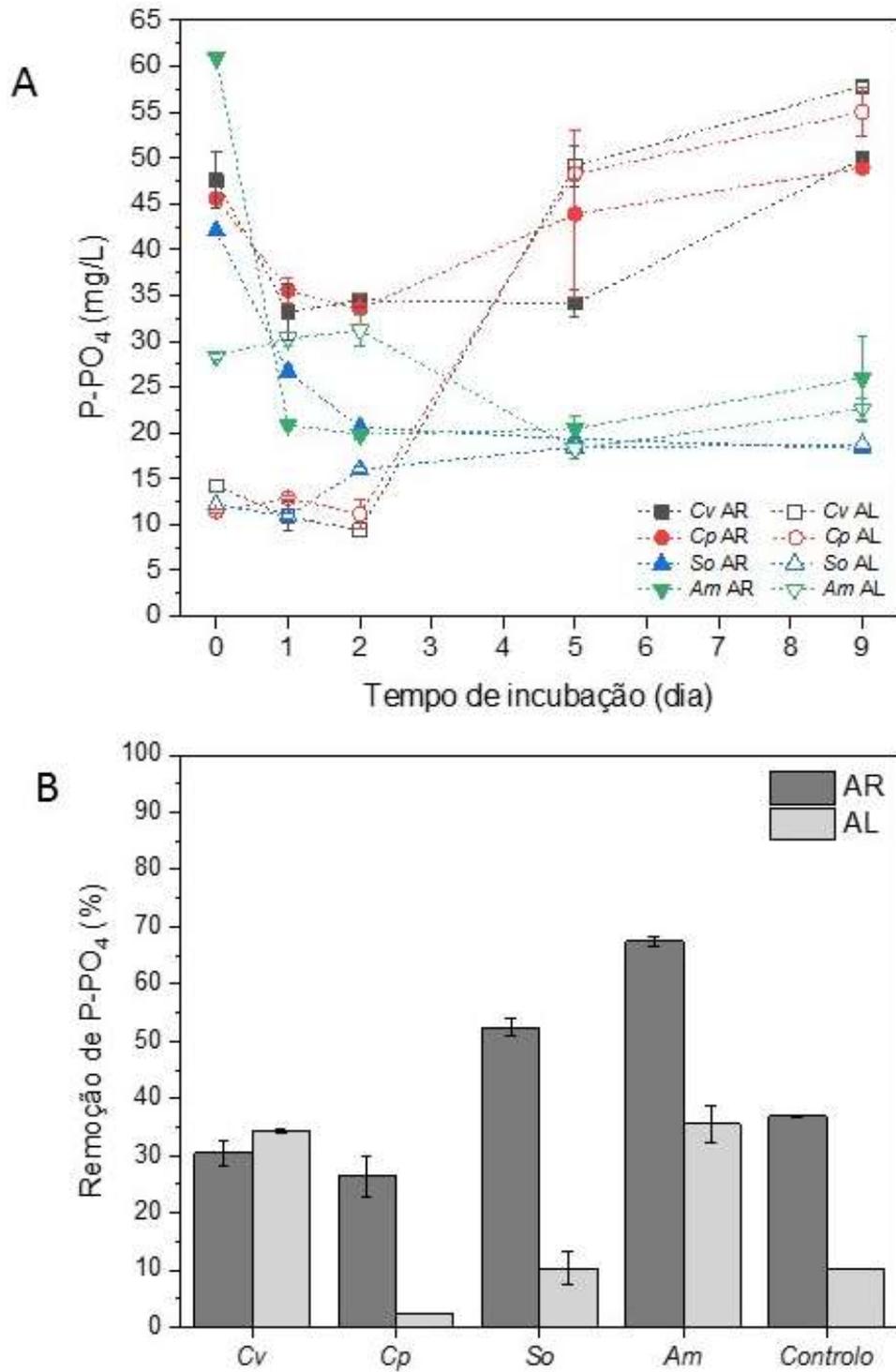


Figura 4.7. Evolução temporal de P-PO₄, mg/L (A) e taxas de remoção (B), em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).

A Figura 4.8. mostra a variação e remoção de N-NO₃, ao longo dos ensaios na água ruça (AR) e na água de lavagem (AL) para todas as microalgas.

Pela análise da concentração dos nitratos em função do tempo, bem como das percentagens de remoção que lhe estão associadas (Figura 4.8.), verifica-se a maior facilidade que as microalgas testadas tiveram em lidar com este nutriente, havendo uma remoção sempre superior a 50,0%.

No ponto 4.1. constata-se que, na água de lavagem, o azoto é fator limitante (menor razão N/P). A Figura 4.8. mostra que, no geral, as remoções foram maiores na água de lavagem, comprovando a quantidade inferior de nutriente disponível, que pode ser consumido.

Destaca-se o comportamento das espécies *Scenedesmus obliquus* (So) com uma percentagem de remoção de 84,0 % e *Arthrospira maxima* (Am), também com 84,0 %, para a água ruça (AR) e água de lavagem (AL), respetivamente.

Se tivermos em conta o valor de remoção quase inexistente para os controlos (7,8% na água de lavagem e não observável na água ruça), podemos afirmar que as remoções verificadas, para as quatro espécies de microalgas, se devem efetivamente ao consumo pelas mesmas.

A baixa concentração de N, associada ao elevado teor de toxinas, condicionam fortemente as taxas de crescimento nestas águas residuais, de origem agroindustrial. No entanto, as microalgas possuem a capacidade de acumular lípidos nas suas células, que podem atingir concentrações muito elevadas, favoráveis à indústria dos biocombustíveis.

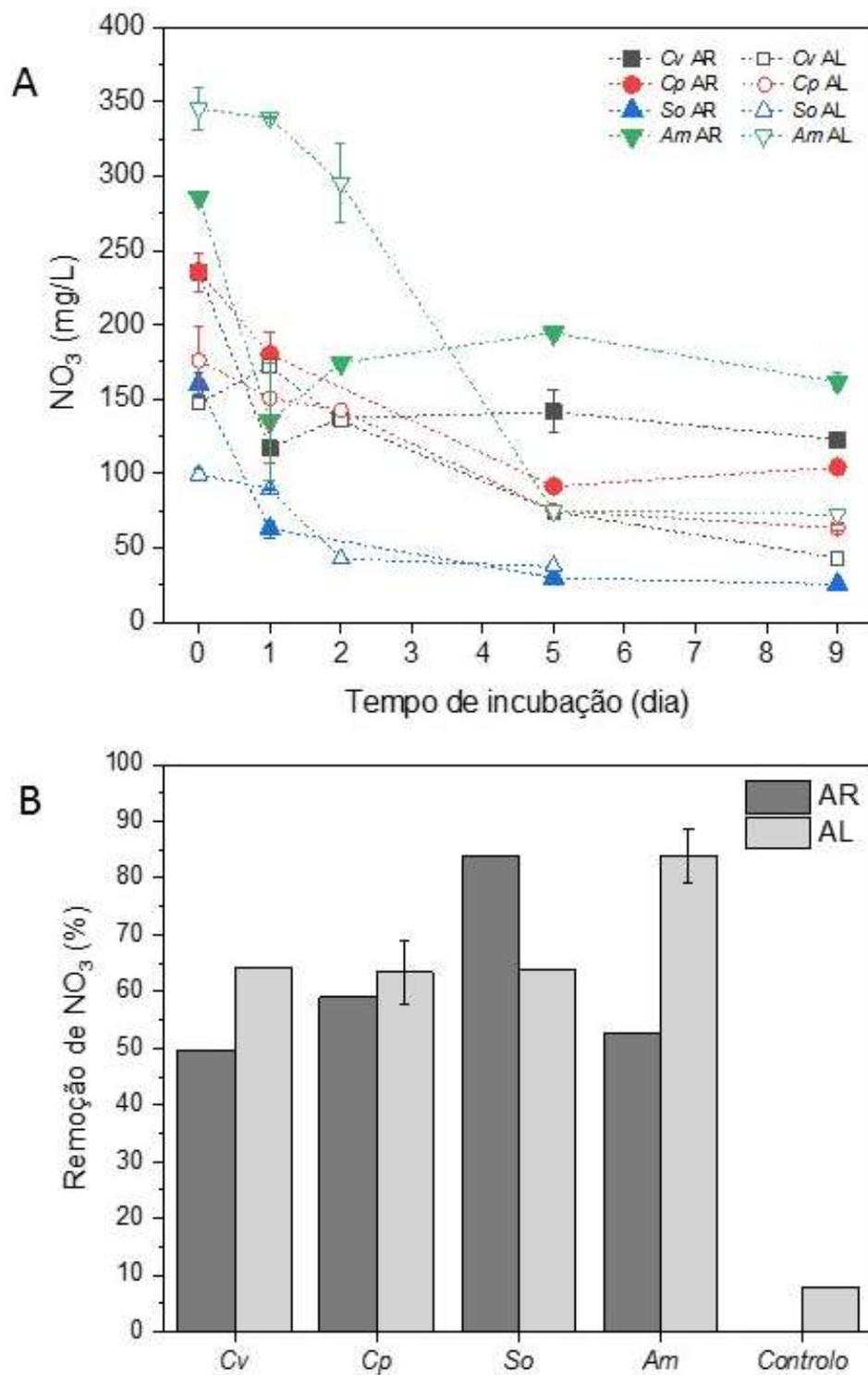


Figura 4.8. Evolução temporal de N-NO_3^- , mg/L (A) e taxas de remoção (B), em 5% de água ruça (AR) e 50% de água de lavagem (AL).

5. Conclusões e propostas de trabalho futuro

Atualmente, não existe uma solução única e universal para o tratamento efetivo dos efluentes líquidos resultantes da indústria extratora do azeite (águas ruças). No entanto, o cultivo e a utilização de microalgas, na transformação destas águas residuais, oferecem diversas vantagens, nomeadamente a remoção de contaminantes e a melhoria da qualidade dos efluentes após um tratamento secundário. Acresce uma grande poupança de água e a redução de custos em azoto e fósforo, presentes nos meios de cultivo.

Os objetivos iniciais do presente trabalho centraram-se na avaliação do crescimento de microalgas e na remoção de carga orgânica dos efluentes líquidos da indústria de extração do azeite.

Foram testadas, à escala laboratorial, três espécies de microalgas verdes, *Chlorella vulgaris* (Cv), *Chlorella protothecoides* (Cp), *Scenedesmus obliquus* (So) e a cianobactéria *Arthrospira maxima* (Am), inoculadas diretamente no meio.

A caracterização inicial dos dois efluentes em estudo, água ruça (AR) e água de lavagem de azeitona (AL), permitiu concluir que estes continham carga orgânica superior ao limite imposto pela legislação para descarga no meio ambiente, com confirmação inequívoca da sua complexidade.

Pela avaliação do crescimento das quatro espécies de microalgas, para o tratamento dos efluentes em estudo, através da aferição do peso seco, da produtividade máxima e do cálculo das percentagens de remoção de CQO, polifenóis, fósforo e nitratos, concluiu-se que as diluições utilizadas de 5% para a água ruça e 50% para a água de lavagem, por si só, não viabilizam a concretização dos objetivos pretendidos.

Para ambos os efluentes, os inóculos da *Chlorella protothecoides* (Cp) foram os que melhor responderam, com pesos máximos (X) de 783,3 mg/L e produtividade máxima ($P_{X_{max}}$) de 165,8 mg/L/dia para a água ruça (AR) e $X = 691,6$ mg/L, $P_{X_{max}} = 107,9$ mg/L/dia para a água de lavagem (AL).

No entanto, quando cultivadas na água ruça, o início da sua morte celular verificou-se ao dia 4, indicativo de que a toxicidade dos efluentes se sobrepôs à capacidade de degradação da matéria orgânica, por parte das microalgas. Ou seja, apesar da grande quantidade de nutrientes disponíveis, as microalgas não conseguem exponenciar o seu consumo, por saturação celular e conseqüente morte.

As percentagens de remoção de CQO oscilaram entre os 41,8% e os 61,6% no caso da água ruça e entre os 36,2% e os 67,9%, nas culturas com água de lavagem, sendo as espécies *Scenedesmus obliquus* (*So*) e as *Chlorellas* as que apresentaram pior e melhores resultados, respetivamente.

Relativamente aos polifenóis, devido à enorme dificuldade de degradação biológica, na água ruça, apenas a microalga *Arthrospira maxima* (*Am*) mostrou capacidade de remoção deste poluente (40,3%). Na água de lavagem houve um aumento da percentagem de remoção, sendo que as *Chlorellas* tiveram um comportamento semelhante, na ordem dos 50%.

Devido à baixa biodegradabilidade apresentada pelos efluentes estudados tornar-se-á necessário recorrer a tratamentos físico-químicos alternativos como, por exemplo, os processos de oxidação avançados, nomeadamente o processo Fenton. Ainda, um tratamento primário com base na floculação e filtração promoveria uma maior remoção da matéria orgânica e inorgânica, o que resultaria num meio de cultura com menor turbidez, cor e partículas coloidais, favorecendo a iluminação da cultura.

A espécie melhor adaptada à remoção do macronutriente fósforo (P-PO₄) foi a *Arthrospira maxima* (*Am*), com percentagens de 67,0% para a água ruça e 36,0%, para a água de lavagem, porquanto que os nitratos (N-NO₃), foram mais facilmente removidos, com percentagens de remoção sempre superiores a 50%, sendo o azoto (N) o nutriente limitante, tanto na água ruça como na água de lavagem.

Num trabalho futuro, a avaliação da concentração de nutrientes, com base nas eficiências de remoção, poderia ser apoiada através da aplicação de consórcios de microrganismos cujas vias metabólicas se complementem com o comportamento das microalgas utilizadas.

De uma forma geral, as espécies *Chlorella vulgaris* (*Cv*) e *Chlorella protothecoides* (*Cp*), seriam as mais indicadas, para a continuação dos estudos, de fitorremediação destas águas residuais, desde que pré-tratadas e ajustadas as condições ótimas de crescimento. Esta possibilidade é apoiada em diferentes estudos presentes na literatura, que atribuem, a estas espécies, uma boa capacidade de tratamento de efluentes e resistência a ambientes mais adversos. Acresce que, com inóculos iniciais de maior concentração, ao testado no nosso estudo (≈ 150 mg biomassa/L), será possível reduzir o efeito inibitório do meio de cultura, promovendo desta forma a multiplicação celular, o aumento da capacidade de degradação da matéria orgânica e a eficiência de remoção de fósforo e azoto.

Como conclusão final, pode afirmar-se que estes efluentes, apesar de extremamente problemáticos, podem ser um meio de cultura de baixo custo, tendo em conta que preenchem os requisitos básicos de nutrientes para o crescimento de microalgas, se expostos a sistemas integrados de vários tratamentos que permitam a recuperação efetiva da água.

Devido ao facto da oscilação diária e sazonal da temperatura e a expressividade luminosa possuírem uma forte influência nas taxas de crescimento das microalgas e, por conseguinte, na remoção da carga orgânica e dos nutrientes do efluente testado, deverá ser realizada a avaliação do comportamento das culturas em ambiente exterior.

A integração da biorrefinaria, neste processo de biorremediação, deve ser igualmente um dos trabalhos futuros, tendo em atenção que o processamento a jusante da biomassa microalgal, pode resultar em lípidos, adequados para a produção de biocombustíveis, proteínas e pigmentos, para incorporação na alimentação animal e, também, numa variedade de produtos de elevado valor acrescentado.

Referências bibliográficas

- Abdelaziz, A. E., Leite, G. B., Hallenbeck, P. C., 2013. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels, *Environmental Technology*, **34**, 13-14, 1807-1836.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**(3), 257-275.
- Abou-Shanab, R. A. I., Ji, M. K., Kim, H. C., Paeng, K. J., Jeon, B. H., 2013. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of Environmental Management*, **115**, 257-264.
- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., Schenk, P. M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial cell factories*, **11**, 96.
- Afify, A., El Baroty, G. S., El Baz, F. K., El Baky, H. H., Murad, S. A., 2018. *Scenedesmus obliquus*: Atividade antioxidante e antiviral de proteínas hidrolisadas por três enzimas. *Genetic engineering and biotechnology*, **16**, 399-408.
- Aggouna, M., Arhabd R., Cornua A., Portelli J., Barkatc M., Grauleta B., 2016. Olive mill wastewater microconstituents composition according to olive variety and extraction process, *Food Chemistry*, **209**, 72-80.
- Aires, C. M. G. L. S., 2007. Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extração de azeite em solos agrícolas - Efeito sobre alguns parâmetros químicos indicadores do estado de fertilidade do solo, o estado de nutrição e produtividade de algumas culturas. Tese de Doutorado, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Albuquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia D., Cegarra J., 2004. Agrochemical characterisation of alperujo, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction., *Bioresource Technology*, **91**, 195-200.
- Alver, A., Bas, türk, E., Kılıc, A., e Karatas, Aksaray, M., 2015. Use of advance oxidation process to improve the biodegradability of olive oil mill effluents. *Process Safety and Environmental Protection*, **98**, 319-324.
- Amaral-Silva, N., Martins, R. C., Castro-silva, S., e Quinta-, R. M., 2016. Integration of traditional systems and advanced oxidation process technologies for the industrial treatment of olive mill wastewaters.
- Amaro, H.M., Guedes, A. C., Malcata, F. X., 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*, **88**, 3402-3410.
- Ananyev, G., Dismukes, G. C., 2005. Quão rápido o fotossistema II pode dividir a água? Desempenho cinético em altas e baixas frequências. *Photosynth*, **84**, 355-365.
- Anele, U., Yang, W., McGinn, P., Tibbetts, S., McAllister, T., 2016. Ruminant in vitro gas production, dry matter digestibility, methane abatement potential, and fatty acid biohydrogenation of six species of microalgae. *Canadian Journal of Animal Science*, **96**, 354-363.
- Aparicio R., Harwood J., 2013. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties, 2^{ed}, *Springer Science*, 67-92, New York.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20^{ed}, American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., Raymundo, A., 2013. Comparison of microalgal biomass profiles a novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, **2**, 164-173.
- Bennamoun, L., Afzal, M.T., Léonard, A., 2015. Drying of algae as a source of bioenergy feedstock and food supplement. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **50**, 1203-1212.
- Bjerk, T. R., 2012. Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental. Universidade de Santa Cruz do Sul, Brasil.
- Brennan, L., Owende, P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 557-577.
- Cheirsilp, B., Torpee, S., 2012. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *BioreSource Technology*, **110**, 510-516.
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F. W., Chang, J. S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, **78**, 1-10.
- Chen, G., Zhao, L., Yun QI, Y., 2015. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: a critical review. *Applied Energy*, **137**, 282-291.

- Chisti, Y., 2004. Microalgae: our marine forests. Book reviews. Richmond, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford, *Blackwell Science*, 566.
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Huang, T. T., Lin, C. J., Ong, S. C., Chen, C. D., Lin, C. S., 2011. *Bioresour. Technol.*, **102**, 9135.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P., Bonos, E., 2011. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **62**, 794-799.
- Cooney, M., Young, G., Nagle, N., 2009. Extraction of Bio-oils from Microalgae; *Separation & Purification Reviews*, **38**, 291-325.
- Costa, J.A.V., Morais, M. G., Dalcanton, F., Reichert, C. C., Durante, A. J., 2006. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **61**, 105-110.
- da Silva, F., 2006. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Dal Magro, C., Deon, M. C., Thomé, A., Piccin, J. S., Colla, L. M., 2013. *Quim. Nova*, **36**, 1139.
- de Jesus Raposo, M. F., de Morais, A. M. M. B., 2015. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. *Life Sciences*, **125**, 32-41.
- Demirbas, A., 2010. Use of algae as biofuel sources, *Energy Conversion and Management*, **51**, 2738-2749.
- Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud F., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies, *Process Biochemistry*, **48**, 1532-1552.
- Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M., Fett, R., 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, **36**, 1959-1967.
- Di Caprio, F., Altimari, P., Pagnanelli, F., 2015. Integrated biomass production and biodegradation of olive mill wastewater by cultivation of *Scenedesmus* sp. *Elsevier*.
- Dias, G., Hipólito, M., Santos, F., Lourega, R., de Mattia, J., Eichler, P., Alves, J., 2019. Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas - uma revisão. *Química Nova*, **42**, São Paulo.
- do Nascimento, R. C., 2016. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Tocantins, Brasil.
- dos Santos, F. M. L. F., 2017. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal.
- Eldalatony, M. M., Kabra, A. N., Hwang, J., Govindwar, S. P., Kim, K., Kim, H., Byong-Hun Jeon, B., 2016. Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/extraction of reducing sugars and proteins. *Bioprocess Biosyst Eng.*, **39**, 95-103.
- European Commission., 2015. Renewable energy, moving toward a low carbon economy.
- Ferraz, M., 2012. Contribuição para o estudo do tratamento de efluentes de lagares de azeite. Tese de mestrado em engenharia do ambiente, Universidade nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias.
- Ferreira, A., Marquesa, P., Ribeiro, B., Assemany, P., Mendonça, H. V., Barata, A., Oliveira, A. C., Reis, A., Pinheiro, H. M., Gouveia, L., 2018. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, **164**, 32-38.
- Ferreira, W. F. C., Sousa, C.F., 1998. Microbiologia, ISBN, **1**, 978-972-757-024-9, Lisboa.
- Figueiredo, F., Maia, F., Castanheira, E., Pereira, J. A., Ramalhosa, E., Ramos, A., Gonçalves, A., Rodrigues, F., Marques, P., Gomes, P., Peres, F., Carneiro, J., Ferreira, A., Andrade, L.P., Feliciano, M., Freire, F., 2015. Ecoeficiência e Ecogestão no Setor do Azeite: Uma Avaliação de Ciclo de Vida. Instituto Politécnico de Bragança, Centro de Investigação de Montanha.
- Franco, A. L. C., Lôbo, I. P., Cruz, R. S., Teixeira, C. M. L. L., Almeida Neto, J. A. D., Menezes, R. S., 2013. *Química Nova*, **36**, 437.
- Garside, M., 2020. Ethanol fuel production in top countries.
- Gebreyohannesa, A. Y., Mazzeia R., Giorno L., 2016. Review: Trends and current practices of olive mill wastewater treatment: Application of integrated membrane process and its future perspective. *Separation and Purification Technology*, **162**, 45-60.
- Gilpin, A., 1997. Dictionary of Environment and Sustainable Development. Wiley. Chichester.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, **2017**, 403-415.
- Gonçalves, A. L., Rodrigues, C. M., Pires, J. C., Simões, M., 2016. *Algal Res.*, **14**, 127.
- Gonçalves, B. C. M., Canilha, L., Santos, J. C., Silva, M. B., Silveira, J. L., 2015. Microalgas par Produção de Biohidrogénio e Biodiesel. Janus, Lorena, **21**.
- Gouveia, L., 2016. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs: Scale-up considerations. *Algal Research*, **16**, 167-176.
- Gouveia, L., Janelas, J., Tropecêlo, A., Oliveira, A. C., 2014. Biodiesel production by in situ transesterification of *Nannochloropsis* sp. Biomass, Biotechnology Progress.

- Guglielmi, G., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N., 1993. Main properties that justify different taxonomic positions of *Spirulina* sp. and *Arthrospira* sp. among cyanobacteria. *Bulletin de l'Institute Océanographique, Monaco*, **12**, 13-23.
- Gutiérrez-Salmeán, G., Fabila-Castillo, L., Chamorro-Cevallos, G., 2015. Aspectos nutricionales y toxicológicos de *Spirulina* (*Arthrospira*). *Nutricion hospitalaria*, **32**, 34-40.
- Herrero, M., Martín-Álvarez, P., Señoráns, F., Cifuentes, A. e Ibáñez, E., 2005. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga; *Food Chemistry*, **93**, 417-423.
- Hillebrand, Helmut, Sommer, U., 1999. The Nutrient Stoichiometry of Benthic Microalgal Growth: Redfield Are Optimal Proportions. *Limnology and Oceanography* **44** (2), 440-46.
- Hodaifa, G., Malvis, A., Maiatah M., Sánchez S., 2020. Combination of physicochemical operations and algal culture as a new bioprocess for olive mill wastewater treatment. Espanha.
- Hodaifa, G., Martínez, M. E., Sánchez, S., 2007. Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, **99** (2008), 1111-1117.
- Hu, Q., Xiang, W., Dai, S., Li, T., Yang, F., Jia, Q., Wang, G., Wu, H., 2015. The influence of cultivation period on growth and biodiesel properties of microalga *Nannochloropsis gaditana* 1049. *Bioresource Technology*, **192**, 157-164.
- INAG - Instituto da Água, 2003. A Água, A Terra e o Homem - Ciclo da Água (reprodução da edição publicada em 1988 pela DGRN), 16.
- Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, 2007. As Aventuras e Desventuras de uma Pequena Gota de Água. INETI. Versão online no site do LNEG.
- IST, 2018. Hidrologia e Recursos Hídricos. Ciclo hidrológico - distribuição global da água. Lisboa.
- Jerónimo, C.E.M., 2012. Aplicação de processos de oxidação na degradação de efluentes de lagares de azeite. Tese de Mestrado em Química Industrial. Universidade da Beira Interior, Covilhã.
- Ji, M. K., Kabra, A. N., Salama, E. S., Roh, H. S., Kim, J. R., Lee, D. S., Jeon, B. H., 2014. Effect of mine wastewater on nutrient removal and lipid production by a green microalga *Micratinium reisseri* from concentrated municipal wastewater. *Bioresource Technology*, **157**, 84-90.
- John, R. P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol; *Bioresource Technology*, **102**, 186-193.
- Jones, C., Mayfield, S., 2012. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy, *Current Opinion in Biotechnology*, **23**, 346-351.
- Kovač, D. J., Simeunović, J. B., Babić, O. B., Mišan, A. Č., & Milovanović, I. L., 2013. Algae in food and feed. *Food and Feed Research*, **40**, 21-31.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., Das, D., 2014. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, **167**, 358-366.
- Lafka T., Lazou A. E., Sinanoglou V. J., Lazos E. S., 2011. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, **125**, 92-98.
- Lam, M. K., Lee, K. T., 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, **30**, 673-690.
- Lee, A. K., Lewis, D. M., Ashman, P. J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements, *Biomass and Bioenergy*, **46**, 89-101.
- Lucas, M. S., Beltrán-Heredía, J., Sanchez-Martin, J., Garcia, J., Peres, A. J., 2013. Treatment of high strength olive mil wastewater by Fenton's reagent and aerobic biological process. *Journal of Environmental Science and Health*, **48**, 954-962.
- Lucas, M. S., Peres, J. A., 2009. Removal of COD from olive mill wastewater by Fenton's reagent: Kinetic study, *Journal of Hazardous Materials*, **168**, 1253-1259.
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., Prates, J. A., 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, **205**, 111-121.
- Martins R. C., Rossi A. F., Quinta-Ferreira R. M., 2010. Fenton's oxidation process for phenolic wastewater remediation and biodegradability enhancement, *Journal of Hazardous Materials*, **180**, 716-721.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 217-232.
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A. J., 1999. *Biotechnol.* **70**, 33.
- Mert B., Yonar T., Kiliç M., Kestioglu K., 2010. Pre-treatment studies on olive oil mill effluent using physicochemical, Fenton and Fenton-like oxidations processes, *Journal of Hazardous Materials*, **174**, 122-128.

- Moreira, D. R., 2010. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Nayak, M., Karemore, A., Sen, R., 2016. *Algal Res.*, **16**, 216.
- Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragán, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A., Mendes, R. L., Sovová, H., Palavra, A. F., Gouveia, L., 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga - Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass; *Bioresource Technology*, **135**, 128-136.
- Oliveira, A. C., Barata, A., Batista, A. P., Gouveia, L., 2018. *Environ. Technol.*
- Onay, M., 2019. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetracontoma* MEO3 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. *Fuel*, **239**, 1315-1323.
- Pagnanelli, F., Altamari, P., Trabucco, F.L. Toro, 2014. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate, *Technol. Biotechnol.*, **89**, 652-661.
- Parmar, A., Singh, N., Pandey, A., Gnansouno, E., Madamwar, D., 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels, *Bioresource Technology*, **102**, 10163-10172.
- Peres, J. A., Lucas, M. S., 2011. Processos de Oxidação Avançados: Fundamentos Teóricos e Aplicações no Tratamento de Águas e Efluentes, UTAD, Vila Real.
- Peres, J. A., Santos, L. C., 1998. Alguns processos de valorização e tratamento das águas ruças: uma breve síntese. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. **98**, 393-398. Portugal.
- Pérez, H. E. B., 2007. Biodiesel de Microalgas. São Paulo.
- Pimenta, S. F. P., 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal.
- Pinto L., 2003. Azeite e Ambiente. *Revista Voz da Terra*, 5-18.
- Pires, J. C., Alvim-Ferraz, M. C., Martins, F. G. e Simões, M., 2012. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 3043-3053.
- Pittman, J. K., Dean, A. P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *BioreSource Technology*, **102**, 17-25.
- Poelman, E., De Pauw, N., Jeurissen, B., 1997. Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae, *Resources, Conservation and Recycling*, **19**, 1-10.
- Priyadarshani, I., Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae - A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, **3**, 89-100.
- Quintela, A. C., 1996. Hidrologia e Recursos Hídricos. Instituto Superior Técnico. Lisboa.
- Radmann, E. M. e Costa, J. A. V., 2008. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Química Nova*, **31**, 1609-1612.
- Rahmanian N., Jafari S. M., Galanakis C. M., 2014. Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater, *J Am Oil Chem Soc*, **91**, 1-18.
- Rattapoltee, P., Kaewkannetra, P., 2014. Cultivation of microalga *Chlorella vulgaris* under different auto-hetero-mixotrophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy*, **78**, 4-8.
- Raven, P. H., 2001. *Biologia vegetal*. 6^{ed}, 906, Rio de Janeiro.
- Reck, L., Abreu, K. V., Davi, D. M. B., Magalhães, C. E. C., Alves, C. R., Pires-Cavalcanti, K. M. S., 2018. 12^o Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Gramado, Brasil.
- Richmond, A., Hu, Q., 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*: John Wiley & Sons.
- Rima J., Rahme K., Assaker K., 2014. Advanced Oxidation of Olive Mill Wastewater OMW by a Free-Radical Process Induced With Zero Valent Iron, *Journal of Food Research*, 3-6.
- Sánchez, S., Martínez, M. E., Espejo, M. T., Pacheco R., Espinola F., Hodaifa, G., 2000. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. Espanha.
- Santaeufemia, S., Torres, E., Mera, R., Abalde, J., *J. Hazard. Mater.* 2016, **320**, 315.
- Savitz, A., 2007. *A Empresa Sustentável: O Verdadeiro Sucesso é o Lucro com Responsabilidade Social e Ambiental*. Elsevier. Rio de Janeiro.
- Shelef, G., Sukenik, A., Green, M., 1984. Microalgae harvesting and processing: a literature review. United States.
- Silva, C. E. F., Sforza, E., Bertucco, A., 2018. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation. Effect of irradiation regime and intensity on *Tetradismus obliquus*. *J. Appl. Phycol.*, **30**, 261-270.
- Singh, G., Patidar, S. K., 2018. Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental management*, **217**, 499-508.

- Singh, R.N., Sharma, S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review; *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 2347- 2353.
- Slade, R., Bauen, A., 2013. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass and Bioenergy*, **30**, 1-10. **53**, 29-38.
- Slompo, L., 2018. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Soares, F., Martins, G. e Seo, E., 2013. An assessment of the economic aspects of CO₂ sequestration in a route for biodiesel production from microalgae; *Environmental Technology*, **34**, 13-14, 1777-1781.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, 87- 96.
- Stasinakis A. S., 2008. Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment - a mini review, *Global Nest Journal*, **10**, 376-385.
- Suali, E. e Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**, 4316-4342.
- Teixeira, P. I., 2001. Cadernos Didáticos de Ciências, 106. Ministério da Educação, Lisboa.
- Tibbetts, S. M., Whitney, C. G., MacPherson, M. J., Bhatti, S., Banskota, A. H., Stefanova, R., McGinn, P. J., 2015. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. *Algal Research*, **11**, 435-447.
- Tomaselli, L., 2004. The microalgal cell. In: Richmond, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: *Blackwell Science*, 3-19.
- Trivedi, J. *et al.*, 2015. Algae based biorefinery - How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **47**, 295-307.
- Tsagaraki E, Lazarides H. N., Petrotos K. B., 2007. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. In: Olive mill wastewater treatment, Springer, Berlin, 148.
- V.L. Singleton, J. A. Rossi, 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *Am. Journal Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- Valente, J. P. S., Padilha, P. M., da Silva, A. M. M., 2018. *Eclét. Química*, **22**.
- Wang, M., Kuo-Dahab, W. C., Dolan, S., Park, C., 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresource Technology* **154**, 131-137.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., 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**, 5494-5500.
- Zardo, I., 2011. Análise de viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de microalgas, 34. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., Yuan, Z., 2013. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggyery wastewater treatment. *Water Research*, **47**, 4294-4302.