



Jadielson Rodrigues da Silva

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* PARA REMOÇÃO DE
FERRO IÔNICO EM ÁGUA**

Horizontina-RS

2023

Jadielson Rodrigues da Silva

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* PARA REMOÇÃO DE
FERRO IÔNICO EM ÁGUA**

Projeto do Trabalho Final de Curso apresentado como requisito parcial para o Trabalho Final de Curso na Engenharia Química da Faculdade Horizontina, sob a orientação da Professora. Dra. Janice Zulma Francesquett

Horizontina-RS

2023

FAHOR - FACULDADE HORIZONTINA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

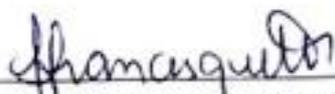
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o trabalho final de curso

UTILIZAÇÃO DE MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* PARA REMOÇÃO DE
FERRO IÔNICO EM ÁGUA

Elaborada por:
Jadielson Rodrigues da Silva

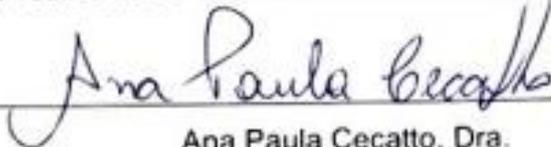
Como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia Química

Aprovado em: 27/11/2023
Pela Comissão Examinadora



Janice Zulma Francesquett, Dra.

Presidente da Comissão Examinadora - Orientador



Ana Paula Cecatto, Dra.

FAHOR – Faculdade Horizontina



Darciane Eliete Kerkhoff, Me.

FAHOR – Faculdade Horizontina

Horizontina - RS

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este estudo primeiramente a Deus por ter me fornecido sabedoria e capacidade de realiza-lo, à minha mulher que me acompanhou por toda minha trajetória acadêmica, à minha filha que passou a fazer parte desta história nos últimos semestre e também a meus pais e aos pais da minha mulher que me ajudaram a iniciar e me manter nesta caminhada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, à minha mulher e minha filha e a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

“É muito fácil dizer que confiamos em Deus quando nossa vida esta leve, mas a verdadeira prova de fé acontece quando encontramos desafios para superar”.

(Pensador)

RESUMO

O problema deste estudo é que metais pesados em concentrações excessivas geram grandes perigos tanto para a natureza quanto para os seres humanos bem como para processos industriais, e seu processo de remoção tem enfrentado algumas dificuldades. Sendo assim o uso da microalga *Chlorella vulgaris* para o processo de biorremediação de metais pesados como o íon de ferro pode ser eficiente. Como objetivo geral é analisar a eficiência da microalga *Chlorella vulgaris* no processo de remoção de íons de ferro de solução e os objetivos específicos são a pesquisa sobre remoção de íons de ferro de soluções aquosas a partir da microalga *Chlorella vulgaris*, entender como ocorre o mecanismo de remoção de metais pesados da microalga *Chlorella vulgaris*, construir um sistema de cultivo para reprodução das microalgas, realizar o cultivo das algas em ambiente controlado, avaliar a viabilidade do uso da microalga *Chlorella vulgaris* para remoção de ferro em água. A metodologia desta pesquisa foi desenvolvida na faculdade de Horizontina (FAHOR), abordando um método qualitativo e quantitativo, com campo de pesquisa descritivo-exploratório. O procedimento foi de caráter laboratorial com técnicas de coleta de dados através de experimentos. Os experimentos foram divididos em 3 grupos de testes, no grupo 1 foi realizado uma biorremediação com concentração de Fe de 60, 90 e 120 mg/L, no grupo 2, foi apenas de 120 mg/L e no grupo 3, foi de 1,2, 3, 6 e 12 mg/L. Os resultados obtidos no grupo 1 quanto a porcentagem de remoção de ferro do meio aquoso foi de 87 a 98%, no grupo 2 foi de 97 a 98% e no grupo 3 foi de 73 a 83% aproximadamente. Concluiu-se então de que esse processo testado mostrou-se ser eficiente, com remoção mínima de 73% de ferro iônico, além do mais mostrou uma viabilidade promissora, entretanto os resultados não atenderam as especificações da PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021, para o descarte de Fe no meio ambiente.

Palavra-chave: Biorremediação. Microalga. Metal pesado.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DE <i>C. VULGARIS</i> REPRESENTANDO DIFERENTES ORGANELAS.....	19
FIGURA 2 - DESENHOS MOSTRANDO AS DIFERENTES FASES DA FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR FILHA EM <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	20
FIGURA 3 - CÉLULAS RECÉM-FORMADAS EMERGINDO FORA DA PAREDE CELULAR DA CÉLULA-MÃE APÓS A ECLOSÃO.....	21
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE TAXA DE CRESCIMENTO DE ALGAS EM CULTURA (LINHA SÓLIDA) E A CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES (LINHA TRACEJADA EM FUNÇÃO DE UM PERÍODO DE TEMPO).	25
FIGURA 5 - DIAGRAMA SIMPLIFICADO DO METABOLISMO DAS MICROALGAS.	26
FIGURA 6 - CLASSIFICAÇÃO DOS SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS.	30
FIGURA 7 - EXEMPLO DE DIFERENTES TIPOS DE REATORES EM SISTEMAS ABERTOS.....	31
FIGURA 8 - REATORES DE CULTIVO DE MICROALGA EM VÁRIOS PAÍSES.....	31
FIGURA 9 - EXEMPLO DA CONFIGURAÇÃO DE REATORES DE SISTEMA FECHADO.....	32
FIGURA 10 - BIORREATOR DE PLACA PLANA.....	33
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DE BIORREATORES EM COLUNA.	34
FIGURA 12 - BIORREATOR DE BOLHAS.....	34
FIGURA 13 - BIORREATOR TUBULAR.....	35
FIGURA 14 - MECANISMO DE ADSORÇÃO E ABSORÇÃO DA CÉLULA DE MICROALGA.	44
FIGURA 15 - ESQUEMA DO SISTEMA DE CULTIVO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	49
FIGURA 16 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DOS TESTES DO GRUPO 1, COM 3 TRIPLICATAS DE CONCENTRAÇÕES DIFERENTES, TOTALIZANDO 9 EXPERIMENTOS E COM INDICATIVO DE QUE FOI REALIZADO UMA ANÁLISE DE PH EM CADA SOLUÇÃO PREPARADA.....	54
FIGURA 17 - ESQUEMA DOS TESTES NO PROCESSO DE AGITAÇÃO E REPOUSO.	55
FIGURA 18 - ESQUEMA DOS TESTES G1A1, G1B1 E G1C1 NO PROCESSO DE PREPARO DE AMOSTRA.	55
FIGURA 19 - ADIÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO NOS TESTES G1A3, G1B3 E G1C3.....	55
FIGURA 20 - EXPERIMENTOS G1A2, G1B2, G1C2, G1A3, G1B3 E G1C3 NO PROCESSO DE PREPARO DE ANÁLISE.....	56
FIGURA 21 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DOS TESTES DO GRUPO 2, COM 3 TESTES DE CONCENTRAÇÕES IGUAIS, E COM INDICATIVO DE QUE FOI REALIZADO UMA ANÁLISE DE PH EM CADA SOLUÇÃO PREPARADA.	58
FIGURA 22 - TESTES DO GRUPO 2 NO PROCESSO AGITAÇÃO E POSTERIORMENTE SEGUINDO PARA O PREPARO DE ANÁLISE.....	58
FIGURA 23 - ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DOS TESTES DO GRUPO 3, COM 4 TESTES DE CONCENTRAÇÕES DIFERENTES, E COM INDICATIVO DE QUE FOI REALIZADO UMA ANÁLISE DE PH EM CADA SOLUÇÃO PREPARADA.	59
FIGURA 24 - TESTES DO GRUPO 2 NO PROCESSO AGITAÇÃO E POSTERIORMENTE SEGUINDO PARA O PREPARO DE ANÁLISE.....	60
FIGURA 25 - PREPARO DOS TESTES E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E FINAIS DA SOLUÇÃO DE FERRO E DA SOLUÇÃO DE MICROALGA.	62

FIGURA 26 - ESQUEMA GERAL DA ORGANIZAÇÃO DOS TESTES EM QUE A CONCENTRAÇÃO SUPERIOR CITADA NA FIGURA SE REFERE AO TEOR INICIAL DE FE E A CONCENTRAÇÃO INFERIOR REFERE-SE AO TEOR FINAL DE FE.....	63
FIGURA 27 - SISTEMA DE CULTIVO DE MICROALGA.	69
FIGURA 28 - INÍCIO DO CULTIVO DA MICROALGA.	70
FIGURA 29 - ALTA CONCENTRAÇÃO DE MICROALGA EM QUE (A) PODE SER NOTADO COM VERDE INTENSO E EM (B) NOTA-SE PELA FORMAÇÃO DE GRÚMULOS NA MANGUEIA DE AERAÇÃO.....	71
FIGURA 30 - ATUALIZAÇÃO DO SISTEMA DE CULTIVO PARA 2 BIORREACTORES DE 5 LITROS.....	71
FIGURA 31 - REMOÇÃO DA BIOMASSA RETIDA NO MICROFILTRO APÓS PROCESSO DE FILTRAÇÃO A VÁCUO.	73
FIGURA 32 - NA FIGURA (A) POSSUI-SE A BIOMASSA REMOVIDA DE UM MICROFILTRO, E NA FIGURA (B), TEM-SE O MATERIAL ESPALHADO PELO RELÓGIO DE VIDRO COM UMA ESPÁTULA.....	75
FIGURA 33 - TESTES DO GRUPO 1 COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERRO JÁ EM CONTATO COM A MICROALGA.....	76
FIGURA 34 - MICROALGA EM MICROFILTRO, ANTES E DEPOIS DO PROCESSO DE REMOÇÃO DE FERRO.	77
FIGURA 35 - MICROALGA EM MICROFILTRO POSTERIOR AO PROCESSO DE REMOÇÃO DE FERRO NO GRUPO 3.	78
FIGURA 36 - LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS PARA AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE ABSORÇÃO DE FERRO.	80
FIGURA 37 - SOLUÇÕES DE FERRO PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	80
FIGURA 38 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE FERRO.	81
FIGURA 39 - COMPARAÇÃO VISUAL DE COLORAÇÃO DAS ANÁLISES DO GRUPO 2 COM UM PONTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE BIORREACTORES DE SISTEMA ABERTO E FECHADO.....	35
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DE ALGUNS MÉTODOS DE TRATAMENTO DE METAIS PESADOS.	42
TABELA 3 - FORMULA DE GUILLARD USADA NO CULTIVO DA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS.....	50
TABELA 4 - VISÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO GRUPO 1.	56
TABELA 5 - VISÃO DOS TESTES REALIZADOS NO GRUPO 2.	58
TABELA 6 - VISÃO DOS TESTES REALIZADOS NO GRUPO 3.	60
TABELA 7 - VISÃO GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NOS GRUPOS 1,2 E 3.....	61
TABELA 8 - IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE FERRO COM RESPECTIVAS INFORMAÇÕES SOBRE O PREPARO DE CADA SOLUÇÃO.....	64
TABELA 9 - COMPARAÇÃO DOS DOIS PROCESSOS DE PREPARO DE SOLUÇÃO USADOS NO ESTUDO.	74
TABELA 10 - VALORES DE PH DA BIORREMEDIAÇÃO DO GRUPO 1.	79
TABELA 11 - BIORREMEDIAÇÃO DO FERRO APÓS 24 HORAS DO GRUPO 1.	82
TABELA 12 - BIORREMEDIAÇÃO DO FERRO APÓS 48 HORAS DO GRUPO 1.	83
TABELA 13 - RESULTADOS DA BIORREMEDIAÇÃO DO GRUPO 2.....	84
TABELA 14 - RESULTADO DA BIORREMEDIAÇÃO DO GRUPO 3.....	85

LISTA DE EQUAÇÃO

EQUAÇÃO 1 - EQUAÇÃO DO RENDIMENTO DA FILTRAÇÃO A VÁCUO DA MICROALGA.	52
EQUAÇÃO 2 - EQUAÇÃO QUÍMICA DA FOTOSSÍNTESE.....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 TEMA.....	14
1.2 DELIMITAÇÃO DO TEMA.....	14
1.3 PROBLEMA DE PESQUISA	14
1.4 HIPÓTESES	14
1.5 OBJETIVOS	14
1.5.1 Objetivo geral.....	14
1.5.2 Objetivos específicos.....	14
1.6 JUSTIFICATIVA.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 MICROALGAS.....	17
2.2 <i>CHLORELLA</i>	18
2.2.1 Morfologia	18
2.2.2 Reprodução.....	20
2.2.3 Composição	21
2.2.4 Proteína	21
2.2.5 Lipídios.....	22
2.2.6 Carboidratos	22
2.2.7 Pigmentos	23
2.2.8 Minerais e vitaminas.....	23
2.3 CULTIVO	24
2.3.1 Crescimento.....	24
2.3.1.1 Metabolismo das microalgas.....	26
2.3.2 Fatores limitantes.....	27
2.3.2.1 Luz	27
2.3.2.2 Temperatura	28
2.3.2.3 Movimentação e aeração.....	28
2.3.2.4 Nutrientes.....	28
2.3.2.5 pH	29
2.3.3 Sistemas de cultivo	29
2.3.3.1 Sistemas abertos	30

2.3.3.2	Sistema fechado	32
2.3.4	Colheita	37
2.4	METAL PESADO.....	38
2.4.1	Ferro	39
2.4.1.1	Contaminação por ferro	39
2.4.1.2	Tratamentos para remoção de ferro.....	40
2.5	BIORREMEDIAÇÃO.....	42
2.5.1	Tipos de biorremediação	43
2.5.2	Biorremediação de metais pesados usando microalga	44
2.5.3	Fatores que influenciam na remoção de metais pesados usando microalgas	45
3	METODOLOGIA.....	48
3.1	CULTIVO DA MICROALGA.....	48
3.1.1	Aquisição da cepa, equipamentos e acessórios	48
3.1.2	Sistema de cultivo	48
3.1.3	Cultura	49
3.1.4	Colheita	51
3.2	PREPARO DE SOLUÇÕES	51
3.2.1	Solução algal	51
3.2.1.1	Método “a”	51
3.2.1.2	Método “b”	52
3.2.2	Soluções químicas	52
3.3	REALIZAÇÃO DOS TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DA REMOÇÃO DE FERRO.....	53
3.3.1	Grupo 1	54
3.3.2	Grupo 2.....	57
3.3.3	Grupo 3.....	59
3.3.4	Visão geral dos experimentos realizados	61
3.4	ANÁLISES	63
3.4.1	Análise de pH.....	63
3.4.2	Análise de ferro.....	64
3.4.2.1	Curva de calibração	64
3.4.2.2	Preparo dos testes	65
3.4.2.3	Metodologia para análise de ferro por UV-vis	65

3.5	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
4.1	SISTEMA DE CULTIVO	68
4.2	CULTURA.....	70
4.3	PREPARO DA SOLUÇÃO ALGAL	73
4.3.1	Características físicas da biomassa	74
4.4	TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DA REMOÇÃO DE FERRO	75
4.4.1	Grupo 1.....	75
4.4.2	Grupo 2.....	76
4.4.3	Grupo 3.....	77
4.5	ANÁLISE DE PH.....	78
4.6	ANÁLISE DE FERRO	79
4.6.1	Curva de calibração.....	79
4.6.2	Grupo 1.....	81
4.6.3	Grupo 2.....	83
4.6.4	Grupo 3.....	85
4.6.5	Possíveis interferentes	86
5	CONCLUSÕES.....	87
6	REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

Devido ao seu impacto significativo na saúde humana e meio ambiente, os metais pesados têm sido amplamente investigados em diferentes amostras ambientais. O desenvolvimento acelerado da expansão urbana, atividades agrícolas e o crescimento populacional, geraram cada vez mais poluição por esses tipos de íons. Além disso, processos que provocaram esse resultado de poluição foram também atividades atmosféricas, como eventos de circulação de tempestades, emissões de veículos, atividades industriais, entre outros (JIA, *et al.*, 2018).

Existem diversos processos físico-químicos que podem ser utilizados para remoção de metais pesados em água, como por exemplo: floculação, coagulação, troca iônica, precipitação química, eletroquímica, entre outros. Dentre esses métodos, a biorremediação tem recebido grande atenção como uma metodologia eficiente, econômica e ecologicamente correta para desintoxicar solos e águas contaminadas (SHANKAR, *et al.*, 2020).

De forma geral a biorremediação foca em reduzir ou eliminar compostos tóxicos ou poluentes que estão presentes no meio ambiente, usando materiais biológicos, como fungos, bactérias, algas entre outros. Dentre estes citados, as algas possuem alta capacidade de adsorção além de causar imobilização dos metais pesados e ainda possuírem um vantajoso custo-benefício (UBANDO, *et al.*, 2021).

Dentre as algas, possuímos as microalgas, em especial a *Chlorella vulgaris* que é uma alga verde unicelular, com crescimento fotoautotrófico possuindo como fatores limitantes a atenuação da luz, alteração de pH, limitação de carbono e acúmulo de oxigênio fotossintético. Esta microalga tem potencial para bioenergia industrial bem como para a biorremediação de diferentes qualidades de água residuais em função do seu alto teor de óleo, robustez, condições de cultivo mixotróficas, taxas de crescimento sob diversas condições adversas e ainda se mostra tolerante a altos níveis de metais pesados (YUVRAJ, *et al.*, 2016)

Partindo do exposto, o presente estudo tem como objetivo analisar a eficiência da microalga *Chlorella vulgaris* no processo de remoção de íons de ferro de soluções aquosas monoelementares sem alteração do meio para melhor eficiência.

1.1 TEMA

Biorremediação do íon de ferro II e III em solução aquosa.

1.2 DELIMITAÇÃO DO TEMA

Biorremediação do íon de ferro em solução aquosa a partir de microalgas vivas de *Chlorella vulgaris*.

1.3 PROBLEMA DE PESQUISA

Metais pesados em concentrações excessivas geram grandes perigos tanto para a natureza quanto para os seres humanos bem como para processos industriais, e seu processo de remoção tem enfrentado algumas dificuldades. Sendo assim o uso da microalga *Chlorella vulgaris* para o processo de biorremediação de metais pesados como o íon de ferro pode ser eficiente?

1.4 HIPÓTESES

Alguns metais pesados possuem a função de nutriente para a microalga ajudando na sua reprodução celular, por conta disso ela pode ser eficiente na remoção dos metais pesados de soluções aquosas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Analisar a eficiência da microalga *Chlorella vulgaris* no processo de remoção de íons de ferro de solução.

1.5.2 Objetivos específicos

Pesquisar sobre remoção de íons de ferro de soluções aquosas a partir da microalga *Chlorella vulgaris*.

Entender como ocorre o mecanismo de remoção de metais pesados da microalga *Chlorella vulgaris*.

Construir um sistema de cultivo para reprodução das microalgas.

Realizar o cultivo das algas em ambiente controlado.

Avaliar a viabilidade do uso da microalga *Chlorella vulgaris* para remoção de ferro em água.

1.6 JUSTIFICATIVA

Devido a crescente urbanização e industrialização, os metais pesados têm se dispersado em níveis perigosamente tóxicos para o meio ambiente, sendo assim o aumento da concentração destes na natureza possui forte ligação com atividades humanas (IBGERASE, *et al.*, 2019).

Os corpos hídricos possuem grandes capacidades de auto recuperação, entretanto, metais pesados presentes em efluentes industriais reduzem esta capacidade devido a sua ação tóxica nos microrganismos responsáveis por essa função que realizam a decomposição da matéria orgânica (ZENDRON, 2015).

O fator de principal interesse na remoção de metais pesados de corpos hídricos relaciona-se ao fato de que estes metais são contaminantes não-degradáveis e em corpos vivos gera acumulação, ou seja, ele não é eliminado. Esse processo de acumulação de metais pesados está ligado a incidências de diversas doenças degenerativas como o mal de *Parkinson* e *Alzheimer* (ZENDRON, 2015).

Por conta disso, existem processos convencionais de tratamentos para remoção de metais pesados como a evaporação, separação por membranas, precipitação, troca iônica, coagulação, floculação, entre outros. Porém, além de possuírem alto valor agregado para sua utilização, geram subprodutos que também necessitam de um tratamento ou destinação final do lodo gerado, necessitam de grandes quantidades de reagentes, possuem intolerância limitada a alteração de pH, entre outros (ZABOCHNICKA, *et al.*, 2018).

Partindo disso, pesquisas foram desenvolvidas buscando novas alternativas, mais econômicas, inovadoras, sustentáveis e proficientes para remoção de íons metálicos tóxicos de corpos hídricos. Como resultado encontraram a biorremediação que pode contribuir para um método mais ecologicamente correto (AHMAD, *et al.*, 2018).

Dentre os microrganismos que são capazes de realizar o processo de biorremediação, as microalgas têm recebido mais atenção, por possuírem baixo custo, reprodução acelerada, maior tolerância a alterações no ambiente, entre outros fatores. De forma geral as microalgas passam por dois processos para a remoção de metais,

o primeiro sendo a adsorção dos poluentes na parede celular e o segundo a bioacumulação (AHMAD, *et al.*, 2018).

Foram realizados alguns estudos sobre o potencial de biorremediação das microalgas frente a metais pesados como o FRAILE, *et al.*, (2005), AKSU & DONMEZ, (2006), SANTOS, *et al.*, (2012); EDRIS, *et al.*, (2014), que estudaram a microalga com alguns metais pesados como o Cádmio II, Chumbo II, Zinco II, Cobre II, Níquel II Ferro II, sendo tanto de forma isolada quanto em misturas.

Frente a vários estudos já realizados neste contexto onde foram considerados diversos fatores de qualidade para uma melhor eficiência no processo de remoção de metais pesados, esse estudo busca trazer uma análise da eficiência da microalga *Chlorella vulgaris* no processo de remoção de íons de ferro de soluções aquosas monoelementares em simples configuração, ou seja, sem alteração do meio para uma melhor eficiência.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MICROALGAS

O termo “microalga” representa, num sentido lato, uma larga variedade de microrganismos fotossintéticos, grande parte aquáticos, com diversidade morfológica e distintas filogenias. São normalmente unicelulares, com diâmetro entre 1 e 10 micrómetros e podem possuir ou não mobilidade (LI, *et al.*, 2008; MONTEIRO, 2014).

Podem ser esféricas, ovóides, ou elipsoides, reprodução normalmente assexuada com formação de quatro auto esporos, composição média de 20% de gordura, 45% de proteína, 20% de carboidratos e 10% de minerais e vitaminas. Apresentam uma elevada taxa de reprodução em função da sua estrutura molecular ser considerada simples, e isso gera o benefício de produzirem mais biomassa em relação a outras plantas terrestres (LI, *et al.*, 2008; MONTEIRO, 2014; RICARDI, 2020).

Estas podem ser tanto procariontes, cianobactérias, ou eucariontes, podem viver em condições adversas no meio ambiente, podendo estar tanto em locais terrestres ou aquáticos (MATA, *et al.*, 2009; BUGS *et al.*, 2018).

De acordo com SHEEHAN *et al.* (1998) as microalgas podem ser separadas em 4 grupos principais, sendo estes:

- Algas verdes: encontrada em grande quantidade em água doce e estas podem ser divididas em 4 classes, sendo a *Micromonadophyceae*, *Carophyceae*, *Ulvophyceae* e *Chlrophyceae*.
- Diatomáceas (*Bacillariophyceae*): são encontradas em aproximadamente 100.000 espécies, podendo ser encontradas nos oceanos, água doce e salobra.
- Cianobactérias (*Cyanophyceae*): possuem morfologia semelhante às bactérias, são encontradas em distintos ambientes, realizam papel importante na fixação de nitrogênio atmosférico, e completam aproximadamente 2.000 espécies.
- Algas pardas (*Chrysophyceae*): existem aproximadamente 1.000 espécies, são mais encontradas em água doce e estas apresentam diferentes colorações e pigmentos muito complexos.

Fatores físicos, químicos e biológicos, devem ser determinados para o desenvolvimento destas, sendo os físico-químicos iguais a luz, pH, salinidade, temperatura, disponibilidade de nutriente entre outros. Já os fatores biológicos, referem-se às taxas metabólicas da espécie que está sendo cultivada (RAVEN, *et al.*, 2001; BUGS, *et al.*, 2018).

As microalgas possuem diversos metabolismos, sendo o mais importante o autotrófico onde absorve energia luminosa e consome CO₂, para liberação de O₂ e em segundo lugar possuímos a heterotrófica, em que a fonte de energia se baseia em componentes orgânicos. A fotoautotrófica requer íons inorgânicos minerais, fotoautotrófico obrigatório, o microrganismo só se reproduz sob a luz, fotoheterotrófico usam luz como fonte de energia e como nutrientes, compostos orgânicos, a auxotrófica é quando a microalga requer pequenas quantidades de compostos orgânicos e pôr fim a mixotrófica, na qual CO₂ e componentes orgânicos são de suma importância para seu desenvolvimento. Um ponto a se ressaltar é que as microalgas têm a capacidade de modificar seu metabolismo como resposta a alterações das condições ambientais (REDAELLI, 2012).

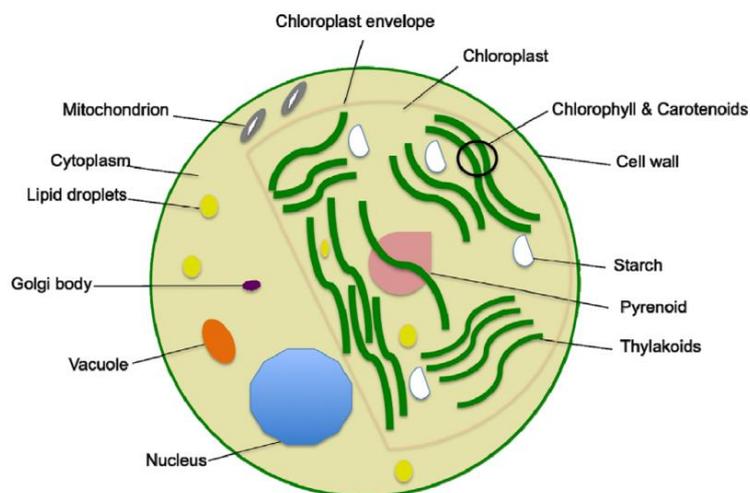
2.2 CHLORELLA

2.2.1 Morfologia

É uma célula microscópica esférica com aproximadamente 2 a 10 µm de diâmetro, fotossintética, imóvel, unicelular ou colonial, podendo ser encontrada tanto em água doce ou salgada, possui vários elementos estruturais semelhantes aos das plantas (NURACHMAN, *et al.*, 2015).

Na Figura 1 pode ser observado um esquema de uma célula de microalga, com seus respectivos componentes, como por exemplo o núcleo, citoplasma, mitocôndria, cloroplasto, entre outros.

Figura 1 - Estrutura esquemática de *C. vulgaris* representando diferentes organelas.



Fonte: SAFI, *et al.*, 2014.

Possui uma camada rígida, preservando a integridade da célula além de fornecer proteção contra ambientes agressivos e/ou invasores e esta é explicada por possuir glucosamina em sua composição (YVONNE, *et al.*, 2000; YAMAMOTO, *et al.*, 2004; NURACHMAN, *et al.*, 2015).

A rigidez da parede protetora da microalga varia de acordo com o crescimento, em que quando recém-formada esta é frágil, formada por uma camada fina unilaminar com espessura de 2 nm. Já a célula filha aumenta gradualmente sua espessura até 17-21 nm e após a maturação é formada uma camada microfibrilar. Na fase madura, a espessura e a composição da parede celular não são constantes, pois podem ocorrer alterações em função das condições ambientais e fase de crescimento (YAMAMOTO, *et al.*, 2004).

O citoplasma é uma substância gelatinosa composta por água, proteínas solúveis e minerais. Nele estão dispostas organelas internas como mitocôndrias, o núcleo, vacúolos, apenas um cloroplasto e o corpo de Golgi. A mitocôndria possui o aparelho respiratório, material genético e uma membrana de dupla camada, sendo a camada externa composta por uma proporção igual de fosfolipídios e proteínas e envolve toda a organela. Já no interior da membrana a quantidade de proteínas é três vezes maior que fosfolipídios (SAFI, *et al.*, 2014).

Possui apenas um único cloroplasto envolvido em uma membrana de camada dupla composta por fosfolipídios em que a externa é permeável a metabólito e íons, e a interna tem a função do transporte de proteínas. Em condições desfavoráveis de

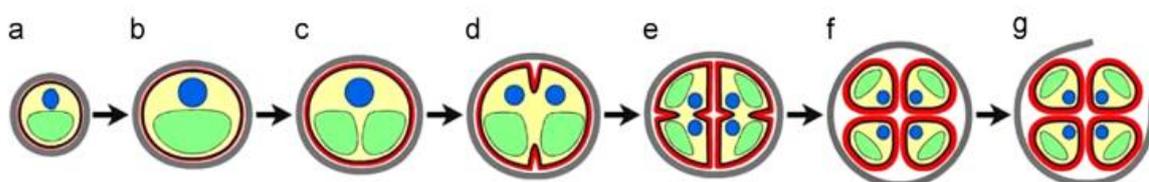
crescimento, pode se formar grânulos de amido, compostos por amilose e amilopectina no interior do cloroplasto. O pirenóide possui altos níveis de RuBisCO (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase e é o centro de fixação de dióxido de carbono (LEE, 2008; SAFI, *et al.*, 2014).

O cloroplasto armazena um aglomerado de tilacóides fundidos onde é sintetizado o pigmento clorofila, mascarando a cor de outros pigmentos, como a luteína. E quando ocorre o estresse por nitrogênio, os glóbulos lipídicos acumulam-se principalmente no citoplasma e no cloroplasto (LEE, 2008; SAFI, *et al.*, 2014).

2.2.2 Reprodução

Conforme YAMAMOTO, *et al.*, (2004) a microalga *Chlorella* é uma célula reprodutível imóvel (autósporos) que se reproduz assexuadamente e com rapidez, de forma que em condições ideais multiplica-se por auto esporulação dentro de 24 horas, conforme Figura 2.

Figura 2 - Desenhos mostrando as diferentes fases da formação da parede celular filha em *Chlorella vulgaris*.

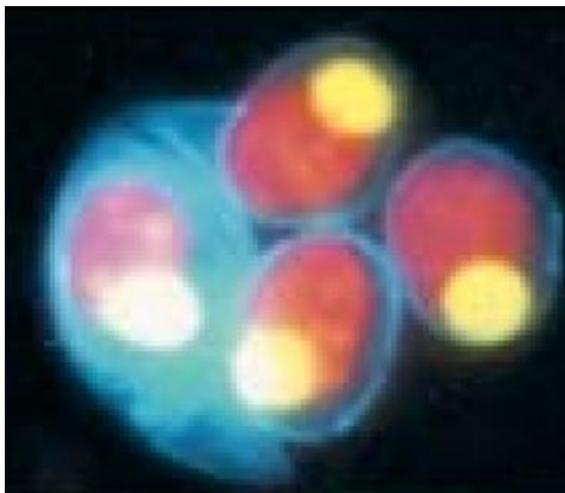


Fonte: YAMAMOTO *et al.*, (2004).

Na parte (a) tem-se o crescimento celular, passando para a fase tardia de crescimento celular (b) posteriormente ocorre a divisão do cloroplasto (c) seguindo para a fase inicial de divisão dos protoplastos (d) na sequência divisão tardia dos protoplastos (e) indo então para fase de maturação das células-filhas (f) e pôr fim a eclosão (g). Desta maneira quatro células-filhas com parede celular própria são formadas dentro da parede celular da mãe.

Posteriormente a maturação das células recém-formadas, a parede da célula mãe rompe-se, ocasionando a liberação das células-filhas e os restos remanescentes da célula-mãe servirão de alimento para as células recém-formadas (SAFI, *et al.*, 2014).

Figura 3 - Células recém-formadas emergindo fora da parede celular da célula-mãe após a eclosão.



Fonte: YAMAMOTO, *et al.*, (2004).

Como pode ser visualizado na Figura 3, possuímos uma célula-mãe que eclodiu e está liberando para o ambiente quatro células-filhas.

2.2.3 Composição

Segundo estudo realizado por PANAHI, *et al.*, (2019), a microalga *Chlorella vulgaris* é composta com aproximadamente 12% a 17% de carboidratos, 14% a 22% de lipídeos, 51% a 58% de proteínas, além de outros compostos de grande valor nutracêuticos como vitaminas, minerais, antioxidantes, oligoelementos.

2.2.4 Proteína

As proteínas estão envolvidas em funções importantes dentro das células, por exemplo o processo de crescimento, reparo, manutenção das células, servem também como mensageiros químicos, defesa contra invasores estrangeiros, motores celulares e reguladores de atividades celulares (SAFI, *et al.*, 2014).

A concentração de proteína na célula varia de acordo com as condições de crescimento, mais de 50% delas são internas e apenas 30% para dentro e para fora da célula. Seu peso molecular varia entre 12 e 120 kDa, mas sendo grande parte entre 39 e 75 kDa, segundo SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*). MORRIS, *et al.*, (2008) e HANAN, (2011) seguem comentando ainda

que em condições de cultivo autotróficas e heterotróficas é possível perceber um pico de intensidade mais elevada para as células cultivadas em condições autotróficas.

2.2.5 Lipídios

Os lipídios são um grupo heterogêneo de compostos que são definidos pela sua solubilidade em solventes apolares e sua insolubilidade em solventes polares, e não pela sua estrutura. Estes são principalmente glicolipídios, ceras, hidrocarbonetos fosfolipídios e pequenas quantidades de ácidos graxos livres. Estes compostos são sintetizados pelo cloroplasto e ficam localizados na parede celular e nas membranas das organelas (LEE, 2008; SAFI, *et al.*, 2014).

As características dos ácidos graxos se alteram de acordo com as condições de crescimento, desta forma o tornando adequado para diversas aplicações. Se a microalga foi cultivada em condições mixotróficas pode acumular mais de 60% de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, sendo este, perfil ótimo para produção de biodiesel, mas se forem cultivadas em condições favoráveis, os ácidos formados serão inadequados para aplicação anterior, mais ideias para aplicação nutricional já que possui uma concentração maior em ácidos graxos poli-insaturados (CHEN, *et al.*, 2011; YEH, *et al.*, 2012).

2.2.6 Carboidratos

Os carboidratos representam um grupo de açúcares redutores e polissacarídeos, como amido e celulose. A celulose é um polissacarídeo estrutural de alta resistência, localizada como barreira fibrosa protetora na parede celular da microalga (LORDAN, *et al.*, 2011; SAFI, *et al.*, 2014).

Já o amido, sendo este o polissacarídeo em maior quantidade localizado no cloroplasto composto por amilopectina e amilose e juntamente com outros açúcares servem como armazenamento de energia para as células. Ainda, dentre todos os carboidratos existentes na microalga, o β 1-3 glucano é um dos mais importante para saúde humana por possuir vários benefícios nutricionais (LORDAN, *et al.*, 2011; SAFI, *et al.*, 2014).

A *Chlorella*, possui uma parede celular notavelmente robusta e a composição dos açúcares presentes nela, é uma mistura de ramnose, sendo esta o açúcar dominante, galactose, glicose, xilose, arabinose e manose (SAFI, *et al.*, 2014).

2.2.7 Pigmentos

O pigmento mais abundante é a clorofila, podendo atingir cerca de 1 a 2% do peso seco da biomassa e está localizada nos tilacóides. Mas encontra-se também pigmentos de carotenoides que agem como pigmentos auxiliarem ao captar a luz, β -caroteno que está associado às gotículas lipídicas no cloroplasto e pigmentos fotoprotetores, onde protegem as moléculas de clorofila da degradação e do branqueamento durante grande exposição à radiação e ao oxigênio (SAFI, *et al.*, 2014).

Assim como as demais composições já citadas, este também possui propriedades terapêuticas, por exemplo, atividades antioxidantes, efeito protetor contra degeneração da retina, regulação do colesterol do sangue, prevenção de câncer cardiovascular e de cólon e fortalecimento do sistema imunológico (CHA, *et al.*, 2008; FERNANDEZ, *et al.*, 2012).

2.2.8 Minerais e vitaminas

Os minerais são identificados após a incineração da biomassa e posteriormente analisados por espectrofotometria de absorção atômica. Estes possuem papéis de grande relevância para os humanos, o cátion do potássio, por exemplo desempenha o papel de equilibrar os fluidos intramoleculares, metabolizar carboidratos, síntese de proteínas e impulsos nervosos e além disso pode ainda ser usado como fertilizante na agricultura na forma de sulfato, cloreto ou nitrato (TOKUSOGLU, *et al.*, 2003; PANAHI, *et al.*, 2012).

O magnésio tem papel importante na manutenção da contração muscular e atividade nervosa e a deficiência deste mineral pode levar a depressão e comportamento suicida. Já o zinco é um componente essencial das enzimas, participando de muitos processos metabólicos, juntamente com a síntese de

proteínas, lípidos e hidratos de carbono (TOKUSOGLU, *et al.*, 2003; PANAHI, *et al.*, 2012).

As vitaminas possuem duas classificações uma sendo solúveis em água (B e C) e solúveis em gordura (A, D, E e K). Esta microalga, possui um perfil vitamínico de grande importância, em que a vitamina A, por exemplo, é um elemento-chave para o crescimento celular no corpo humano, as vitaminas E e C têm atividades antioxidantes, eliminando radicais livres e ainda a melhoria da circulação sanguínea e o controle das funções musculares (BECERRA, *et al.*, 1999).

Já o complexo B é um atuador relevante na atividade de enzimas no metabolismo, promovendo o crescimento dos glóbulos vermelhos, mantendo pele, músculos e cabelo saudáveis e reduzindo o risco de câncer de pâncreas (SAFI, *et al.*, 2014).

A condição de crescimento das microalgas altera a concentração de vitaminas presentes na microalga, por exemplo o meio heterotrófico, apresentou um teor de vitaminas maior em relação ao meio autotrófico devido a presença de glicose no meio (HANAN, 2011).

2.3 CULTIVO

O cultivo de microalgas possui a vantagem de não necessitar competir por terras usadas para agricultura por precisarem apenas de água e dióxido de carbono atmosférico para seu cultivo. Porém a necessidade de um meio ser rico em nutrientes, é um fator que pode aumentar o custo de produção (CHEW, *et al.*, 2017).

Assim como os outros microrganismos, as microalgas reagem à variação do ambiente em que estão em contato com modificações do seu meio intracelular. Estas alterações podem ser desde a biossíntese de enzimas a fármacos e antioxidantes, além do crescimento celular, biomassa, proteínas, ácidos graxos, pigmentos, entre outros (DERNER, 2006).

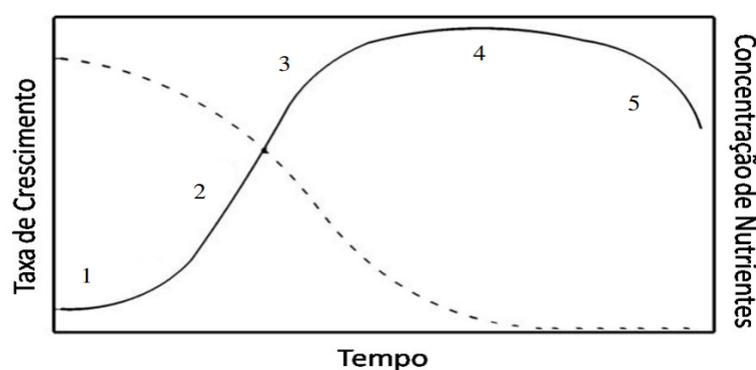
2.3.1 Crescimento

Considerando condições ideais de cultivo em que temos nutrientes suficientes e condições climáticas adequadas, as microalgas podem ter crescimento ambulante.

Normalmente a sua biomassa num período de 24 horas ou menos, a quantidade de sua biomassa é duas vezes maior e na fase de crescimento exponencial podem completar um ciclo de vida entre 2 a 4 horas (MATA, *et al.*, 2009).

Na Figura 4 pode-se observar os diversos períodos de crescimento celular, sendo este composto por cinco fases, partindo de uma concentração mínima, seguindo para um comportamento exponencial, prosseguindo para uma estabilização da taxa de crescimento e por fim o declínio.

Figura 4 - Representação esquemática de taxa de crescimento de algas em cultura (linha sólida) e a concentração de nutrientes (linha tracejada em função de um período de tempo).



Fonte: Mata, *et al.*, (2010).

A fase (1) refere-se à indução, é um período de adaptação, onde ocorre a inoculação da célula, podendo ocorrer a densidade celular. A fase (2) é a exponencial caracterizada pelo crescimento logarítmico, velocidade de crescimento atinge o ritmo máximo e duplica-se sucessivamente. Fase (3) ocorre a diminuição do crescimento relativo, aqui quantidade de energia luminosa e nutrientes por célula já estão mais baixos devido ao aumento da densidade celular e conseqüentemente reduzindo a atividade fotossintética (MATA, *et al.*, 2009).

Já a fase (4) é chamada de fase estacionária, caracterizada pela constância celular, onde a taxa de crescimento e mortalidade entram em equilíbrio e por fim na fase (5) acontece a morte celular devido ao esgotamento dos nutrientes e auto-sombreamento (MATA, *et al.*, 2009).

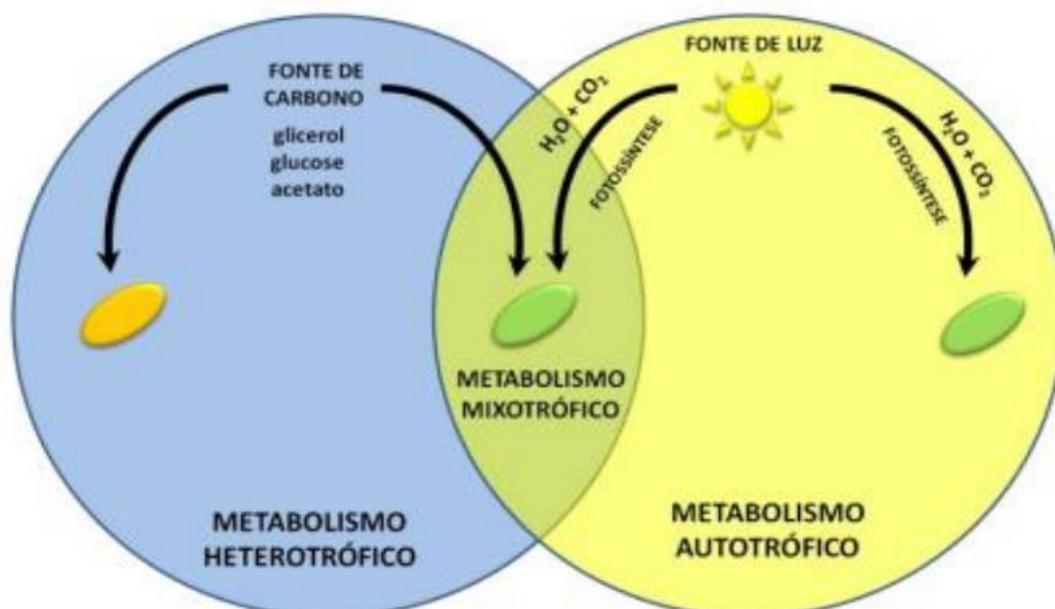
2.3.1.1 Metabolismo das microalgas

O metabolismo das microalgas pode ser tanto autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico, sendo esses os principais metabolismos. No autotrófico, a energia para a sobrevivência da microalga é regida pelo processo de fotossíntese (MORAIS, 2010).

O metabolismo heterotrófico, nutriente e compostos orgânicos são adicionados como fonte de carbono já que este ocorre na ausência da luz. As fontes usadas são a glicose acetato, glicerol e glutamato, sendo que a maior taxa de produção é alcançada com a glicose. Porém a desvantagem existente é o preço e a disponibilidade dos açúcares que competem com matérias-primas para outros usos, como a produção de alimentos e de biocombustíveis (MORAIS, 2010; SAFI, *et al.*, 2014).

Por fim, o mixotrófico é a combinação dos metabolismos citados anteriormente. Este compete favoravelmente com sistemas autotróficos, e apresenta alta produtividade de biomassa seca e lipídios. As vantagens são limitar o impacto da perda de biomassa durante a respiração escura e reduzir a quantidade de substratos orgânicos utilizados para o cultivo da biomassa. Conforme imagem a seguir pode-se observar um diagrama dos metabolismos citados (MORAIS, 2010; SAFI, *et al.*, 2014).

Figura 5 - Diagrama simplificado do metabolismo das microalgas.



Fonte: MARIANO, *et al.*, (2010)

Conforme pode ser observado na Figura 5, o diagrama ilustra o metabolismo autotrófico e o heterotrófico e quanto os mixotróficos, é a junção dos dois métodos.

2.3.2 Fatores limitantes

Podemos ter inúmeros fatores limitantes referente ao crescimento microalgal como estrutura da parede celular, composição bioquímica, disponibilidade de nutrientes, forma e tamanho das microalgas, entre outros. Possuímos também fatores biológicos como taxas metabólicas, influência de microrganismos externos e o inóculo, e quanto aos físico-químicos, que são em maioria os mais utilizados para controle, tem-se a luz, temperatura, aeração, nutrientes, pH e salinidade (BARROS, 2010).

2.3.2.1 Luz

Fotoperíodos, intensidade, flutuações e o regime de luz, são coeficientes importantes no desenvolvimento e composição bioquímica das microalgas. Alteração destas condições em distintas fases de crescimento demonstram significativos efeitos na composição dos lipídios, teor de proteínas, polissacarídeos e clorofila (PANAHI, *et al.*, 2019).

A intensidade luminosa não pode ser também muito alta, pois pode causar o fenômeno de foto inibição, onde ocorre a saturação luminosa e conseqüentemente cessando o crescimento celular ou ainda foto-oxidação que possui efeitos letais, podendo levar a perda total da cultura (SANTOS, *et al.*, 2011).

Pigmentos diretamente envolvidos com a fotossíntese aumenta, como a clorofila-a, caso a intensidade de luminosidade for diminuída, caso contrário, pigmentos como zeaxantina e o β -caroteno, que são agentes fotoprotetores tem seu teor aumentado (HU, 2004).

Após certa densidade celular, regiões com sombra podem começar a se formar, dificultando desta forma o processo de fotossíntese da célula. Desta forma torna-se necessário a agitação da cultura, promovendo ciclos de luz e sombra, ciclos esses que podem levar milissegundos ou até segundos para serem completados, dependendo da intensidade da agitação e do caminho óptico (RICHMOND, 2004; REDAELLI, 2012).

2.3.2.2 Temperatura

Cada espécie de microalga possui sua faixa de temperatura ideal, mas de forma geral elas toleram até 15°C abaixo ou 2 a 4°C acima da sua temperatura ótima. A variação da temperatura gera influência na produção de lipídios de forma que em altas temperaturas tende a formação de mais ácidos graxos saturados e a temperaturas menores tende a maior formação de ácidos graxos insaturados. E para a *Chlorella*, a temperatura ótima de produção celular é de 24-25°C (PARK, *et al.*, 2015; ÅKERSTRÖM, *et al.* 2016; MA, *et al.*, 2017).

2.3.2.3 Movimentação e aeração

A movimentação e aeração dos cultivos, mantém as células sempre em suspensão, evitando que sedimentam, permite mesmas condições de cultivo para todas células presentes no meio, além disso ajuda no processo de respiração microbiana, garante a eliminação de oxigênio super saturado, mas deve-se prestar atenção no grau de agitação a fim de evitar o declínio da produtividade e o rompimento de tricomas. Esse sistema pode ser realizado por agitação mecânica, sistema de bombas, reciclagem e distribuição de bolhas de ar (RICARDI, 2020).

2.3.2.4 Nutrientes

Segundo LOURENÇO (2006) e SALAMA, *et al.*, (2017) espécies fotossintetizantes precisam de 15 a 20 componentes essenciais para o seu desenvolvimento. Os nutrientes podem ser divididos em 4 categorias:

- **Macronutrientes:** possuem funções como participar do processo de troca de energia, construir o meio intracelular, membranas, regular atividades metabólicas entre outras funções. Estes macronutrientes são o C, H, O, N, P, S, K, Mg, Si e Fe.
- **Micronutrientes:** participam da estrutura e atividade de diversas enzimas, onde estão envolvidas em diversas vias metabólicas. Caso alguns micronutrientes metálicos estiverem em altas concentrações, estes podem se tornar tóxicos ou atuar como antagonistas, provocando a deficiências de alguns nutrientes

mesmo que esteja disponível no meio. Estes micronutrientes são o Fe, Mo, Co, Mn, B, V, Zn, Cu e Se.

- Vitaminas: possuem funções de agir como coenzima e transporte de CO₂. Existem apenas três vitaminas importantes, sendo estas: tiamina, biotina e a cianocobalamina. As demais não são fatores limitantes, pois podem ser sintetizadas pela própria microalga, por algum microrganismo associado a elas, não apresentam funções biológicas ou a necessidade seja em concentrações tão baixas que se tornam irrelevantes.
- Quelantes: entre os elementos utilizados para a nutrição, existem alguns que não são solúveis, sendo assim necessitam interagir com outras substâncias para serem solubilizados. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é a principal substância empregada a esses meios.

2.3.2.5 pH

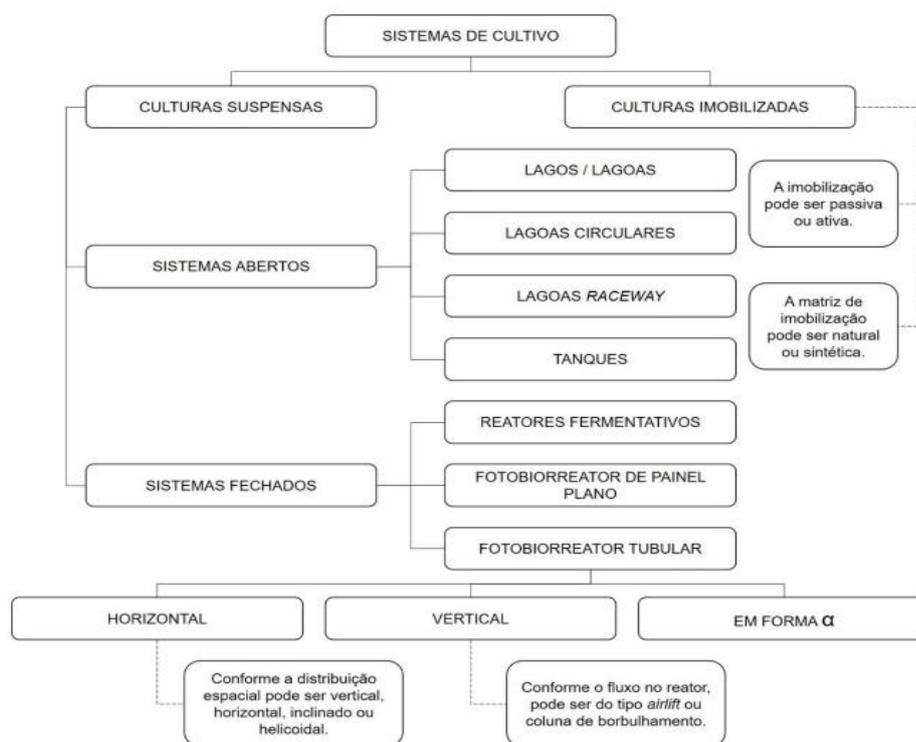
O pH é um fator que está ligado a processos como crescimento das microalgas, metabolismo das organelas, absorção de íons, captura do carbono. A distribuição das espécies químicas também possui correlação com o pH, em que pH baixo ocorre excesso de dióxido de carbono ou ácido carbônico. pH neutro, o íon bicarbonato é favorecido, já em pH elevado há excesso do íon carbonato. Para a microalga *Chlorella*, a faixa de pH ideal fica entre 5 e 8 (SANTOS, *et al.*, 2011; HO, *et al.*, 2014).

2.3.3 Sistemas de cultivo

Para cultivo das microalgas é importante entender que a produção das células é o produto da interação entre fatores biológicos e físico-químicos. Sendo assim, a escolha de um sistema de cultivo, é levado em consideração fatores climáticos e externos (ARUTSELVAN, *et al.*, 2022).

Na Figura 6 pode ser visualizado diversas ramificações de sistemas, cada uma com suas próprias características que serão descritas posteriormente.

Figura 6 - Classificação dos sistemas de cultivo de microalgas.



Fonte: RODRIGUES, 2022

De acordo com a Figura 6, é possível visualizar duas categorias para cultivo, uma sendo por suspensão e outra por imobilização. Na cultura por imobilização, as microalgas são fixadas em um meio sólido, podendo ser água, superfícies poliméricas, poliuretano e alginato. Essa imobilização pode ser passiva ou ativa, também conhecida por natural e artificial respectivamente. As trocas de substrato e de produto ocorrem pelos poros do material matriz (SANTOS, 2017; GONDI, *et al.*, 2022).

Para as culturas suspensas, existem dois sistemas, um sendo em sistema aberto com ramificações para reatores em lagoas, lagoas circulares, lagoas *raceway* e tanque, já o outro em sistema fechado estende-se para reatores fermentadores, reatores planos e reatores tubulares (SANTOS, 2017; GONDI, *et al.*, 2022).

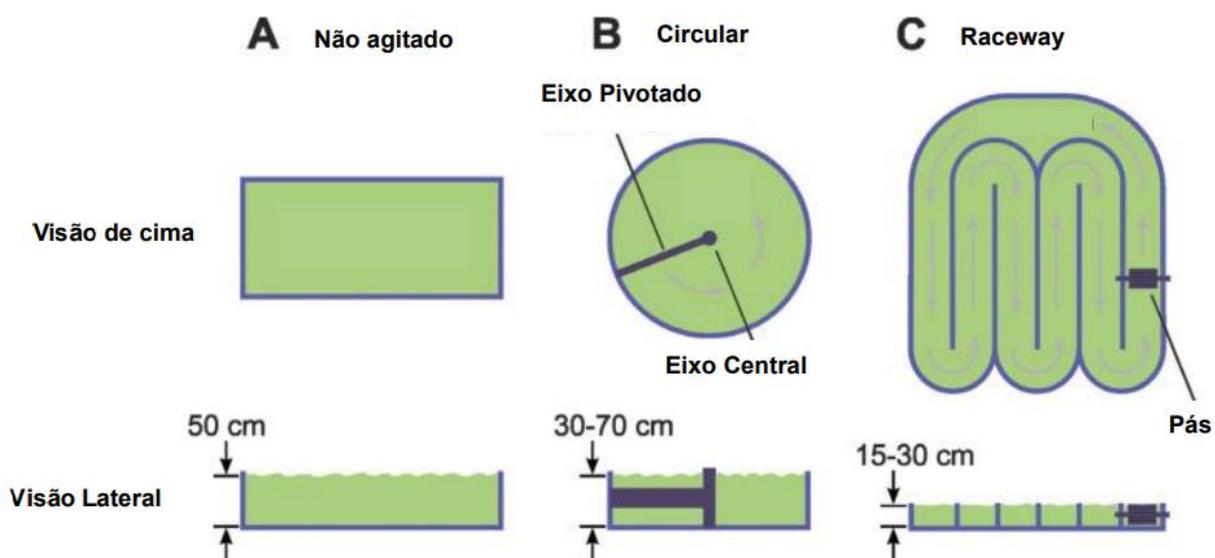
2.3.3.1 Sistemas abertos

Os tanques abertos ou lagoas, são a forma mais barata de para produção de microalgas em grande escala, porém apresentam algumas limitações, pois requer um rigoroso controle ambiental para evitar risco de contaminação, evaporação da água,

contaminantes, bactérias invasoras e o risco do crescimento de outras algas no meio, além disso, temperaturas, concentração de CO₂, intensidade luminosa, são difíceis de controlar, sem contar que estes sistemas que não possuem agitação, após certo período de crescimento, as células contidas na superfície, irão gerar sombra para as células mais profundas (SAFI, *et al.*, 2014).

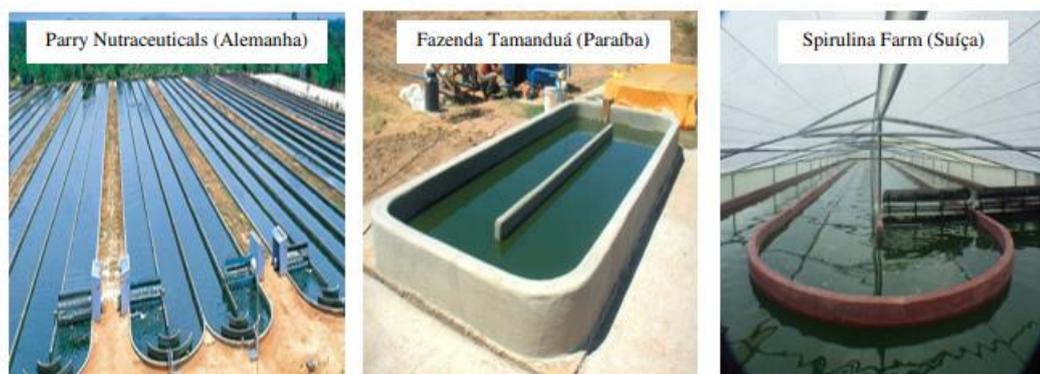
Mas existem também sistemas com circulação e agitação através de um motor com pás, com o fluxo sendo guiado por chicanas colocadas nos canais de escoamento. A alimentação do sistema ocorre imediatamente após o motor e a biomassa é retirada imediatamente antes do motor e este trabalha continuamente, a fim de evitar decantação (CHISTI, 2007). Segue abaixo a Figuras 7 e 8 dos reatores.

Figura 7 - Exemplo de diferentes tipos de reatores em sistemas abertos.



Fonte: HALLMANN, 2015.

Figura 8 - Reatores de cultivo de microalga em vários países.



Fonte: Jornal Tamanduá (2005), Parry Nutraceuticals (2006).

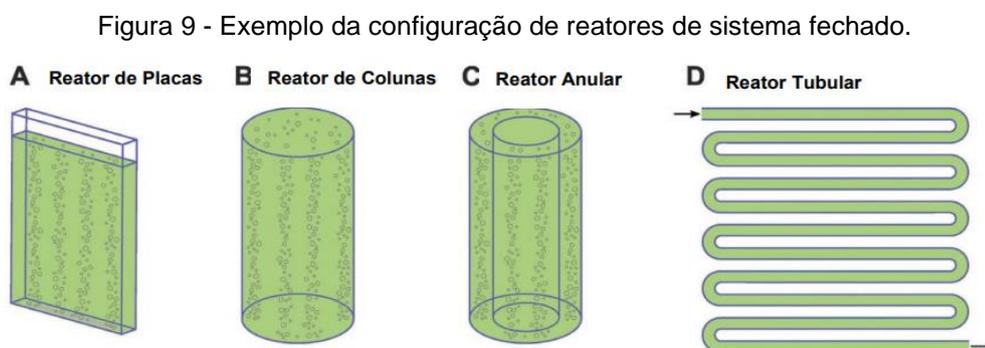
Na imagem superior é possível visualizar o tanque (A), o tanque circular (B) e o reator raceway, sendo este o mais utilizado. Na imagem inferior, são fotos tiradas de reatores em diferentes localidades. Os materiais utilizados para construção podem variar de areia, barro, tijolos, cimento, cloreto de polivinila, fibra de vidro ou até poliuretano (DERNER, *et al.*, 2006).

Embora esses reatores não competem com a agricultura, pois podem ser instalados em terras onde não é possível cultivar plantas, apresentam custos menores em relação a reatores de sistema fechado, a limpeza é facilitada, para a remoção do biofilme acumulado nas paredes dos canais, não se pode dizer que é o sistema mais viável de produção, pela quantidade de riscos e controle necessário para operação deste biorreator (JANKOWSKA, *et al.*, 2017).

2.3.3.2 Sistema fechado

Tendo em vista os problemas encontrados no cultivo em tanques abertos, implementou-se a tecnologia de fotobiorreator fechado, onde se possui controle da intensidade da luz, pH, teor de dióxido de carbono e temperatura. Além disso, esse sistema pode ser usado para cultivo de microrganismos mais sensíveis, e para aqueles que não tem capacidade para competir e crescer em ambientes adversos (SAFI, *et al.*, 2014).

Essa tecnologia pode ser desenvolvida de diversas formas e configurações e estes podem ser biorreatores de placa plana, coluna de bolhas e tubular. Estes reatores podem ser observados na Figura 9.



Fonte: HALLMANN, 2016.

Como pode ser observado na Figura 9 no reator de placas, seu design é considerado robusto, consiste em duas placas com espessura bem fina. A agitação é feita por bolhas por meio de um tubo perfurado. Este, além de proporcionar a mistura do sistema, fornece ar e CO₂ para o meio. O reator pode ser posicionado com ângulo ótimo em relação ao sol, podendo ser verticalmente ou inclinado. Por possuir essa configuração, apresenta uma elevada eficiência de fotossíntese. Entretanto, possui problemas com o controle de temperatura e escalonamento. A Figura 10, pode-se visualizar biorreator instalado de placa plana (XU, *et al.*, 2009).

Figura 10 - Biorreator de placa plana.



Fonte: FCIÊNCIAS, 2023

Existe também reator de colunas, consistindo em um tubo vertical com aeração proveniente do seu fundo. Já este sistema enfrenta o problema da sombra gerada pelas próprias células, e desta forma dificultando sua fotossíntese e conseqüentemente redução de reprodução. A fim de resolver tal problema citado, um reator de coluna anular foi desenvolvido e assim agora sendo possível iluminar a parte interna do sistema e obter uma melhor eficiência A Figura 11, pode-se visualizar biorreator instalado de coluna (POSTEN, 2009).

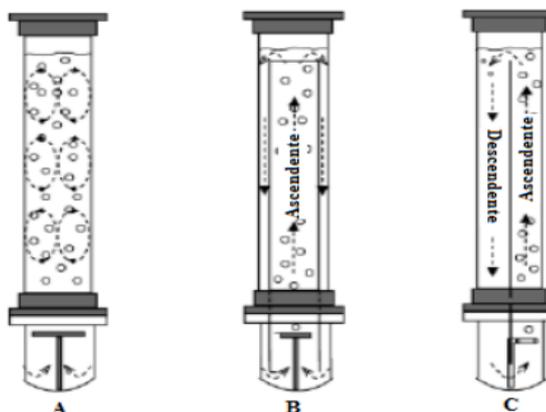
Figura 11 - Representação de biorreatores em coluna.



Fonte: TECH TRADE INITIVE TANK, 2023.

Esse reator, pode ainda ser dividido em 3 tipos de sistema, conforme Figura 12.

Figura 12 - Biorreator de bolhas.



Fonte: SEVILLA, *et al.*, 2004.

Na Figura 12 a coluna A é simples com aeração, já na B, tem-se um sistema de *Air-lift* de circulação interna e na C, é um sistema *Airlift* de circulação externa. Essa metodologia com bombeamento de ar, proporciona um crescimento maior de microalgas por apresentarem um padrão de ciclo de luz e sombra enquanto que o fluxo de reatores com bolhas possui um direcionamento aleatório (XU, *et al.*, 2009).

E por fim o outro reator ilustrado na imagem 0, é o de característica tubular, com diâmetro no máximo de 0,1 metro, pode estar disposto na forma horizontal,

vertical ou inclinado e o material pode ser tanto plástico quanto vidro. O meio de cultivo é bombeado por uma bomba mecânica ou o sistema *airlift* é usado. Quanto ao comprimento do tubo, o ideal é que seja inferior a 80 metros, pois conforme o CO₂ é consumido, o pH é elevado e então o gás oxigênio é produzido e se este for superior a 35 mg/L se torna tóxico. Na Figura 13 pode-se visualizar biorreator instalado tubular (CHISTI, 2007; XU, *et al.*, 2009).

Figura 13 - Biorreator tubular.



Fonte: Biotech, 2023

Embora reatores de sistema fechado apresentam a possibilidade de controlar diversas variáveis, assim como o sistema aberto, este também possui algumas limitações como superaquecimento, acumulação de oxigênio, entupimento, manutenção do cultivo, preço de instalação, complexidade operacional. Em relação aos biorreatores abertos, seu custo de produção é mais alto, mas possuem aproximadamente 8 vezes a mais e uma concentração celular de aproximadamente 16 vezes mais (MATA, *et al.*, 2010).

Para uma melhor comparação entre o sistema aberto e fechado, está disposta uma tabela, Tabela 1, com diversos parâmetros e suas avaliações a seus respectivos sistemas.

Tabela 1 - Comparação entre biorreatores de sistema aberto e fechado.

Variável	Sistema fechado	Sistema aberto
Controle de contaminação	Fácil	Difícil

Risco de contaminação	Reduzido	Alto
Esterilidade	Alcançável	Impossível
Controle de processos	Fácil	Difícil
Controle de espécies	Fácil	Difícil
Agitação	Uniforme	Baixa
Regime de operação	Batch/contínuo	Batch/contínuo
Razão área/ volume	Alto (20-200/m)	Baixo (5-10/m)
Concentração celular	Alto	Baixo
Investimento	Alto	Baixo
Custo de operação	Alto	Baixo
Eficiência da utilização da luz	Alta	Baixa
Controle da temperatura	Alcançável	Difícil
Produtividade	3-5 vezes mais produtivo	Baixo
Tensão hidrodinâmica nas células	Baixa	Muito baixa
Evaporação do meio da cultura	Baixa	Alta
Controle de transferência gasosa	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Depende da alcalinidade, pH	Depende da alcalinidade, pH
Inibição por O ₂	Grande problema	Menor que o fotobiorreator
<i>Scale-up</i>	Difícil	Difícil
Necessidade de área	Baixa	Alta
Perda de água	Muito baixa	Muito alta
Variedade de espécies cultiváveis	Alta	Poucas
Flexibilidade de produção	Alta	Nenhuma
Reprodutibilidade dos parâmetros de produção	Possível	Específico do local
Padronização	Possível	Nenhuma
Dependência do clima	Insignificante	Absoluta
Concentração de biomassa	2-8 g. L	0,1-0,5 g. L
Custo de investimento	Alto	Baixo

Custo de operação	Alto	Baixo
Custo de colheita	Relativamente baixo	Alto

Fonte: PULZ, 2001; XU et al., 2009; MATA et al., 2010

Ao fazer uma análise dos dados acima, nota-se que o sistema aberto, em grande parte, é inferior ao sistema fechado, e os demais que não são inferiores são iguais. Sendo assim, pode-se dizer que o único ponto positivo do biorreator aberto em relação ao fechado, é o custo de produção e instalação.

2.3.4 Colheita

O processo de colheita, onde é separado a microalga do meio em que ela está contida, representa grande parte dos custos de produção, os quais têm-se alguns fatores a considerar como os métodos de cultivo e o tamanho das células. Por apresentarem tamanho microscópico, os processos mais indicados são microfiltração e a centrifugação, mas ainda se tem os métodos de floculação, flutuação e sedimentação (MUJTABA, *et al.*, 2017).

A centrifugação contribui de 20 a 30% do custo total de produção. A centrifugação é feita em 5000 rpm por um intervalo de tempo de 15 minutos. É processo com eficácia de aproximadamente 95%, pode-se considerar como uma metodologia não demorada e pode trabalhar com grandes volumes (CONVERTI, *et al.*, 2009; CHA, *et al.*, 2010).

Quanto ao processo da filtração, ocorre de forma contínua em que o caldo da microalga passa por um filtro no qual as células ficam retidas. O método convencional não é eficiente, já que é de tamanho microscópico, sendo assim, o mais indicado é a microfiltração ou a ultrafiltração. Deve-se levar alguns parâmetros em consideração caso estes sejam usados, como velocidade do fluxo, fase de crescimento, pressão transmembrana, tipo de filtro, fluxo de cruzamento turbulento (LEE, *et al.*, 2012; FRAPPART, *et al.*, 2011).

Em fase estacionário, as microalgas realizam o processo de auto floculação em virtude de que a alta carga negativa, presente na fase do crescimento, diminui e assim permitindo a formação de grumos, porém é um processo muito demorado por questão de a microalga ser muito estável e às vezes pode ser enganosa. Mas esse processo pode ser acelerado aumentando o pH do meio para 11, usando hidróxido de sódio, já

que este induz cerca de 90% de floculação nesta faixa de pH e também requer menos quantidade, cerca de 9 mg por grama de biomassa seca (VANDAMME, *et al.*, 2012; WU, *et al.*, 2012).

Mas para uso em larga escala, o mais indicado, pode ser o hidróxido de magnésio, que precipita atraindo células carregadas negativamente. Outro composto que se mostrou eficiente para ser usado como agente floculante é a quitosana que apresenta eficiência de 90% de recuperação na faixa de pH 7. A floculação pode ser considerada como uma etapa de pré-colheita, a fim de facilitar ou complementar outras metodologias como a filtração ou a centrifugação (LEE, *et al.*, 2012).

Já quanto à flutuação, consiste em capturar células através de microbolhas de ar dispersas. Assim como o processo anterior, a flotação também pode ocorrer naturalmente com o aumento da carga de lipídios na microalga. Este processo pode ser induzido por meio do uso do gás ozônio com teor de 0,05 mg/g de biomassa. Este, ao contrário da floculação, não necessita de produtos químicos sintéticos (CHENG, *et al.*, 2010).

2.4 METAL PESADO

A definição de metais pesados, é uma expressão que apresenta muita controvérsia e muitas críticas, mas alguns autores definem estes pela sua densidade atômica. Os autores PAULA, 2006 e MARQUES, *et al.*, 2002 apud SOARES, 2004, comentam que a densidade deve ser igual ou superior a 5 g/cm³, já para os autores ALLOWAY, *et al.*, 1990 e AMARAL SOBRINHO, *et al.*, (1992), definem que a densidade atômica deve ser superior a 6 g/cm³.

Portanto, considerando os parâmetros citados acima têm-se alguns metais que se enquadram nestas condições como elementos não essenciais para os vegetais como o Pb, Cd, Cr, e Hg e também se tem os micronutrientes como Cu, Zn, Fe, Mn e Mo. Entretanto, por mais que o último grupo de metais seja essencial para vida humana, podem se tornar poluentes ou contaminantes em altas concentrações no solo e/ou água (ALLOWAY, *et al.*, 1990).

O grande problema desse assunto, é referente a biodegradabilidade, onde os metais pesados não se decompõem com o passar do tempo na natureza, como os contaminantes orgânicos. Estes, se acumulam em microrganismos vivos, e vão passando de um para outro, por exemplo, uma alga marinha está contaminada com

um determinado metal pesado, um peixe come essa alga, aquela quantidade x de contaminantes, agora está no peixe, posteriormente este peixe é fígado e preparado para chegar ao mercado, e então nós compramos para realizar uma refeição; desta forma, estaremos nos contaminando com aquele determinado metal pesado que foi despejado no rio, por menor que seja a quantidade descartada (FU, *et al.*, 2011; MORCELLI, 2021).

2.4.1 Ferro

O ferro, quando se encontra em seu estado ferroso Fe^{2+} , gera compostos que possuem características solúveis, por exemplo os hidróxidos, porém quando este entra em contato com ambientes oxidantes como o contato do oxigênio do ar ou com o cloro, ele passa de Fe^{2+} para Fe^{3+} e neste forma o hidróxido férrico, que precipita por ser um composto insolúvel em água (MORUZZI, *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Contaminação por ferro

Por mais que se tenta proteger as águas superficiais de contaminantes, águas subterrâneas podem apresentar problemas de qualidade, sendo mais comum a presença de ferro em altas concentrações, podendo limitar seu uso tanto doméstico quanto industrial (BAUMGARTEN, *et al.*, 2014; MARCELINO, *et al.*, 2017).

Sabendo destas contaminações, padrões de potabilidade foram estabelecidos, e com a exigência de que concentrações de ferro superior a 0,3 mg/L de ferro não serão aceitáveis. Logo que a partir deste teor citado, a água pode começar a apresentar sabor desagradável e possíveis modificações estéticas (BAUMGARTEN, *et al.*, 2014; MARCELINO, *et al.*, 2017).

Para o sistema de tratamento, pode ocorrer a precipitação dos filtros dos poços e conseqüentemente reduzindo sua eficiência. Além disso, podem causar incrustações, chance do surgimento de bactérias ferruginosas nocivas (MORUZZI, *et al.*, 2012).

Quanto a sua ingestão por seres vivos, em doses ideais, o efeito é totalmente positivo, já que este é um componente de grande valor para o metabolismo das células. Entretanto, caso a ingestão for em teores elevados, o mesmo se torna tóxico

para o corpo humano, afetando quase todos os órgãos por questão da sua toxicidade intracelular sistêmica, possuindo a chance de gerar problemas como diabetes e cardíacos (BAUMGARTEN, *et al.*, 2014).

Outro problema sério que pode ser gerado em função de altas concentrações de ferro no organismo dos seres vivos é a formação de radicais tóxicos de oxigênio que causam danos celulares nas células como resultado da absorção excessiva de ferro dentro das células (ANDREWS, *et al.*, 2007).

2.4.1.2 Tratamentos para remoção de ferro

Existem diversas metodologias para remoção de ferro, sendo estes aeração e filtração; aeração ou coagulação química, sedimentação e filtração, troca iônica; aeração, alcalinização e filtração. Tem-se ainda leitos de contato usados para remoção de ferro como zeólita com óxido de manganês, adsorção, oxidação e precipitação, tratamento de cal, cloração e a utilização de produtos químicos complexantes (MARCELINO, *et al.*, 2017).

A precipitação química, na qual é uma tecnologia barata e simples de operar, onde é adicionado o reagente precipitante, então o mesmo reage com os metais pesados formando precipitados insolúveis, nos quais podem ser filtrados ou sedimentados. No entanto, essa técnica apresenta riscos e dificuldades, um deles sendo a formação de um vapor tóxico, outro é a formação de precipitados coloidais que geram complicações na segregação e ainda sem contar no volume gerado de lodo (MORCELLI, 2021).

A coagulação e a floculação, também podem ser utilizadas, onde o agente coagulador desestabiliza as partículas coloidais e conseqüentemente gera acúmulo destas, posteriormente o agente floculante entra em ação para aumentar o tamanho dos flocos e assim facilitar a filtração ou a floculação. Porém há situações em que o floculante não pode ser usado diretamente para remoção de íons metálicos tóxicos, eles também não são totalmente removidos por essa técnica sem um tratamento em conjunto, e quanto a custos operacionais, são considerados altos, devido a utilização de produtos químicos (TEH, *et al.*, 2016; NIDHEESH, *et al.*, 2017).

Sistemas de troca iônica, tem maior capacidade de tratamento, possuem uma cinética rápida, além de excelentes taxas de remoção de metais pesados. Este processo utiliza um leito fixo formado pela resina de troca iônica, em que os íons desta,

são os mesmos da solução usada para esse fim. Quando a resina saturada é regenerada por retrovoltagem, a mesma pode ser tanto natural quanto sintética. Porém os agentes químicos utilizados para regeneração da resina, foram poluentes secundários perigosos, envolvendo desta forma um processo adicional para o tratamento destes, e sem contar que é uma tecnologia cara para se usar em função da grande quantidade de resina necessária (OBAID, *et al.*, 2018; KANG, *et al.*, 2004).

Outro método que deve ser destacado é o de biorremediação, em que sistemas biológicos, podendo ser animais, vegetais ou até mesmo microrganismos são usados para remover poluentes tóxicos do ambiente aquático através do seu metabolismo de acumulação. As plantas aquáticas, podendo ser tanto algas quanto microalgas, apresentam propriedades favoráveis para essa função, além de também possuírem um crescimento regular, baixo custo de manutenção e fácil manuseio (HARSHA, *et al.*, 2019; RAI, 2008).

A metodologia de adsorção também vem sendo estudada, e esta afeta diretamente o transporte, biodisponibilidade e toxicidade dos metais pesados em meio aquoso. É um sistema de transferência de massa em que basicamente acontece quando os átomos da superfície do sólido ou as moléculas têm energia superficial residual por questão de forças desequilibradas. E quando elas se chocam contra a superfície, são atraídas pelas forças em desequilíbrio e ficam fixadas. A adsorção pode ocorrer tanto pelas forças intermoleculares, quanto por formação de ligações químicas, mas não ocorrem de forma isolada, e sim de forma conjunta (MORCELLI, 2021).

Neste tema de adsorção para remoção de metais pesados, o carvão ativado vem sendo o carro chefe, no entanto seu custo é alto e ainda necessita de agentes complexantes para aprimorar sua atividade na remoção de matéria inorgânica, o que conseqüentemente dificulta sua aquisição para indústrias de pequeno porte. Em função desta questão começou-se a buscar adsorventes alternativos de baixo custo, como a zeólita, argila, quitosana, entre outros, sendo um deles a biomassa microbiana podendo ser de fungos, algas, leveduras, bactérias, etc. (ERTO, *et al.*, 2013; WANG, *et al.*, 2009; BABEL, *et al.*, 2003).

Adsorção usando materiais biológicos, tem capacidade de acumular metais pesados por meio de interação físico-química ou por vias de adsorção mediadas metabolicamente. Quanto a vantagens temos baixo custo operacional, recuperação de metais pesados específicos, menor necessidade de agentes caros, condições de

tratar grandes volumes de efluentes e função da cinética rápida, capacidade de lidar com diversos metais pesados, investimento de capital considerado baixo e a recuperação de metais adsorvidos normalmente é melhor que outros métodos (ABBAS, *et al.*, 2014).

Entretanto, esse processo possui fatores que podem afetar a qualidade de remoção, sendo a natureza da biomassa, o seu preparo, por exemplo, células imobilizadas ou suspensão livre entre outros, maneira de como foi feito o cultivo, que pode interferir no diâmetro da célula, geração de compostos extracelulares, composição da parede, etc. (ABDI; KAZEMI, 2015).

Quanto processo, a faixa de temperatura ideal é de 20 a 35°C, é fortemente dependente do pH, a concentração de biomassa é uma variável importante, pois se tiver um alto teor de biomassa, este irá dificultar que os íons metálicos cheguem aos locais de ligação e em concentrações mais baixas a adsorção é aumentada, portanto para de encontrar a concentração ideal, é avaliada a queda na capacidade de sorção. Tem-se ainda o ponto de saturação, verificado normalmente por isoterma clássicos de adsorção, além da afinidade entre o biossorbente e o metal. Caso esta afinidade for baixa, é possível utilizar pré-tratamentos, tanto físicos como químicos (MORCELLI, 2021).

2.5 BIORREMEDIAÇÃO

Vários métodos de tratamentos químicos e físicos para remoção de metais pesados foram criados, porém cada um deles apresenta seus respectivos problemas, além de não serem muito favoráveis por alto custo e baixa eficiência. Em relação a isso uma abordagem mais limpa, de menor custo e segura como o biotratamento que demonstra ser de alta eficiência (MANZLOOR, *et al.*, 2019). A Tabela 2 ilustra vantagens e desvantagens de alguns tratamentos físico-químicos e biotratamento, uma pesquisa realizada por ESLAMI, *et al.*, 2015.

Tabela 2 - Comparação de alguns métodos de tratamento de metais pesados.

Processo de tratamento	Vantagens	Desvantagens
Sedimentação química	Baixos custos iniciais, fácil utilização, menor tempo de	Alta produção de lodo, utilização muito alta e custo de descarte de lodo

	sedimentação e melhor sedimentação do lodo	
Flotação	Baixo tempo de retenção hidráulica, custos relativamente baixos	São necessários tratamento adicionais para melhorar o rendimento da remoção de metais pesados
Troca de íons	Falta de produção de lodo, baixo tempo necessário	Alto investimento e custos atuais, as resinas não são adequadas para todos os metais
Tratamento biológico	Baixo custo de investimento e de utilização, alta eficiência	A necessidade de um micróbio específico, condições ambientais especiais, exigindo um substrato para os microrganismos.

Fonte: ESLAMI, *et al.*, 2015.

A biorremediação é a capacidade de algumas biomassas de microrganismos, por meio da absorção e atividade metabólicas indiretas, remover metais pesados de águas residuais. Entre estas estão as leveduras, bactérias, fungos, algas e bolores (MANZOOR, *et al.*, 2019).

2.5.1 Tipos de biorremediação

Existem dois tipos de biorremediação a *ex situ* em que o material contaminado é levado até os biorreatores para tratamento junto ao material biológico. Esse processo é feito quando o efluente tem a possibilidade de contaminar solos ao seu redor ou até mesmo pessoas. Seu custo se torna elevado pois há necessidade do transporte do material a ser remediado, e então após o tratamento, o mesmo retorna para o local de onde foi removido (AMARAL, *et al.*, 2020).

O outro tipo é a *In situ* em que o procedimento é realizado no local contaminado, não sendo necessário a movimentação do metal contaminado, sendo este em relação à *ex situ* mais vantajoso. É considerado um processo de baixo custo, ser usado em grande área contaminada e é efetivo em relação às técnicas de incineração (AMARAL, *et al.*, 2020).

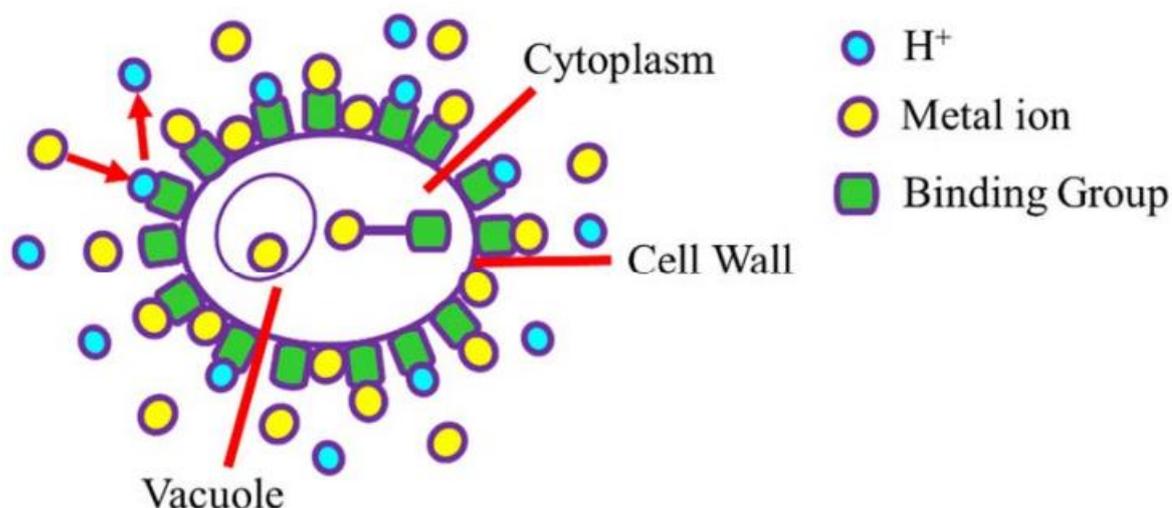
2.5.2 Biorremediação de metais pesados usando microalga

Entre os microrganismos, as microalgas possuem grande capacidade de remover metais pesados. Alguns destes metais pesados são essenciais para o funcionamento normal das microalgas como o Fe e o Mg, para fotossíntese, Cr para o metabolismo, Zn tem influência no desempenho das proteínas e clorofila e o Co para reações intracelulares e produção de vitaminas essenciais (PITTAM, *et al.*, 2011; MANZOOR, *et al.*, 2019).

As microalgas, já vêm sendo usadas na remoção de poluentes tanto orgânicos quanto inorgânicos por meio da biorremediação em efluentes industriais. Estas possuem em suas paredes celulares diversos grupos funcionais, sendo o amino, carboxila, sulfato e a hidroxila que atuam como principais locais de ligação para remoção dos metais pesados. (ARUNAKUMARA, *et al.*, 2008; RAMIREZ, *et al.*, 2017).

Este processo, possui duas etapas, uma rápida e outra lenta, em que os metais são adsorvidos na superfície celular, processo conhecido como adsorção física, reversível e na sequência propagam-se para o seu interior, onde são transportados para o citoplasma em um processo chamado de quimissorção, irreversível. Entretanto, a existência de metais pesados em excesso dentro desses microrganismos trás toxicidade a elas, podendo vir a causar a morte celular e conseqüentemente isso limita significativamente essa aplicação (ARUNAKUMARA, *et al.*, 2008; DWIVEDI, 2012; RAMIREZ, *et al.*, 2017). A Figura 14 demonstra esse mecanismo.

Figura 14 - Mecanismo de adsorção e absorção da célula de microalga.



Fonte: BILAL, *et al.*, 2018.

Esse mecanismo de reação, é acompanhado pela liberação de prótons ou outros cátions conectados e, na prática, acontece o processo de troca iônica. A troca de íons pode ser muito diferente entre as microalgas, por exemplo as algas unicelulares, como a *Chlorella*, possuem maior capacidade de troca iônica já que sua proporção entre superfície e o volume são maiores, em relação às demais microalgas utilizadas para esse processo (PIOTROWSKA, *et al.*, 2012).

Porém a capacidade de tolerância e habilidade das microalgas em adsorver metal pesado pode variar de espécie para espécie, dependendo de sua propriedade morfológicas, citologia, fisiologia e outros parâmetros genéticos, além tem ainda a questão dos metais e suas propriedades (SUBRAMANIYAM, *et al.*, 2016).

2.5.3 Fatores que influenciam na remoção de metais pesados usando microalgas

Diversos fatores podem influenciar na remoção de metais pesados por meio de microalgas, como a concentração inicial dos íons metálicos, pH, vários compostos de íons metálicos, concentração da biomassa, temperatura, força dos íons afinidade

Com o aumento da concentração dos íons metálicos, conseqüentemente aumenta a quantidade de adsorção de metais pelas algas, porém saturando a uma determinada concentração, mas a absorção intracelular desses íons é reduzida (MANZOOR, *et al.*, 2019).

É necessário determinar o pH ideal para cada reação que será realizada se os íons metálicos e a microalga foram distintos em cada experimento e a medida para essa diferença é o ponto isoelétrico. Se o pH estiver menor que este ponto, as células serão carregadas positivamente na superfície e conseqüentemente inibindo a interação com os íons metálicos e com o aumento deste, haverá mais locais negativos disponíveis na superfície. De forma geral, a melhor faixa de pH fica entre 4 e 6 (DWIVEDI, 2012).

Os metais estão dispostos nas águas residuais em várias formas, sendo estas em íons livres a complexos intrincados como compostos orgânicos e ligantes e também íons adsorvidos na superfície. Entretanto, para uma melhor eficiência, apenas a concentração de íons livres possui importância. Para aumentar a concentração dos íons livres em um ambiente, deve-se diminuir o pH (MANZOOR, *et al.*, 2019).

A quantidade de íons coletados no ambiente, depende da concentração da biomassa. Se aumentado a concentração em um grama altera o equilíbrio presente no sistema e diminui a adsorção dos íons, já por outro lado o aumento da concentração de biomassa diminui os íons metálicos disponíveis, aumentando as reações eletrostáticas. Quanto maior a distância entre as células mais íons metálicos são adsorvidos, mas o aumento da concentração da biomassa aumenta o número de íons metálicos adsorvidos pela célula, pois o número de locais de ligação é aumentado (MANZOOR, *et al.*, 2019).

A adsorção pode aumentar com o aumento da temperatura, pois esta ligação dos íons metálicos com a microalga é um processo endotérmico, porém pode ocorrer exceções. Outro ponto para o aumento da temperatura é pelo aumento de locais ativos disponíveis para ligação dos metais. Esse fator, também pode interferir na absorção intracelular em que a absorção máxima ocorre a uma determinada temperatura. Assim como o pH, o efeito da temperatura pode diferir de microalga para microalga, mas de forma geral, a melhor faixa encontrada está entre 25 e 30°C que é a temperatura ideal de crescimento do microrganismo (CHEN, *et al.*, 2008).

A quantidade de íons metálicos adsorvidos é interferida pela presença de ânions e cátions presentes no meio. Os lugares ativos para ligação são cometidos por metais leves e metais pesados caso ocorra o aumento da força iônica e quanto maior for o número de ânions menor será o número de íons metálicos disponíveis (MANZOOR, *et al.*, 2019).

Segundo CHEN, *et al* (2008), onde estudou a força iônica usando clorito de sódio para regular a força iônica em quantidade de 0,5, 0,05 e 0,005 mol/L e obtiveram como resultado que quando a força é reduzida de 0,5 para 0,05 mol/L a eficiência de remoção aumenta de 80% para 95% e assim concluíram que durante a adsorção ocorre uma competição entre os íons metálicos e outros grupos funcionais. Para um pH constante, o número de grupos funcionais também se mantém constante, entretanto com o aumento da força iônica os locais disponíveis para a absorção são reduzidos

Outro fator a se considerar é a afinidade da microalga com o metal pesado que pode gerar influência na absorção. Em casos que este fator está baixo, podem ser usados pré-tratamentos tanto químicos quanto físicos que interferem na permeabilidade e nas cargas superficiais da biomassa, além do aumento dos sítios ativos acessíveis para a formação de ligações com os metais. Esses pré-tratamentos

para aumentar a adsorção do metal podem ser feitos com detergentes ácidos, calor e álcalis (AHALYA, *et al.*, 2003; MORCELLI, 2021).

3 METODOLOGIA

A pesquisa a que se propõe o estudo foi desenvolvida na faculdade de Horizontina (FAHOR), localizada no município de Horizontina no Estado do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi realizada nos laboratórios da FAHOR, abordando um método qualitativo e quantitativo, com campo de pesquisa descritivo-exploratório. O procedimento foi de caráter laboratorial com técnicas de coleta de dados através de experimentos

3.1 CULTIVO DA MICROALGA

3.1.1 Aquisição da cepa, equipamentos e acessórios

A cepa da microalga *Chlorella sp.* foi adquirida através do site de compras do Mercado Livre, com fornecedor residente na cidade de São Paulo, SP. Ele forneceu 250 ml de cepa, juntamente com 100 ml de fertilizante conhecido como F/2, produto este utilizado para quem deseja cultivar fitoplâncton em casa. Quatro lâmpadas para o processo de fotoperíodo foram adquiridas em uma loja de equipamentos para construção na cidade de Horizontina, juntamente com fios, suporte para prateleira, parafusos, mangueiras, régua de tomadas, plug de tomada e suporte para lâmpadas. As bombas de ar e o controlador de fotoperíodo também foram adquiridos no site citado anteriormente.

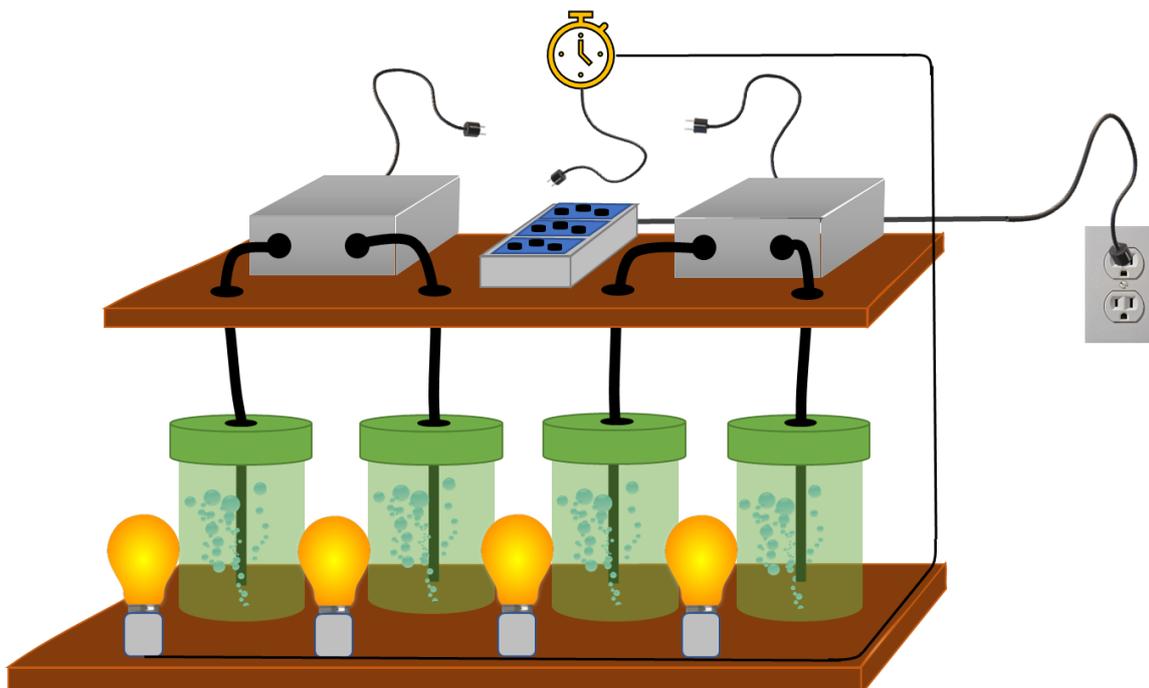
3.1.2 Sistema de cultivo

Para cultivar a microalga foi necessário montar um sistema de cultivo para que a *Chlorella sp.* possua condições básicas necessárias para sua reprodução, sendo estas, fotoperíodo, aeração, movimentação das células e nutrição.

Sendo assim, com base nas informações dos estudos já citados no referencial teórico, referente a questão do período de iluminação e a aeração que ajuda na movimentação das células e também no fornecimento de gás carbônico para a fotossíntese das microalgas, desenhou-se um modelo de sistema de reprodução de microalga.

O desenho foi realizado no *software Excel*, de maneira meramente ilustrativa com o objetivo de gerar uma melhor visualização do projeto a ser construído conforme está ilustrado na Figura 15.

Figura 15 - Esquema do sistema de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.



Como pode ser observado na Figura 15, o projeto está composto por um sistema de fotoperíodo, onde tem-se 4 lâmpadas ligadas a um controlador e o mesmo é conectado a uma régua de energia. Na parte superior, foram então dispostas duas bombas de ar com duas saídas cada, suportando desta forma até 4 biorreatores. Essas bombas realizam a função de movimentar as células bem como introduzir gás carbônico no sistema para que a fotossíntese seja realizada e conseqüentemente ocorra reprodução das células de microalga.

3.1.3 Cultura

A cepa foi colocada em 4 recipientes já esterilizados de 1L cada, onde foi colocado aproximadamente 5% de cepa e 95% de meio de cultivo F/2, também conhecido como fórmula de Guillard. Segue na Tabela 3 a fórmula de Guillard com suas respectivas concentrações de acordo com REDAELLI (2012).

Tabela 3 - Formula de Guillard usada no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.

Nome	Fórmula	Quantidade
Nitrato de sódio	NaNO ₃	75,00 mg/l
Fosfato monossódico	NaH ₂ PH ₄	5,00 mg/l
EDTA	Na ₂ EDTA	4,36 g/l
Cloreto de ferro III	FeCl ₃ H ₂ O	3,15 g/l
Sulfato de cobre penta hidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	9,80 mg/l
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,00 mg/l
Cloreto de cobalto II	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,00 mg/l
Cloreto de manganês	MnCl ₂ .4H ₂ O	180,00 mg/l
Molibdato de sódio	NaMoO ₄ .2H ₂ O	6,30 mg/l
Vitamina B1	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	100,00 mg/l
Vitamina B7	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,50 mg/l
Vitamina B12	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0,50 mg/l

Fonte: REDAELLI, 2012.

Após inseridos o meio de cultura e a microalga no biorreator, o sistema de aeração acionado, os mesmos foram fechados, e então iniciou-se o processo de reprodução das microalgas com fotoperíodo de 12 horas.

A cultura teve início no mês 06 do ano de 2022 e a base para o meio de nutrientes, foi a água deionizada, após 2 meses, no mês 08 de 2022 a base foi alterada para água de torneira potável, onde se manteve-se permanentemente até a data de apresentação do estudo.

A partir da data de alteração da base do meio, onde foi repostado novamente todos os nutrientes necessários para o cultivo, o sistema não foi mais reabastecido com novas substância de crescimento, ou seja, o F/2 é inserido apenas no início do cultivo e depois não é mais necessário inserir até a colheita das microalgas, podendo ser esta realizada partir de 1 ou 2 meses de cultivo.

Após aproximadamente 8 meses de cultivo, no mês 04 de 2023, o *layout* do sistema foi alterado, onde foi realizado um *upgrade*, passando de 4 biorreatores de 1 L cada, para 2 de 5 L cada, totalizando um cultivo de aproximadamente 10 litros.

3.1.4 Colheita

A primeira colheita ocorreu no mês 04 de 2023, ou seja, após 8 meses de cultivo. Colheu-se aproximadamente 2 L da microalga, neste período, o sistema ainda era composto por 4 biorreatores, sendo assim, retirou-se uma alíquota de 500 ml de cada reator, homogeneizou-se os 2 litros, e então foram separados em dois frascos de 1 litro cada e então destinados ao laboratório de química geral para o processo de centrifugação e conseqüentemente a obtenção da biomassa.

A segunda colheita realizada, ocorreu no mês 08 de 2023, após 12 meses de cultivo. Colheu-se aproximadamente 1 L da microalga, neste período, já aqui o sistema era composto por 2 biorreatores de 5 litros. Retirou-se uma alíquota de 500 ml de cada reator, homogeneizou-se as 1000 ml, e então foram colocados em um frasco para transporte e posteriormente destinados ao laboratório de química geral para filtração a vácuo e então a obtenção da biomassa.

E por fim a terceira colheita ocorreu no mês 09 do ano de 2023. Colheu-se aproximadamente 1 L da microalga, retirando-se uma alíquota de 500 ml de cada reator, homogeneizou-se as 1000 ml, e então foram colocados em um frasco para transporte e posteriormente destinados ao laboratório de química geral para o processo de filtração a vácuo e conseqüentemente a obtenção da biomassa.

3.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

3.2.1 Solução algal

O preparo da solução algal foi realizado por duas metodologias, uma sendo por meio de centrifugação, denominado como método “a” e o outro sendo por filtração a vácuo, denominado como método “b”.

3.2.1.1 Método “a”

A preparação da solução algal foi realizada utilizando os equipamentos centrífuga, balança analítica e tubos de ensaio apropriados para o uso em centrífugas.

Primeiramente foi pesado o tubo de ensaio vazio, posteriormente adicionando-se a microalga líquida no tubo, centrifugando-a em condições de 2000 rpm por 10 min.

Sequencialmente retirou-se o sobrenadante gerado com uma pipeta, e posteriormente pesando-se a quantidade de biomassa que ficou depositada no fundo do tudo de ensaio.

Para encontrar o peso da massa da microalga obtida no processo, realizou-se um cálculo de diferença entre o valor do peso do tubo de ensaio vazio e o valor do peso do tubo de ensaio após a retirada do sobrenadante.

Esse processo se repetiu até conseguir uma quantidade de 2 g de biomassa que posteriormente foram diluídas em um becker e então transferidas para o balão volumétrico de 200 ml e sequencialmente aferido com água até o menisco. A concentração obtida foi de então 10 g/L.

3.2.1.2 Método “b”

Foi usado uma bomba de vácuo, micro filtros de 47 mm de diâmetro, kit de vidrarias para filtração a vácuo e balança analítica.

Primeiramente pesou-se um micro filtro seco, primeira pesagem, sequencialmente, realizou-se a filtração à vácuo da microalga, pesou-se novamente o microfiltro agora com a biomassa já retida no mesmo, segunda pesagem, posteriormente raspou-se o material depositado no microfiltro e pesou-se o material raspado, terceira pesagem.

Esse processo se repetiu até conseguir uma quantidade de 2 g de biomassa que posteriormente foram diluídas em um becker e então transferidas para o balão volumétrico de 200 ml e sequencialmente aferido com água até o menisco. A concentração obtida foi de então 10 g/L.

Com as 3 pesagens, encontrou-se o rendimento da raspagem da microalga retida no microfiltro, seguindo a Equação 1.

Equação 1 - Equação do rendimento da filtração a vácuo da microalga.

$$\text{Rendimento} = \frac{3^{\circ} \text{ pesagem}}{2^{\circ} \text{ pesagem} - 1^{\circ} \text{ pesagem}}$$

3.2.2 Soluções químicas

- a. Solução de cloridrato de hidroxilamina a 10% (m/v)

Dissolveu-se 10 gramas de cloridrato de hidroxilamina em um béquer, posteriormente transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 ml e então aferiu-se com água deionizada até o menisco.

b. Solução tampão de acetato de amônio

Dissolveu-se 250 g de acetato de amônio em 150 ml de água deionizada, adicionou-se 700 ml de ácido acético glacial e agitou-se até a homogeneização.

c. Solução de 1,10 fenantrolina a 0,1% (m/v)

Dissolveu-se 0,1 g de 1,10fenantrolina monohidratada em 100 ml de água deionizada sob agitação e aquecimento a 80°C. A solução não pode chegar no ponto de fervura e se a mesma se apresentar escura, deve ser descartada.

d. Solução de permanganato de potássio 0,02 mol/L

Dissolveu-se 0,316 g de permanganato de potássio em água e então foi transferido para um balão volumétrico de 100 ml e posteriormente aferiu-se com água deionizada até o menisco.

e. Solução estoque de ferro

Adicionou-se lentamente 20 ml de ácido sulfúrico em 50 ml de água deionizada e então dissolveu-se 1,404 g de sulfato ferroso amoniacal. Posteriormente adicionou-se lentamente o permanganato de potássio até uma coloração rosa persistente e por fim diluiu-se para 1000 ml de água deionizada.

f. Solução de ferro

Pesou-se 0,1 g de sulfato ferroso, diluiu-se com água deionizada em um béquer, e então transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 500 ml e aferiu-se com água deionizada até o menisco.

3.3 REALIZAÇÃO DOS TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DA REMOÇÃO DE FERRO

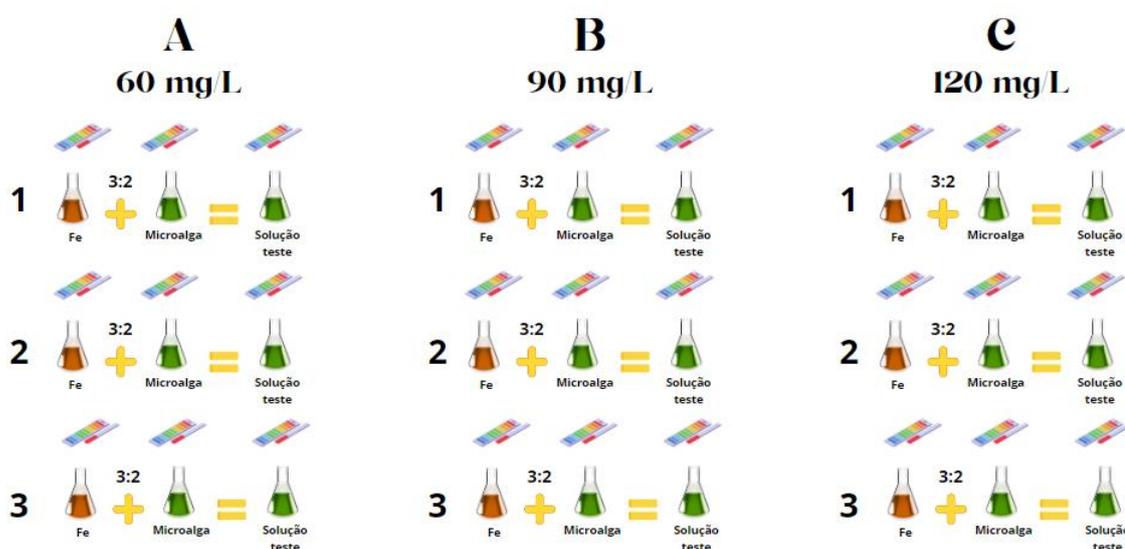
Os testes foram divididos em basicamente 3 grupos, e os resultados de um grupo serviram como base para definir os testes do próximo grupo. O grupo 1 (G1) caracteriza-se com uma metodologia exploratória, já o grupo 2 (G2) procura testar a variável tempo de contato entre o Fe e a microalga e por fim o grupo 3 (G3) busca

gerar um ambiente de biorremediação mais próximo da realidade, ou seja, com concentrações da solução de ferro mais baixas. Quanto ao preparo para a análise, é identificado com “a” para centrifugação e “b” filtração a vácuo.

3.3.1 Grupo 1

Nos experimentos deste grupo foram realizados testes utilizando a solução de ferro amoniacal de concentração 100, 150 e 200 mg/L e a solução algal. Inicialmente mediu-se o pH das soluções individuais e após preparou-se 9 soluções teste (três concentrações diferentes, em triplicata) na proporção 3:2 (solução de ferro:solução algal) da seguinte forma: em 9 béqueres adicionou-se 60 ml (60%) da solução de ferro e 40 ml (40%) da solução algal em cada, totalizando 100 ml. Mediu-se o pH das soluções teste, conforme Figura 16.

Figura 16 - Esquema da organização dos testes do grupo 1, com 3 triplicatas de concentrações diferentes, totalizando 9 experimentos e com indicativo de que foi realizado uma análise de pH em cada solução preparada.



Inicialmente estes testes foram mantidos sob agitação em agitador magnético por 60 minutos. Após este processo, foram deixados em repouso por 23 horas, conforme Figura 17. Posteriormente ao período de descanso, retirou-se 50 ml dos testes G1A1, G1B1 e G1C1, centrifugou-se e o sobrenadante foi submetido a análise de ferro em espectrofotômetro UV-vis. Os 50 ml restantes passaram por um processo de filtração a vácuo e o filtrado foi analisado conforme Figura 18.

Figura 17 - Esquema dos testes no processo de agitação e repouso.

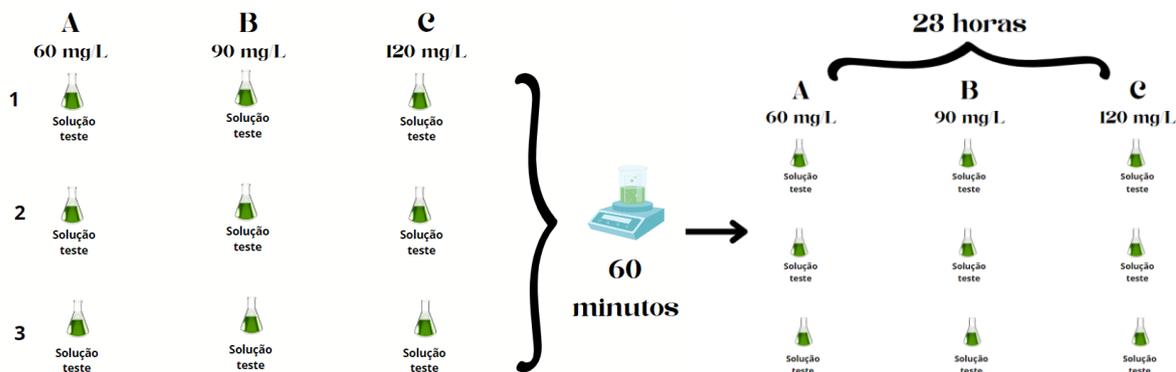
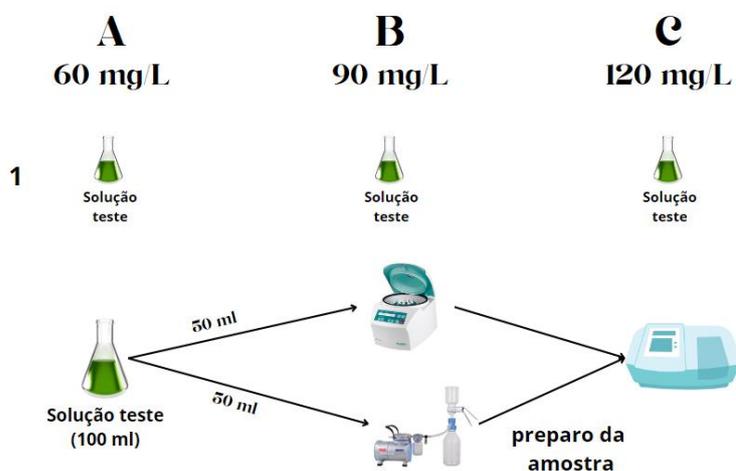
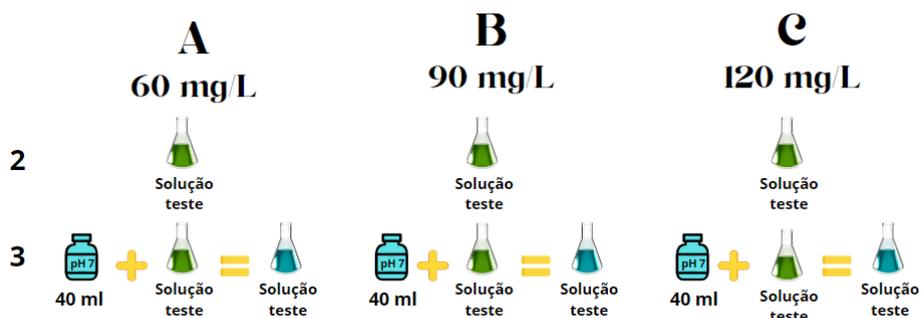


Figura 18 - Esquema dos testes G1A1, G1B1 e G1C1 no processo de preparo de amostra.



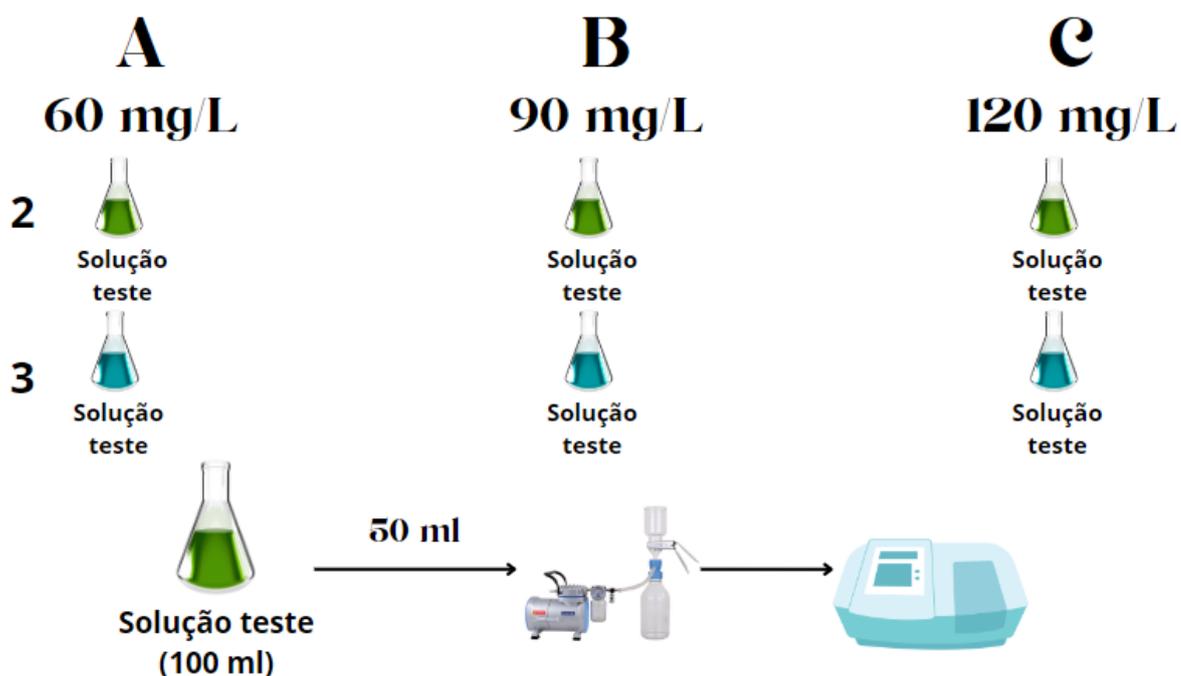
Nos testes G1A3, G1B3 e G1C3 adicionou-se 40 ml do tampão de pH 7 (Figura 19) e após juntamente com os testes G1A2, G1B2 e G1C2, as soluções foram mantidas sob agitação em agitador magnético por mais 60 minutos e então ficaram em repouso por mais 23 horas.

Figura 19 - Adição da solução tampão nos testes G1A3, G1B3 e G1C3.



Após o período de 48 horas desde o início dos experimentos, os 6 experimentos G1A2, G1B2, G1C2, G1A3, G1B3 e G1C3 restantes foram então submetidos a análise no espectrofotômetro por UV-vis após filtração à vácuo, conforme Figura 20.

Figura 20 - Experimentos G1A2, G1B2, G1C2, G1A3, G1B3 e G1C3 no processo de preparo de análise.



Na Tabela 4 pode-se visualizar de forma geral todos os processos e variáveis usados nos testes realizados no grupo 1.

Tabela 4 - Visão geral dos experimentos realizados no grupo 1.

Identificação	Concentração inicial de ferro (mg/l)	Replicata	Tempo antes da análise (horas)	Volume de adição de tampão 7 (mL)	Preparo para análise em UV-Vis
G1A1a	100	1	24		centrifugação
G1A1b	100	1	24		filtração a vácuo
G1A2b	100	2	48		filtração a vácuo
G1A3b	100	3	48	40	filtração a vácuo

G1B1a	150	1	24		centrifugação
G1B1b	150	1	24		filtração a vácuo
G1B2	150	2	48		filtração a vácuo
G1B3	150	3	48	40	filtração a vácuo
G1C1a	200	1	24		centrifugação
G1C1b	200	1	24		filtração a vácuo
G1C2b	200	2	48		filtração a vácuo
G1C3b	200	3	48	40	filtração a vácuo

3.3.2 Grupo 2

Nos experimentos deste grupo foram realizados testes utilizando a solução de ferro amoniacal de concentração 200 mg/L e a solução algal. Inicialmente mediu-se o pH das soluções individuais e após preparou-se 3 soluções teste (G2A, G2B e G2C) na proporção 3:2 (solução de ferro:solução algal) da seguinte forma: em 3 béqueres adicionou-se 90 ml (60%) da solução de ferro e 60 ml (40%) da solução algal em cada totalizando 150 ml. Mediu-se o pH das soluções teste (Figura 21). Posteriormente estes testes foram mantidos sob agitação em agitador magnético por 90 minutos. A cada 30 minutos (30, 60 e 90 minutos) retirou-se uma alíquota de 50 ml de cada solução, filtrou-se a vácuo e os filtrados foram submetidos a análise espectrofotômetro por UV-vis (Figura 22). Segue na Tabela 5 os testes realizados no grupo 2.

Figura 21 - Esquema da organização dos testes do grupo 2, com 3 testes de concentrações iguais, e com indicativo de que foi realizado uma análise de pH em cada solução preparada.

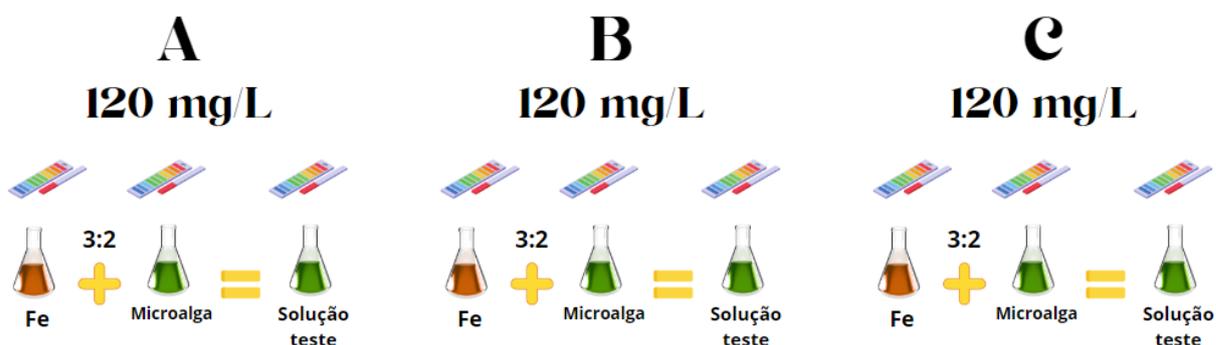


Figura 22 - Testes do grupo 2 no processo agitação e posteriormente seguindo para o preparo de análise.

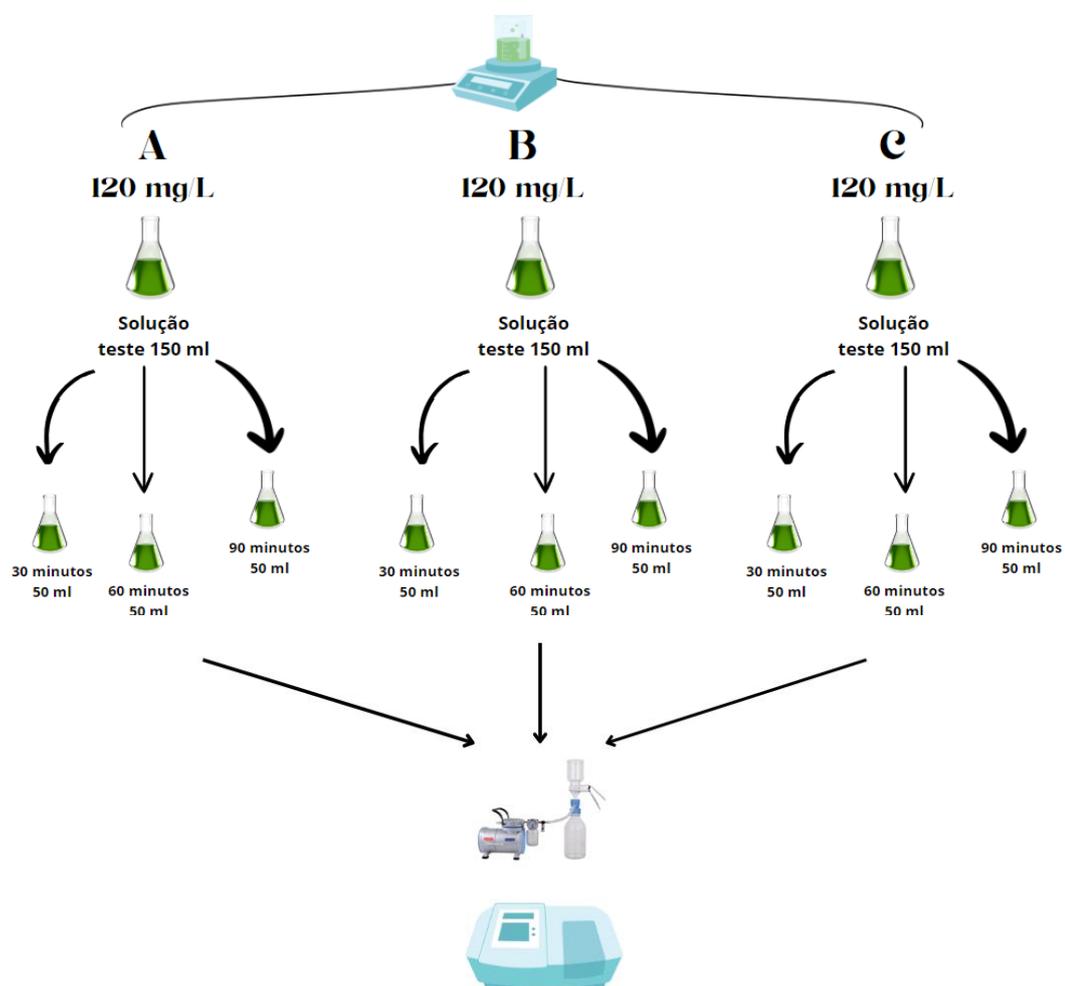


Tabela 5 - Visão dos testes realizados no grupo 2.

Identificação	Replicata	Tempo antes da análise (minutos)
G2A1b	1	30

G2A2b	2	60
G2A3b	3	90
G2B1b	1	30
G2B2b	2	60
G2B3b	3	90
G2C1b	1	30
G2C2b	2	60
G2C3b	3	90

3.3.3 Grupo 3

Nos experimentos deste grupo foram realizados testes utilizando a solução de sulfato ferroso de concentração 2, 5, 10 e 20 mg/ e a solução algal. Inicialmente mediu-se o pH das soluções individuais e após preparou-se 4 soluções teste (G3A, G3B, G3C e G3D) na proporção 3:2 (solução de ferro:solução algal) da seguinte forma: em 4 béqueres adicionou-se 90 ml (60%) da solução de ferro e 60 ml (40%) da solução algal em cada. Mediu-se o pH das soluções teste (Figura 23). Posteriormente estes testes foram mantidos sob agitação em agitador magnético por 90 minutos. A cada 30 minutos (30, 60 e 90 minutos) retirou-se uma alíquota de 50 ml de cada solução, filtrou-se a vácuo e os filtrados foram submetidos a análise espectrofotômetro por UV-vis (Figura 24). Segue na Tabela 6 os testes realizados no grupo 3.

Figura 23 - Esquema da organização dos testes do grupo 3, com 4 testes de concentrações diferentes, e com indicativo de que foi realizado uma análise de pH em cada solução preparada.



Figura 24 - Testes do grupo 2 no processo agitação e posteriormente seguindo para o preparo de análise.

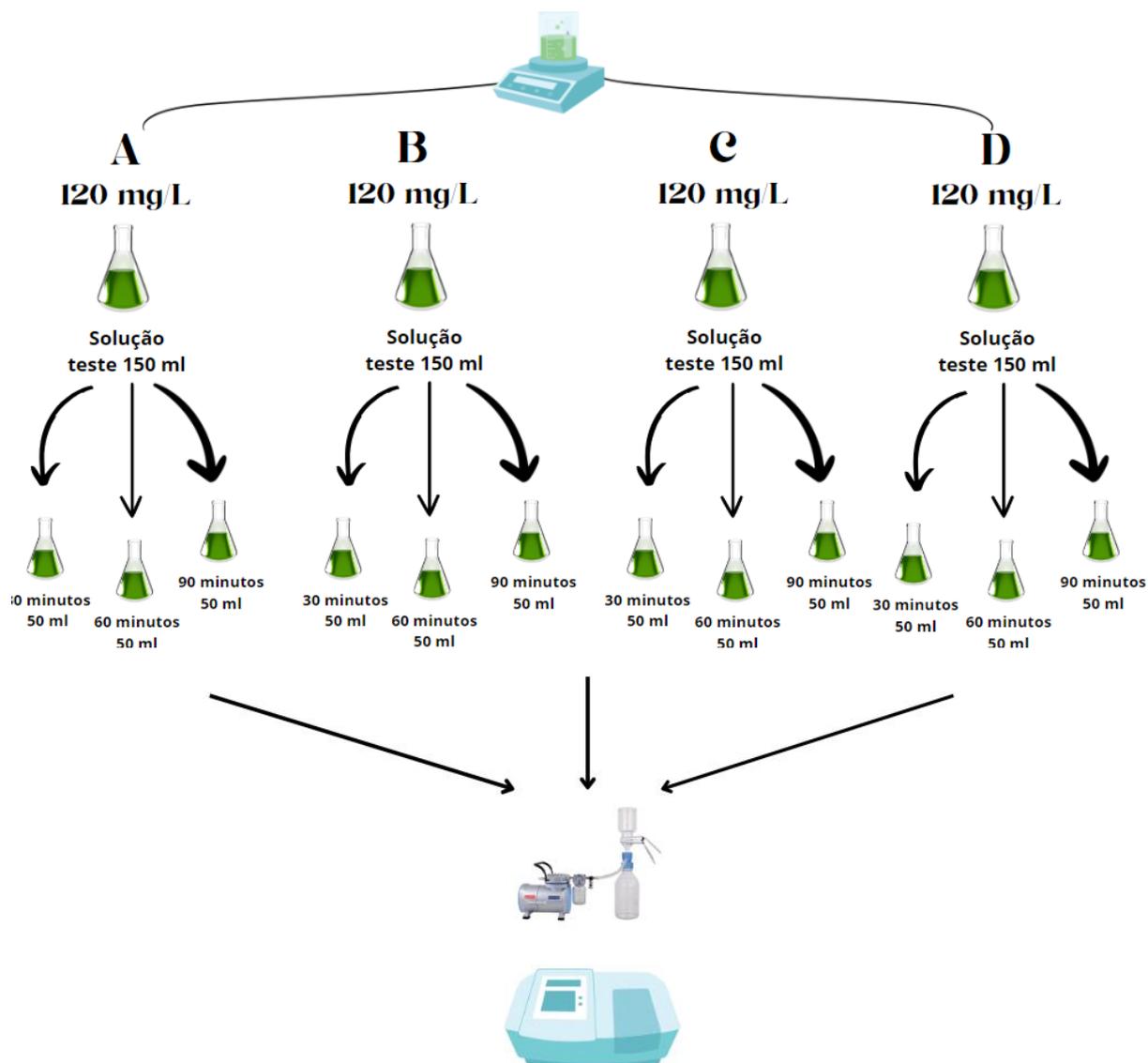


Tabela 6 - Visão dos testes realizados no grupo 3.

Identificação	Concentração inicial de ferro (mg/l)	Replicata	Tempo antes da análise (minutos)
G3A1b	2	1	30
G3A2b	2	2	60
G3A3b	2	3	90
G3B1b	5	1	30
G3B2b	5	2	60
G3B3b	5	3	90
G3C1b	10	1	30

G3C2b	10	2	60
G3C3b	10	3	90
G3D1b	20	1	30
G3D2b	20	2	60
G3D3b	20	3	90

3.3.4 Visão geral dos experimentos realizados

Na Tabela 7, pode ser visualizado de forma sucinta todas as variáveis e constantes usadas e análises realizadas.

Tabela 7 - Visão geral dos experimentos realizados nos grupos 1,2 e 3.

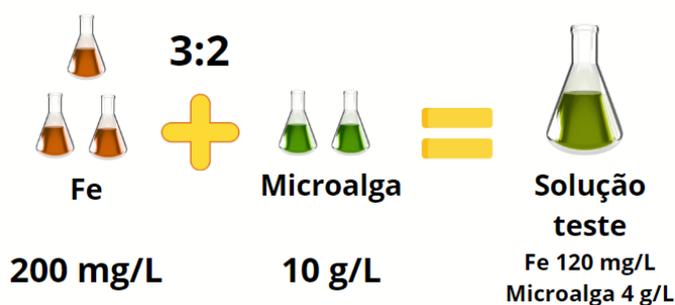
Variáveis, constantes e análises	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Solução utilizada	Sulfato de ferro amoniacal	Sulfato de ferro amoniacal	Sulfato de ferro
Concentração inicial da solução de Fe (mg/L)	100,0, 150,0 e 200,0	200,0	2,0, 5,0, 10,0 e 20,0
Concentração final da solução de Fe(mg/L)	60,0, 90,0 e 120,0	120,0	1,2, 3,0, 6,0 e 12,0
Concentração inicial da solução algal (g/L)	10,0	10,0	10,0
Concentração final da solução algal (g/L)	4,0	4,0	4,0
Quantidade de testes	9	3	4
Proporção (Fe:microalga)	3:2	3:2	3:2
Volume (Fe-microalga) (ml)	60,0-40,0	90,0-60,0	90,0-60,0
Agitação	60 minutos, após 23 horas mais 60 minutos	90 minutos	90 minutos
Tempo	24, e 48 horas	30, 60 e 90 minutos	30, 60 e 90 minutos

Preparo do teste para a análise	Centrifugação e filtração a vácuo	Filtração a vácuo	Filtração a vácuo
Adição de tampão 7	Adicionado somente em um frasco de cada concentração	Sem adição	Sem adição
Análise de pH	Realizada	Realizada	Realizada
Análise espectrofotômetro por UV-vis	Realizada	Realizada	Realizada

Na tabela acima, são apresentadas várias variáveis que foram utilizadas durante os testes como a solução de ferro, a concentração da solução de ferro, agitação, tempo de contato, preparo dos testes para a análise e a adição do tampão 7. Já as constantes usadas foram a concentração da solução algal e a proporção de Fe:microalga. Quanto às análises foram feitas apenas duas, uma sendo a análise de pH e outra no espectrofotômetro por UV-vis.

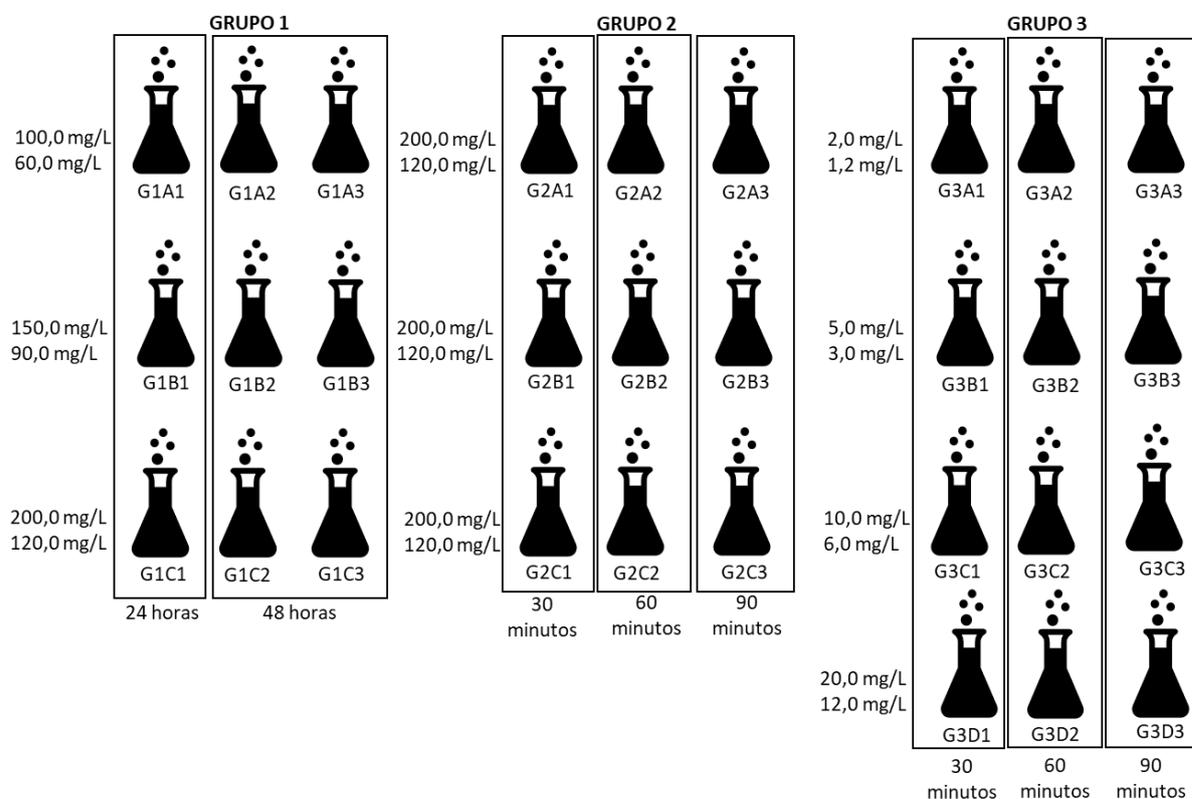
Quanto ao item concentração final da solução de Fe, refere-se à concentração de ferro posterior ao contato com a solução algal, ou seja, quando a solução teste é formada, pois neste ponto, a solução de ferro corresponde a apenas 60% do volume e o mesmo ocorre com a solução de microalga. Na Figura 25 isso pode ser observado.

Figura 25 - Preparo dos testes e suas respectivas concentrações iniciais e finais da solução de ferro e da solução de microalga.



Na Figura 26, está ilustrado um esquema geral da organização dos testes em que a concentração superior citada na figura se refere ao teor inicial de Fe e a concentração inferior refere-se ao teor final de Fe.

Figura 26 - Esquema geral da organização dos testes em que a concentração superior citada na figura se refere ao teor inicial de Fe e a concentração inferior refere-se ao teor final de Fe.



A Figura 26 demonstra um esquema dos testes realizados nos 3 grupos. No grupo 1 foram feitos 9 testes, no grupo 2, foi apenas 3 testes e no grupo 3 foram feitos 4 testes.

3.4 ANÁLISES

Durante este estudo, foram realizados apenas dois tipos de análises. Uma sendo a análise de pH, onde traz a informação do valor de pH de cada solução individual e também das soluções testes e a outra, a análise espectrofotométrica, que informa indiretamente o valor da concentração da solução analisada.

3.4.1 Análise de pH

Para realização da análise de pH, primeiramente foi necessário realizar a calibração do equipamento conforme a ITKQG002 - Operação do medidor de pH

PHOX P1000. Posteriormente agitou-se a solução, transferiu-se uma alíquota para um béquer e então mergulhou-se o eletrodo na solução e efetuou-se a análise de pH.

3.4.2 Análise de ferro

Uma análise de ferro pode ser dividida em pelo menos 3 etapas. A primeira sendo o preparo da curva de calibração, seguindo do preparo dos testes ou amostras para a análise no espectrofotômetro, e pôr fim a análise propriamente dita no equipamento.

3.4.2.1 Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração, seguiu-se os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. A série de padrões foi preparada a partir da solução estoque de sulfato ferroso amoniacal e para o branco utilizou-se água deionizada.

A partir da solução estoque de ferro com concentração de 200 mg/L, retirou-se várias alíquotas partindo de 0,5 até 4 ml, com diferença entre elas de 0,5 ml, gerando um total de 8 alíquotas. Cada alíquota retirada da solução estoque foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e todos foram aferidos com água até o menisco. Os pontos gerados para a curva de calibração foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mg/L, conforme apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 - Identificação dos pontos da curva de calibração de ferro com respectivas informações sobre o preparo de cada solução.

Ponto da curva de calibração	Concentração da solução estoque (mg/L)	Alíquota retirada da solução estoque (ml)	Concentração final dos pontos da curva de calibração (mg/L)	Volume final de cada ponto (ml)
1	200,0	0,5	1,0	100,0
2	200,0	1,0	2,0	100,0
3	200,0	1,5	3,0	100,0
4	200,0	2,0	4,0	100,0
5	200,0	2,5	5,0	100,0

6	200,0	3,0	6,0	100,0
7	200,0	3,5	7,0	100,0
8	200,0	4,0	8,0	100,0

Para o preparo dos padrões, foi retirado uma alíquota de 50 ml de cada solução preparada na Tabela 8 e transferido para um erlenmeyer, posteriormente adicionou-se 2ml de ácido clorídrico, 1 ml de solução de hidroxilamina, pedras de ebulição e então a solução foi aquecida sob chama até o volume ser reduzida a 15 ou 20 ml. Na sequência foi resfriado até a temperatura ambiente e então transferido para um balão volumétrico de 50 ml. Neste balão também foi adicionado 10 ml da solução tampão, 4 ml de fenantrolina e por fim água deionizada até o menisco. Agitou-se e deixou-se em repouso por pelo menos 10 minutos até a análise no espectrofotômetro. Quanto ao branco, seguiu-se o mesmo preparo, porém usou-se água deionizada no lugar do sulfato ferroso amoniacal. A cada análise realizada, uma curva nova de calibração sempre era gerada repetindo-se todo o processo citado neste tópico (3.4.2.1),

3.4.2.2 Preparo dos testes

Uma alíquota de 50 ml foi retirada de cada teste, posteriormente esse volume passou por um processo de filtração a vácuo e no grupo 1 usou-se também a centrifugação, e por fim, foram transferidos os 50 ml filtrados para um erlenmeyer e então seguiu-se mesmo processo de preparo de padrões citado no tópico 3.4.2.1.

3.4.2.3 Metodologia para análise de ferro por UV-vis

Após o comprimento de onda selecionado, inseriu-se uma cubeta preta no primeiro compartimento e no segundo compartimento uma cubeta com o branco da análise. Com auxílio do puxador de carrinho, a cubeta preta é posicionada para ser medida na trajetória da luz e seleciona-se a opção de transmissão 0% T. Quanto a cubeta da solução branco, também é posicionado no feixe da luz e selecionou-se transmitância igual a 100% T.

Posteriormente ao procedimento, a opção absorbância foi escolhida. Agitou-se a amostra, transferiu-se de 3 a 3,5 ml para uma cubeta, posicionou-se á no terceiro

compartimento, alinhou-se a com o feixe de luz com auxílio do puxador e então aguardou-se o equipamento retornar o resultado da leitura de absorbância da amostra.

3.5 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os recursos necessários para a realização do estudo em questão podem ser divididos em tópicos como a montagem do sistema de cultivo, reagentes para a análise, vidrarias e acessórios utilizados na análise e equipamentos.

a) Sistema de cultivo

- Madeira
- Frasco com tampa de 1 litro
- Mangueira de silicone
- Quatro lâmpadas LED quente
- Duas bombas de ar
- Controlador de fotoperíodo
- Régua de tomadas

b) Reagentes

- Cloridrato de hidroxilamina ($\text{H}_3\text{NO.HCl}$) P.A.
- Acetato de amônio ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) 98%
- Ácido acético glacial (CH_3COOH) P.A.
- Fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$) P.A.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 98%
- Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) P.A.
- Ácido clorídrico (HCl) 37%
- Permanganato de potássio (KMnO_4) P.A.
- Fosfato dissódico/Fosfato de potássio monobásico (Solução tampão pH 7, usada para calibração do equipamento pHmetro)

c) Vidrarias e acessórios

- Microfiltro com diâmetro de 47 mm

- Vidrarias básicas de laboratório
- Tripé
- Bico de bunsen
- Tela de amianto
- Termómetro
- Kit para filtração a vácuo
- Tubos de ensaio
- Espátulas de aço

d) Equipamentos

- Bomba de vácuo (Prismatec)
- Balança analítica (Astral Científica)
- PHmetro (Phox)
- Espectrofotómetro (Quimis)
- Centrífuga (Astral Científica)
- Agitador (Fisatom)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SISTEMA DE CULTIVO

Para a realização do presente estudo, foi necessário a construção de um sistema de cultivo de microalgas, pois como diversas análises seriam realizadas, necessitaria ter-se uma certa quantidade sempre disponível para a realização do experimento, já que sua aquisição possui um valor considerável.

O sistema de cultivo foi construído de maneira que fosse possível realizar seu transporte, para caso fosse preciso a alteração do ambiente em que o sistema se encontra.

O sistema de cultivo foi dividido em duas partes, uma base inferior com dimensões 880 x 240 mm e uma base superior com 600 x 240 mm. Na base inferior, estão dispostos 4 frascos de 1 litro cada com suas respectivas tampas, estas possuindo um orifício no centro de diâmetro igual a 10 mm para a entrada da mangueira de silicone do sistema de aeração. Frente aos biorreatores, foram instalados 4 suportes para lâmpada a 195 mm de distância entre elas. As lâmpadas utilizadas são de LED com característica quente e potência de 9W.

Na base superior, tem-se duas bombas de ar, com duas saídas de ar cada, podendo assim suportar os 4 biorreatores. Para que o fluido chegue até o biorreator, usou-se mangueiras de diâmetro igual a 10 mm, realizou-se furos na base superior a 195 mm de distância entre eles, assim facilitando a passagem da base superior até os biorreatores na base inferior. Esse sistema de aeração possui um período permanente de 24 horas por dia.

Na parte superior ainda está disposto uma régua com tomadas, onde alimenta as duas bombas de ar e ainda um controlador de fotoperíodo com intervalo de 12 horas, em que corta corrente das 18:00 horas até as 06:00 horas e posteriormente a esse período liga as lâmpadas automaticamente até as 18:00 horas.

A Figura 27 ilustra o sistema previamente montado com algumas adições para ainda serem realizadas

Figura 27 - Sistema de cultivo de microalga.



As adições necessárias realizadas que foram citadas anteriormente são a instalação do controlador de fotoperíodo, substituição do frasco de 500 ml para um de 1000 ml e a adição das tampas dos biorreatores com seu orifício no centro para passagem da mangueira da bomba de ar.

Outra alteração que se mostrou necessária, foi a substituição da iluminação artificial. Na figura 18 usa-se lâmpadas incandescentes, estas escolhidas por apresentarem luz semelhante ao sol e pelo calor que produzem, já que a produção de microalga é mais eficiente em temperaturas próximas a 25°C. Para a *Chlorella*, a temperatura ótima de produção celular é de 24-25°C (PARK, *et al.*, 2015; ÅKERSTRÖM, *et al.* 2016; MA, *et al.*, 2017).

Entretanto, uma lâmpada nova, estava tendo vida útil menor que 7 dias, desta forma tornando-se inviável manter este tipo de iluminação. Sendo assim, as mesmas foram substituídas por lâmpadas de LED com característica de luz quente, e esta modificação foi totalmente eficaz, onde a vida útil destas se manteve intacta durante toda a pesquisa.

4.2 CULTURA

A cultura ficou em reprodução por aproximadamente 18 meses. Inicialmente começou-se utilizando água deionizada e nutrientes para reprodução das microalgas, entretanto a reprodução não estava sendo muito efetiva, apresentando coloração verde amarelada e com pouca densidade ao invés de estarem com coloração verde escuro. A Figura 28 ilustra o início do cultivo.

Figura 28 - Início do cultivo da microalga.



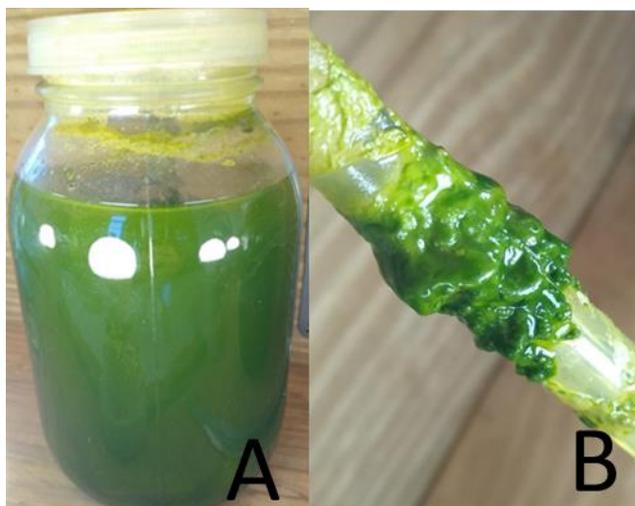
Após dois meses aproximadamente, usando água deionizada, o meio de cultura foi alterado para água de torneira, e o resultado foi positivo, questão de poucos dias, o meio ganhou coloração verde forte e visualmente notava-se a formação de grúmulos sendo esses, células agrupadas de microalgas.

O resultado positivo referente ao crescimento da microalga, pode ter ocorrido em função de que a água de torneira possui vários minerais em sua composição que são de grande importância para o fortalecimento celular. Quanto ao cloro presente na água em função do tratamento realizado pela estação de tratamento, não mostrou nenhuma interferência negativa ao cultivo, já que na fórmula de Guillard, tem-se diversos reagentes que possuem cloretos em sua composição REDAELLI (2012).

Após aproximadamente 10 meses da alteração do meio de cultivo, viu-se necessário o aumento de volume do biorreator, pois as microalgas já estavam bem concentradas dentro dos 4 biorreatores com capacidade de 1000 ml cada. Esta situação foi observada pela coloração verde apresentar-se escura e pela retenção das

células na parede do frasco e na mangueira de aeração, conforme ilustrado na Figura 29.

Figura 29 - Alta concentração de microalga em que (a) pode ser notado com verde intenso e em (b) nota-se pela formação de grúmulos na mangueira de aeração.



Na imagem da esquerda possuímos um biorreator com alta concentração de microalga e na figura da direita, é possível visualizar a crosta que se formou com o passar do tempo.

Considerando esta questão, foi feito um *upgrade* no sistema de cultivo, em que a capacidade de 4000 ml passou para 10000 ml, através de dois biorreatores de 5000 ml cada, de acordo com a Figura 30.

Figura 30 - Atualização do sistema de cultivo para 2 biorreatores de 5 litros.



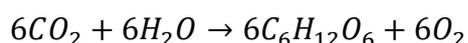
Importante ressaltar que esse aumento de volume da capacidade de produção, poderia ter sido realizado várias vezes durante o período da pesquisa, porém não foi possível realizá-lo, por motivo de não possuir infraestrutura suficiente.

O sistema de aeração é um processo de grande importância e tem dois objetivos, um é fornecer gás carbônico para as microalgas e o outro é fornecer energia cinética para as células, já que as mesmas são imóveis, e para que a fotossíntese seja realizada com maior eficiência, é necessário que as mesmas sempre estejam em movimento e possuem uma fonte de gás carbônico, por estas necessidades, a aeração fica ligada permanentemente. A aeração em culturas de microalgas é importante pois auxilia no seu crescimento impedindo que aglomerados celulares sejam gerados e assim consequentemente garante a incidência luminosa suficiente para todas as células, além de providenciar a captação de gás carbônico da atmosfera que por serem fotossintéticas absorvem e usam o gás carbônico como principal fonte de carbono, auxilia também na liberação de gás oxigênio do interior do meio, bem como a redução dos gradientes gasosos e de nutrientes presentes no meio (GALVÃO *et al.*, 2013; REIS, *et al.*, 2018)

Durante o cultivo, notou-se que a água presente no meio com o passar do tempo, começava a baixar seu nível, evidência esta comprova que a reação de fotossíntese está realmente acontecendo, visto que a água participa desta reação.

Segundo KLUGE *et al.*, (2015) o papel da água na reação de fotossíntese é doar elétrons para produzir oxigênio e também fixar o gás atmosférico, sendo que, durante esse processo, 6 moléculas de água são necessárias para que a reação possa acontecer e isso pode explicar parte da redução do volume dentro do biorreator, pois por não ser um sistema totalmente isolado, o processo de evaporação também pode ter ocorrido. A equação química (Equação 2) demonstra a reação de fotossíntese.

Equação 2 - Equação química da fotossíntese.



Para escolha do fotoperíodo, considerou-se o tempo de luz do sol, com o objetivo de se ter um ambiente de cultivo o mais próximo possível de um ambiente natural. Sendo este, aproximadamente das 6 horas da manhã até as 18 horas da tarde com a luz ativa e das 18 horas da tarde até as 6 horas da manhã com a luz desativada.

O período de luminosidade no processo de fotossíntese, é de suma importância pois a oxidação da água é mediada por uma fonte luminosa podendo ser a luz solar ou até mesmo luz artificial. Da luz que é absorvida, a luz vermelha produz um forte agente oxidante e um fraco agente redutor, e este conseqüentemente oxida a molécula de água que está presente na reação (KLUGE *et al.*, 2015).

4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO ALGAL

Utilizando o método de preparo de solução algal denominado como “a”, que inclui o processo de centrifugação, foi possível obter aproximadamente 2 gramas de biomassa a partir de 120 ml da solução de microalga, porém percebeu-se que uma certa quantidade de umidade ainda estava presente.

Com o método “b”, o processo de filtração a vácuo, foi necessário aproximadamente 311 ml de microalga para se obter 2 gramas de biomassa. Quanto à umidade, estava relativamente baixa, mas, em relação ao rendimento de biomassa da raspagem da microalga retida no microfiltro, não se apresentou muito eficiente. Na Figura 31 é possível visualizar a raspagem da biomassa do microfiltro.

Figura 31 - Remoção da biomassa retida no microfiltro após processo de filtração a vácuo.



Como é possível observar, parte da microalga fica retida no microfiltro, gerando perda de material na obtenção da biomassa, e além do material, tem-se a umidade que também ficou agregada ao microfiltro, visto que de aproximadamente 7,26 gramas pesadas de biomassa nos microfiltros, só foi possível obter 2 gramas para preparar a

solução, isso gera um aproveitamento de aproximadamente 28% de recuperação de material. Segue na Tabela 9 uma comparação dos dois métodos de preparo de solução.

Tabela 9 - Comparação dos dois processos de preparo de solução usados no estudo.

Método	Processo	Quantidade de volume utilizado de microalga (ml)	Biomassa obtida (g)	Umidade presente na biomassa
a	Centrifugação	120,0	2,0	Alta
b	Filtração a vácuo	311,0	2,0	Baixa

Observando a Tabela 9, nota-se que o método “b”, usou aproximadamente 2,6 vezes a mais de microalga em relação ao método “a”, para se obter a mesma quantidade de biomassa, entretanto, a umidade no método “a” é considerada alta, já no método “b”, a umidade presente é baixa.

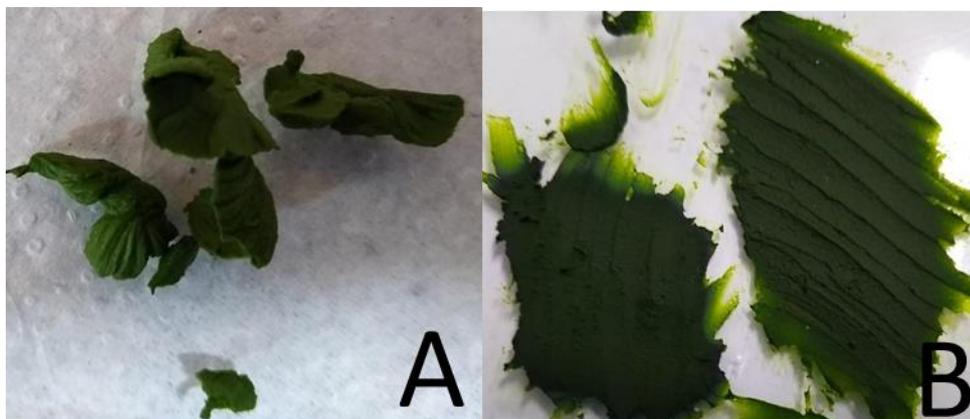
Na centrifugação só ocorre a separação das fases, sendo assim, é necessário que o sobrenadante seja removido manualmente com uma pipeta, etapa de baixa precisão e eficiência, podendo estar associada a diferentes tipos de erros. Já a filtração a vácuo, observou-se maior eficiência na remoção de água e separação da biomassa.

Para fins de apenas colheita da biomassa, a centrifugação apresenta-se como um ótimo processo, mas para fins mais analíticos, dos dois métodos testados, a filtração a vácuo mostra-se mais apropriada.

4.3.1 Características físicas da biomassa

Analisando as características físicas da biomassa, notou-se que é uma biomassa que se assemelha-se com alguns tipos de massas de modelar, sendo levemente pegajosa, sem cheiro, com coloração verde forte e quando espalhada nota-se algumas porosidades, como pode ser observado abaixo na Figura 32.

Figura 32 - Na figura (A) possui-se a biomassa removida de um microfiltro, e na figura (B), tem-se o material espalhado pelo relógio de vidro com uma espátula.



Na Figura A possui-se a biomassa removida de um microfiltro, e na figura B, tem-se o material espalhado pelo relógio de vidro com uma espátula.

4.4 TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DA REMOÇÃO DE FERRO

No presente estudo, o solvente utilizado foi água deionizada e o soluto foi o sulfato de ferro amoniacal nos grupos 1 e 2 e sulfato ferroso no grupo 3, ou seja, não tinha nenhum metal para provocar competição e considerou-se apenas soluções preparadas em laboratório como as amostras de água

O experimento constituiu-se da idealização de um sistema perfeito para a realização das análises, a fim de definir se a microalga em estudo possuía realmente a possibilidade de remover ferro de uma solução aquosa.

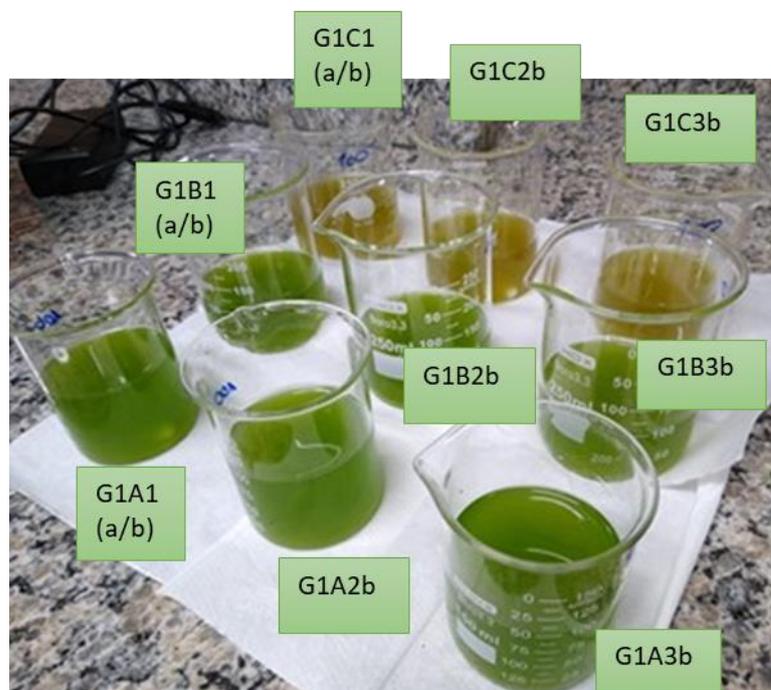
4.4.1 Grupo 1

O objetivo principal deste grupo de testes, foi basicamente demonstrar o comportamento da microalga em contato com soluções de concentrações brandas de ferro e adição do tampão 7 afim de verificar a possibilidade de ajuste de pH para a faixa ideal de cultivo da microalga.

Quando a solução de ferro entrou em contato com a microalga, a coloração verde da microalga foi mantida. Após algum tempo de contato, observou-se que a solução de concentração igual a 120 mg/l, já estava com coloração semelhante a

verde oliva, mas as demais mantiveram a tonalidade inicial, como pode ser observado na Figura 33.

Figura 33 - Testes do grupo 1 com diferentes concentrações de ferro já em contato com a microalga.



Nos béqueres apresentados à frente da Figura 33 encontram-se os seguintes testes, partindo da esquerda para a direita G1A1(a/b), G1A2b e G1A3b, sendo essa correspondente a concentração de 60 mg/L de Fe, já na segunda fileira, G1B1(a/b), G1B2b e G1B3b, são da concentração de 90 mg/L de Fe, e por fim na última fileira, possuímos a concentração de 120 mg/L de Fe, com seus respectivos testes G1C1(a/b), G1C2b e G1C3b.

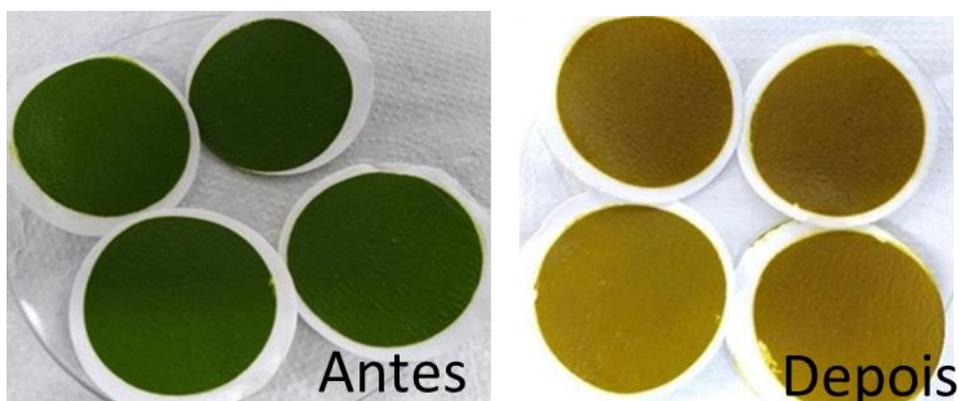
4.4.2 Grupo 2

No Grupo 2, considerando os resultados do Grupo 1, repetiu-se as análises da concentração de ferro de 120 mg/L, com o objetivo de confirmar os resultados encontrados, mas agora considerando o tempo de contato, sendo estes 30, 60 e 90 minutos.

A partir de 30 minutos de contato entre Fé e a microalga, todos os testes ficaram com coloração verde oliva, semelhante às soluções de concentração de 120 mg/L do

grupo 1. Na Figura 34 pode ser visualizado o estado da microalga antes da reação com o Fe e posterior a reação.

Figura 34 - Microalga em microfiltro, antes e depois do processo de remoção de ferro.



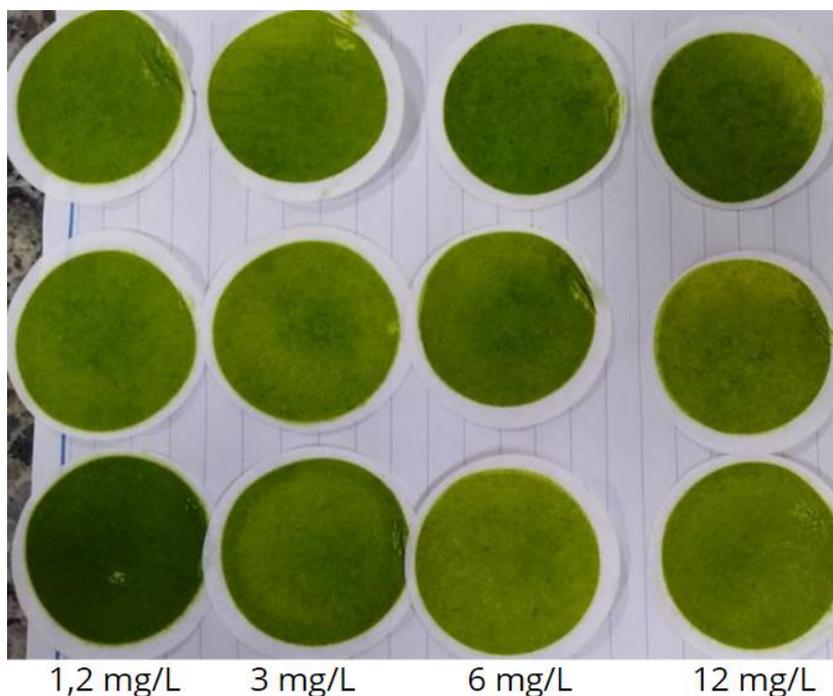
Na Figura 34 “Antes”, tem-se a microalga filtrada anterior ao processo para remover ferro, nota-se que a mesma está com coloração verde escuro, já na Figura 34 “Depois”, são células que já passaram pelo processo de remoção de íons de ferro, onde nota-se pela sua coloração que possui uma cor verde oliva, puxando para um tom de marrom, indicando que as células degradaram.

4.4.3 Grupo 3

As análises realizadas consideraram os resultados do Grupo 2, em relação ao fator do tempo, entretanto alterou-se as concentrações de ferro, sendo essas concentrações de 1,2 até 12 mg/L.

Neste grupo, a coloração da microalga não teve alteração, ao contrário do ocorrido nas análises G1C e grupo 2, sendo este um ponto positivo, onde indica que a *Chlorella* removeu ferro da solução e não veio a se deteriorar, gerando desta forma a possibilidade de reutilização da microalga após um período de fortalecimento em um biorreator. Na Figura 35 ilustra a microalga posterior ao processo de remoção de íons de ferro.

Figura 35 - Microalga em microfiltro posterior ao processo de remoção de ferro no grupo 3.



Como pode ser visualizado na Figura 35, as células retidas no microfiltro da imagem acima ainda estão com coloração verde, indicando que as mesmas ainda continuam vivas, ou pelo menos grande parte delas. Quanto à tonalidade, por aparentarem-se menos intensas, isso refere-se ao volume filtrado, ou seja, neste, o volume em ml filtrado por microfiltro foi menos que em relação a imagem esquerda (antes) da figura 25. Sendo assim, as células retidas foram raspadas do microfiltro e inseridas novamente no biorreator de microalga para o reaproveitamento,

4.5 ANÁLISE DE PH

No grupo 1 a média do valor de pH das soluções de sulfato de ferro amoniacal foi de 0,8, mostrando-se extremamente ácido, muito abaixo da faixa de pH ideal, entre 5 e 8, para a microalga. Já a solução algal, estava com pH de aproximadamente 7. Após o contato entre as soluções de Fe e de microalga, o pH manteve-se próximo a 0,8.

Quanto aos testes G1A3b, G1B3b e G1C3b, na qual foi adicionado 40 ml do tampão de pH 7. O objetivo de fazer este teste era aumentar o pH da solução visto

que o mesmo se encontrava abaixo de 1. Na Tabela 10 é possível verificar os valores de pH antes e depois da adição

Tabela 10 - Valores de pH da biorremediação do grupo 1.

Teste	Solução sem tampão	Solução com tampão
G1A3b	1,00	1,20
G1B3b	0,80	1,00
G1C3b	0,56	0,80

Como pode ser observado, com o tampão, só foi possível aumentar o pH em aproximadamente 0,2, não sendo muito eficiente nestas condições. Neste caso, uma solução básica mais forte poderia trazer resultados melhores.

No grupo 2 a média do valor de pH das soluções de sulfato de ferro amoniacal foi de 1, apresentando-se também com característica ácida, muito abaixo da faixa de pH ideal, entre 5 e 8, para a microalga. Já a solução algal, estava com pH de aproximadamente 6,8. Após o contato entre o Fe e a microalga, o pH se manteve próximo a 1.

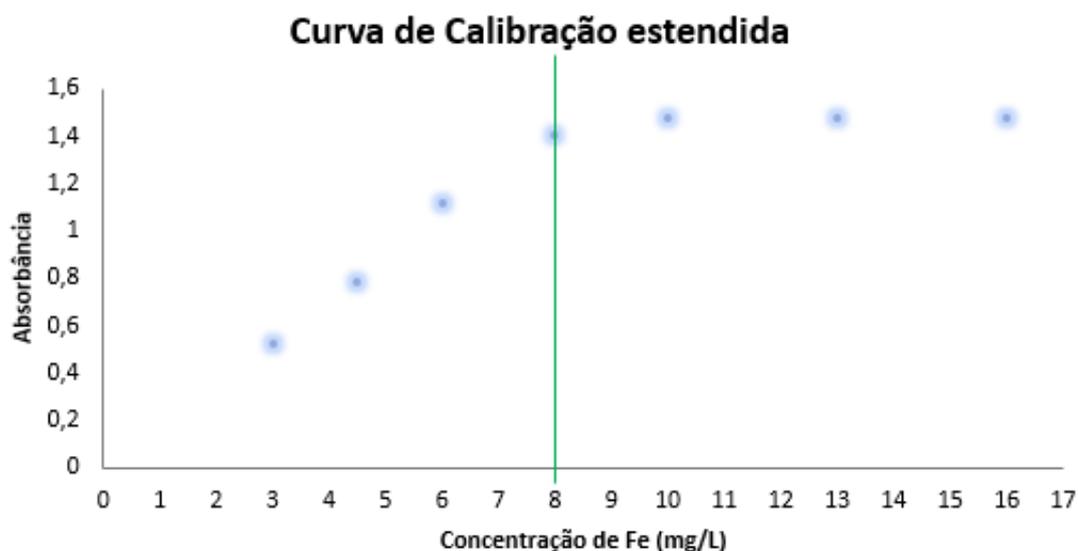
Por fim, no grupo 3, a média do valor de pH das soluções de sulfato ferroso foi de 3,3, mostrando-se mais próximo da faixa de pH ideal, entre 5 e 8, para a microalga. Já a solução algal, estava com pH de aproximadamente 6,8 e após o contato entre o Fe e a microalga, o pH se manteve, próximo a 3,3.

4.6 ANÁLISE DE FERRO

4.6.1 Curva de calibração

As metodologias usualmente utilizadas pelo laboratório de Química da FAHOR para análise de ferro em água (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*) incluem curvas de calibração de concentração de ferro, para concentrações menores de 0,02 até 2 mg/L. Neste sentido, realizou-se uma leitura de diferentes concentrações de Fe, conforme a Figura 36, para a avaliação da máxima concentração de ferro determinada com precisão no espectrofotômetro.

Figura 36 - Leituras espectrofotométricas para avaliação da concentração máxima de absorção de ferro.



Segundo os dados obtidos, é possível observar que a concentração máxima de ferro detectada no espectrofotômetro seria 8 mg/L. A partir desta, percebe-se que as leituras começam a possuir uma característica linear, ou seja, o equipamento não tem mais capacidade para identificar a quantidade de luz que foi absorvida na amostra.

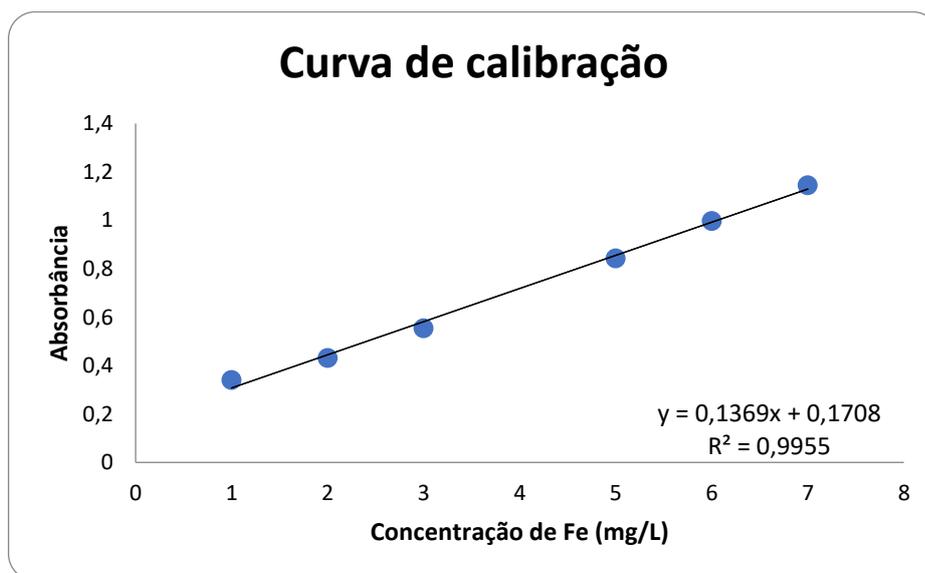
Segundo a Lei de *Lambert-Beer* a intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente. Considerando este resultado, foi possível aumentar as concentrações dos pontos da curva de calibração e assim obter uma maior faixa de análise. A Figura 37 ilustra as soluções de ferro usadas para criação da curva de calibração.

Figura 37 - Soluções de ferro para a curva de calibração.



Esta curva de calibração abrange um o intervalo de leitura do equipamento para concentração de ferro, de 1 mg/L até 8 mg/L, com intervalo entre os pontos de 1 mg/L, sendo assim, possuímos uma curva com 8 pontos. A Figura 38 ilustra a curva de calibração de Fe obtida a partir da concentração de ferro nas soluções e absorbância obtida em cada ponto.

Figura 38 - Curva de calibração da solução de ferro.



Observando-se os pontos da curva, os pontos 4 e 8 foram removidos da curva, pois estavam fora dela. A curva que foi utilizada ficou então com 6 pontos, com a equação da reta igual a $Y = 0,1369 x + 0,1708$.

4.6.2 Grupo 1

Após 24 horas desde o início do experimento, foi realizada a primeira análise de teor de Fe nos testes G1A1(a/b), G1B1(a/b) e G1C1(a/b). Quanto à leitura dos testes no equipamento, constatou-se, que o material a ser lido, após o preparo para a análise, necessita ficar aproximadamente 24 horas em repouso para estabilização do resultado.

Sabe-se disso, pois leituras foram feitas nos testes citados acima logo após o preparo para a análise até 72 horas depois e o resultado se manteve constante após 24 horas. Nesse período de estabilização necessário, acredita-se ser interferência de algum composto que está presente no meio.

Análises de teor de ferro podem ser também analisadas qualitativamente pela tonalidade da sua coloração característica, por exemplo, quanto mais forte for o tom, indica que se possui mais íons de ferro na solução em comparação a solução que possui uma cor menos intensa.

Quando comparados os dois métodos de preparo de amostra “a” e “b”, observa-se que o processo de filtração ficou com coloração mais clara em relação à centrifugação. Isso pode ter ocorrido em função de que o método “a” ainda estar contaminado com microalgas.

Observou-se também que o teste G1C1(a/b) com concentração de 120 mg/L, apresentou coloração mais clara em comparação com o G1A1(a/b) e G1B1(a/b), indicando que houve mais remoção de ferro em relação aos demais. Pode ser confirmado pelos dados numéricos apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Biorremediação do ferro após 24 horas do grupo 1.

Teste	Concentração Centrifugado T = 0h (mg/L)	Concentração Centrifugado T = 24h (mg/L)	Concentração Filtrado T = 0h (mg/L)	Concentração Filtrado T = 24h (mg/L)
G1A1(a/b)	7,09	7,39	6,45	6,80
G1B1(a/b)	2,66	4,98	0,98	3,58
G1C1(a/b)	0,94	4,12	---	2,00

Como pode ser observado na tabela acima, os dados gerados no mesmo dia da leitura não podem ser utilizados, mas após um dia de descanso das soluções preparadas, houve estabilização do teor de ferro contido no teste.

Então, usando como referência o tempo T=24h, o teste G1A1a de 60 mg/L, obteve-se uma concentração de 7,39 mg/L, removendo aproximadamente 87,69% de ferro da solução e para 90 (G1B1a) e 120 mg/L (G1C1a) foram 94,47% e 96,57% de remoção respectivamente.

Já para os testes G1A1b, G1B1b e G1C1b, suas respectivas remoções de Fe foram 88,67%, 96,03% e 98,34%. Observa-se que a metodologia utilizando filtração, indicou resultados mais eficientes em relação a metodologia por centrifugação. Entretanto, podemos considerar que, no método de centrifugação, o sobrenadante pode ter sido retirado com alguma partícula de microalga, podendo interferir nos resultados.

Para os testes G1A2b, G12b e G1C2b, a análise de teor de Fe foi realizada após 48 horas desde o início dos testes. Na Tabela 12 pode-se visualizar os dados das suas respectivas concentrações de Fe ainda remanescentes na solução após 24 horas de descanso pós preparo para a análise

Tabela 12 - Biorremediação do ferro após 48 horas do grupo 1.

Teste	Concentração Filtrado T = 24h (mg/L)
G1A2b	6.91
G1B2b	3,81
G1C2b	4.51

Comparando os resultados desta análise com a análise anterior, percebe-se que as concentrações dos testes G1A2b com o G1A1b e o G1B2b com o G1B1b, praticamente não obtiveram alteração, ou seja, não sendo necessário deixar em contato a microalga e Fe por mais de 24 horas.

Porém, quando G1C2b e G1C1b são analisados, nota-se que houve um aumento da concentração de aproximadamente 2,5 mg/L de Fe. Com este caso, levanta-se a hipótese de que a partir de certo período, a microalga começa a liberar íons de Fe para o sistema que só passaram pelo primeiro processo do mecanismo, ou seja, aqueles que ficaram apenas retidos na superfície.

Por fim quanto aos testes G1A3b, G1B3b e G1C3b, a solução tampão usada alterou completamente a leitura do espectrofotômetro sobre os testes, gerando valores de absorbâncias muito acima em relação aos testes G1A2b, G1B2b e G1C2b.

4.6.3 Grupo 2

Estes testes foram realizados em apenas uma concentração, sendo esta igual a 120 mg/L e a concentração de ferro foi analisada em função do tempo, em que foi retirado uma alíquota para análise a cada 30 minutos e ao final de 90 minutos, conforme Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados da biorremediação do grupo 2.

Período	T= 30 min	T = 60 min	T = 90 min
Preparo para análise	b	b	b
Replicata	1	2	3
G2A	3,31 mg/L	2,33 mg/L	2,46 mg/L
G2B	3,00 mg/L	1,92 mg/L	3,98 mg/L
G2C	4,45 mg/L	1,78 mg/L	---

Nos testes G2A1b e G2B1b, nota-se que apresentam resultados semelhantes com média de concentração aproximadamente igual a 3,15 mg/l. Quanto ao teste G2C1b em que a análise indicou teor de Fe igual a 4,45 mg/L, após o preparo para a leitura no equipamento, apresentou características de coloração amarelada, sendo o mesmo caso para G2A3b e para o G2B3b, que apresentaram coloração salmão.

O surgimento de coloração, sugere que ocorreu algum tipo de contaminação no processo, o que acaba inviabilizando estes dados. Já os testes G2A1 e G2B1 e as análises dos testes G2A2b, G2B2b e G2C2b, apresentaram característica cristalina.

Os testes que ficaram um período de 60 minutos, indicam uma média de concentração de Fe próximo a 2 mg/L, em que foi possível obter o mesmo resultado no teste G1C1b. Entretanto, comparando os testes de 30 minutos com o de 60 minutos, o teor de Fe reduziu apenas 1 mg/L aproximadamente, ou seja, a partir de 30 minutos, observa-se pouca alteração na quantidade de ferro removida

Podemos verificar uma semelhança de coloração na comparação visual dos testes G2A2b, G2B2b e G2C2b com o ponto de 2 mg/L da curva de calibração na Figura 39. Na imagem (A), estão os 3 testes mencionados acima (G2A2b, G2B2b e G2C2b) e na imagem (B), está o ponto de 2 mg/L da curva de calibração. Nota-se que a coloração entre as imagens é semelhante, considerando leve alteração na iluminação do ambiente que interfere diretamente na tonalidade da cor da solução.

Figura 39 - Comparação visual de coloração das análises do grupo 2 com um ponto da curva de calibração.



4.6.4 Grupo 3

Neste grupo as concentrações de ferro usadas, foram mais baixas, sendo estas de 1,2, 3, 6 e 12 mg/L de ferro, a fim de simular um ambiente mais próximo da realidade e desta vez usando sulfato ferroso para o experimento e não mais o sulfato ferroso amoniacal. Na Tabela 14 pode ser visualizado os resultados encontrados após a análise.

Tabela 14 - Resultado da biorremediação do grupo 3.

	Concentração	T= 30 min	T = 60 min	T = 90 min
Preparo de análise		b	b	b
Replicata		1	2	3
G3A	1,20 mg/L	<LQ	<LQ	<LQ
G3B	3,00 mg/L	<LQ	<LQ	<LQ
G3C	6,00 mg/L	<LQ	<LQ	<LQ
G3D	12,00 mg/L	3,21 mg/L	2,82 mg/L	2,00 mg/L

De acordo com os dados obtidos nas análises, nota-se que em concentrações inferiores a aproximadamente 6 mg/L, o teor de ferro na solução reduz para menos de 1 mg/L, já que o limite de quantificação é 1 mg/L. Já na concentração de 12 mg/L de

ferro, a microalga removeu aproximadamente 10 mg/L de ferro da solução, restando apenas 2 mg/L.

Entretanto, levando em consideração o tempo de contato do G3D, em apenas 30 minutos foi removido aproximadamente 73% de ferro da solução e após 1 hora a remoção foi de 83,3%, ou seja, aumentou apenas 10% dentro de 1 hora de contato, desta forma, pode-se definir que um tempo de contato maior que 30 minutos torna o procedimento não necessário.

Sendo assim, encontrou-se que teores de ferro inferiores a aproximadamente 6 mg/L podem ser reduzidos para menos de 1 mg/L. Segundo PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021, concentrações de ferro de até 2,4 mg/L podem ser liberadas para a natureza, desde que o ferro esteja complexado com produtos químicos comprovadamente de baixo risco a saúde, caso contrário o teor máximo que pode ser liberado para o meio ambiente é de 0,3 mg/L.

Desta forma, com os resultados atuais, não poderíamos estabelecer que a solução de ferro que passou pelo processo de remoção por meio da microalga, poderia ser liberada diretamente para a natureza, pois o limite de detecção é de 1 mg/L, sendo assim dever-se-ia construir uma nova curva de calibração de 0 até 1 mg/L de ferro para análise. Mas, de forma geral pode-se definir que a microalga *Chlorella vulgaris* é efetiva na remoção de ferro de soluções aquosas

4.6.5 Possíveis interferentes

Quanto a interferentes, acredita-se que no grupo 1 e 2 por ter sido utilizado a solução estoque de ferro da curva de calibração, tinha-se vários compostos que poderiam estar interferindo nas análises, podendo ser o permanganato de potássio, amônio presente no sulfato ferroso amoniacal, os ácidos adicionados, entre outras substâncias, pois o resultado encontrado para a concentração de 120 mg/L foi o mesmo resultado encontrado para o teor de 12 mg/L no grupo 3, grupo este que foi somente diluído sulfato ferroso em água, ou seja, não continha outros compostos presentes no meio como no grupo 1 e 2.

5 CONCLUSÕES

A hipótese de que alguns metais pesados possuem a função de nutriente para a microalga ajudando na sua reprodução celular, por conta disso ela pode ser eficiente na remoção dos metais pesados de soluções aquosas pôde ser confirmada já que na fórmula de Guillard tem-se por exemplo o cloreto de ferro III entre outros metais.

A remoção de Fe de solução aquosa, mostrou-se ser eficiente, sendo que, por meio de várias experiências utilizando concentrações distintas, foi possível observar que o teor de ferro realmente havia reduzido. Por meio de pesquisas sobre remoção de íons de ferro de soluções aquosas a partir da microalga *Chlorella vulgaris*, entendeu-se que o mecanismo de remoção de metais pesados usando esta microalga, passa por dois processos, um sendo a etapa rápida, onde o metal é apenas adsorvido na parede celular, e outra etapa, conhecida como a etapa lenta, em que o metal é absorvido para o interior da célula.

Quanto a sua viabilidade, apresentou-se ser promissora, a começar pelo custo de manutenção do sistema de cultivo ser baixo, e apesar de controle de qualidade do cultivo não ser um objetivo e as soluções de ferro usadas nas análises possuírem um pH abaixo da faixa ideal, as microalgas conseguiram remover uma ótima porcentagem do teor de ferro da solução, com uma faixa entre 73 a 98% aproximadamente, entretanto os resultados não atenderam as especificações da PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021, para o descarte de Fe no meio ambiente.

Para estudos futuros, pode-se propor um estudo mais aprofundado sobre os possíveis interferentes identificados deste estudo e outros, realizar análises com vários metais a fim de avaliar o comportamento da microalga e a competição dos metais no processo de remoção, realizar análises em amostras reais, buscar otimizar o processo tanto de cultivo quanto de remoção dos metais com o objetivo de reduzir custos e aumentar a eficiência, realizar um planejamento estatístico para os testes e análises a serem realizados, estudar sobre a vida útil e limite de saturação de sorção da microalga, verificar a destinação correta de uma biomassa contaminada com metal pesado e por fim, o estudo de implementação deste método estudado em uma ETE.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, Salman H.; ISMAIL, Ibrahim M.; MOSTAFA, Tarek M.; SULAYMON, Abbas H. Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*, [s. l.], v. 3, p. 74-102, 2014.

ABDI, Omran; KAZEMI, Mosstafa. A review study of biosorption of heavy metals and comparison between different biosorbents. *Abdi and Kazemi*, [s. l.], p. 1386-1399, 2015.

AHMAD, Ashfaq; BHAT, A. H.; BUANG, Azizul. Enhanced biosorption of Transition metals by living *Chlorella vulgaris* immobilized in Ca-alginate beads. *Environmental Technology*, [s. l.], 2018.

ÅKERSTRÖM, Anette M.; MORTENSEN, Leiv M.; RUSTEN, Bjørn; GISLERØD, Hans Ragnar. Biomass production and removal of ammonium and phosphate by *Chlorella* sp. in sludge liquor at natural light and different levels of temperature control. *SpringerPlus*, [s. l.], 2016.

ALLOWAY, Brian J. Heavy Metals in Soils. *Environmental Pollution*, [s. l.], v. 22, 2013.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; XUECHENG, ZHANG. Heavy Metal Bioaccumulation and Toxicity with Special Reference to Microalgae. *J. Ocean Univ. Chin.*, [s. l.], v. 7, p. 60-64, 2008.

ARUTSELVAN, Chithirai; SEENIVASAN, Harish kumar; OSCAR, Felix Lewis; RAMYA, G.; CHI, Nguyen Thuy Lan; PUGAZHENDHI, Arivalagan; THAJUDDIN, Nooruddin. Review on wastewater treatment by microalgae in different cultivation systems and its importance in biodiesel production. *Fuel*, [s. l.], v. 324, p. 124623, 2022.

BABEL, Sandhya; KURNIAWAN, Tonni Agustiono. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], p. 219–243, 2003.

BARROS, K. K. S. Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, Brasil, 2010. 2010. Dissertação (Mestre) - BARROS, K. K. S. Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, Brasil, 2010., [s. l.], 2010.

BAUMGARTEN, Maria da Graça Zepka; PAIVA, Mariele Lopes de; RODRIGUES, Horácio Rodrigo Souza. KIT ANALÍTICO SIMPLIFICADO: UMA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO MASSIVA DA QUALIDADE DA ÁGUA SUBTERRÂNEA. *Águas Subterrâneas*, [s. l.], p. 95-105, 2014.

BECERRA, Gladys; MENOLASINA, Sabino. Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography of Vitamin E in Pharmaceutical Preparations. *Journal of High Resolution Chromatography*, [s. l.], p. 300-302, 1999.

BILAL, Muhammad; RASHEED, Tahir; SOSA-HERNÁNDEZ, Juan Eduardo; RAZA, Ali; NABEEL, Faran; IQBAL, Hafiz M. N. Biosorption: An Interplay between Marine Algae and Potentially Toxic Elements—A Review. *Marine drugs*, [s. l.], 2018.

BUGS, Leila Cristina; CUPERITINI, Patrícia Mara; WOLF, Taís Carla; TREICHEL, Helen. USO DA BIOMASSA DE ALGAS COMO BIOSORVENTE PARA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS: UMA REVISÃO. *Revista CIATEC-UPF*, [s. l.], v. 10, 2018.

CHA, KWANG HYUN; KOO, SONG YI; LEE, DONG-UN. Antiproliferative Effects of Carotenoids Extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on Human Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*, [s. l.], p. 10521–10526, 2008.

CHA, KWANG HYUN; LEE, HEE JU; KOO, SONG YI; SONG, DAE-GEUN; LEE, DONG-UN; PAN, CHEOL-HO. Optimization of Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids and Chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, [s. l.], p. 793–797, 2010.

CHEN, Wei; SOMMERFELD, Milton; HU, Qiang. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 102, p. 135-141, 2011.

CHEN, Zhen; MA, Wei; HAN, Mei. Biosorption of nickel and copper onto treated alga (*Undaria pinnatifida*): Application of isotherm and kinetic models. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], p. 327-333, 2008.

CHENG, Ya-Ling; JUANG, Yu-Chuan; LIAO, Guan-Yu; HO, Shih-Hsin; YEH, Kuei-Ling; CHEN, Chun-Yen; CHANG, Jo-Shu; LIU, Jhy-Chern; LEE, Duu-Jong. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 101, p. 9092-9096, 2010.

CHEW, Kit Wayne; YAP, Jing Ying; SHOW, Pau Loke; SUAN, Ng Hui; JUAN, Joon Ching; LING, Tau Chuan; LEE, Duu-Jong; CHANG, Jo-Shu. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 229, p. 53-62, 2017.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, [s. l.], v. 25, p. 294-306, 2007.

CONVERTI, Attilio; CASAZZA, Alessandro A.; ORTIZ, Erika Y.; PEREGO, Patrizia; BORGHI, Marco Del. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, [s. l.], v. 48, p. 1146-1151,

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, [S. l.], 2006.

DERNER, Roberto Bianchini. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira*

fluviatilis, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Orientador: Roseane Fett. 2006. Tese (Pós - graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis., [S. l.], 2006.

DOS SANTOS, FRANCISCA MARIA LOUREIRO FERREIRA. CRESCIMENTO DE MICROALGAS E REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM AMBIENTES POLUÍDOS COM METAIS PESADOS. Orientador: José Carlos Magalhães Pires. 2017. Dissertação (Mestre) - Faculdade de Engenharia Universidade do Porto, [S. l.], 2017.

DWIVEDI, Seema. Bioremediation of Heavy Metal by Algae: Current and Future Perspective. Journal of Advanced Laboratory Research in Biology, [s. l.], v. 3, 2012.

ERTO, A.; GIRALDO, L.; LANCIA, A.; MORENO-PIRAJÁN, J. C. A Comparison Between a Low-Cost Sorbent and an Activated Carbon for the Adsorption of Heavy Metals from Water. Water Air Soil Pollut, [s. l.], 2013.

ESLAMI, Akbar; NEMATI, Reza. Removal of Heavy metal from aqueous environments using Bioremediation technology – review. Journal of Health in the Field, [s. l.], v. 3, 2017.

FERNÁNDEZ-SEVILLA, José M.; FERNÁNDEZ , F. Gabriel Acién; GRIMA, Emilio Molina. Obtaining Lutein-Rich Extract from Microalgal Biomass at Preparative Scale. Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae, [s. l.], v. 892, 2012.

FORTES, MARIANA MONTEIRO. FOTOBIORREACTORES PARA O CULTIVO DE MICROALGAS DESTINADAS À PRODUÇÃO DE BIODIESEL. Orientador: Dr. Donato A. Gomes Aranda. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, [S. l.], 2015.

FRAPPART, Matthieu; MASSÉ , Anthony; JAFFRIN, Michel Y.; PRUVOST, Jérémy; JAOUEN, Pascal. Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. Desalination, [s. l.], v. 265, p. 279-283, 2011.

FU, Fenglian; WANG, Qi. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, [s. l.], p. 407-418, 2011.

GALVÃO, Rosana M.; SANTANA, Tarlen S.FONTES, Cristiano H. O.; SALES, Emerson A. Modeling of Biomass Production of *Haematococcus pluvialis*. *Scientific research Open Access*, [s. l.], v. 4, 2013.

GONDI , Rashmi; KAVITHA, S.; KANNAH, R. Yukesh; KUMAR , Gopalakrishnan; BANU, J. Rajesh. Wastewater based microalgae valorization for biofuel and value-added products recovery. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, [s. l.], v. 53, 2022.

HALLMANN, Armin. Algae Biotechnology – Green Cell-Factories on the Rise. *Current Biotechnology*, [s. l.], v. 9, p. 389-415, 2015.

HANAN, MK. Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *African Journal of Biotechnology*, [s. l.], v. 10, 2013.

HO, Shih-Hsin; YE, Xiaoting; HASUNUMA, Tomohisa; CHANG, Jo-Shu; KONDO, Akihiko. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae – A critical review. *Biotechnology Advances*, [s. l.], v. 32, p. 1448-1459, 2014.

HU, Qiang. Environmental Effects on Cell Composition. *Handbook of Microalgal Culture*, [s. l.], 2013.

IGBERASE, E.; OFOMAJA, A.; OSIFO, P.O. Enhanced heavy metal ions adsorption by 4-aminobenzoic acid grafted on chitosan/epichlorohydrin composite: Kinetics, isotherms, thermodynamics and desorption studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 123, p. 664-676, 2018.

JANKOWSKA, Ewelina; SAHU , Ashish K.; OLESKOWICZ-POPIEL, Piotr. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s. l.], v. 75, 2017.

JORNAL TAMANDUÁ (2005),

KANG, So-Young; LEE, Jong-Un; MOON, Seung-Hyeon; KIM , Kyoung-Woong. Competitive adsorption characteristics of Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cr^{3+} by IRN-77 cation exchange resin in synthesized wastewater. *Chemosphere* 56, [s. l.], p. 141-147, 2004.

KHARKWAL, HARSHA; JOSHI, DD; PANTHARI, PREETI; PANT, MANISH KANT; KHARKWAL, AMIT C. Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. *Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, [s. l.], v. 5, 2012

KLUGE, R. A; TEZOTTO-ULIANA,, J. V.; DA SILVA, P. P. M. Aspectos Fisiológicos e Ambientais da Fotossíntese. *Revista Virtual Química*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 56-73, 2015

LEE, Duu-Jong; LIAO, Guan-Yu; CHANG, Yin-Ru; CHANG, Jo-Shu. Coagulation-membrane filtration of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 108, p. 184-189, 2012.

LI, Yanqun; HORSMAN, Mark; WU, Nan; LAN, Christopher Q.; DUBOIS-CALERO, Nathalie. ARTICLES: BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN. *Biofuels from Microalgae*, [s. l.], 2008.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. Ed. São Paulo: Rima, [s. l.], 2006.

MA, Chao; WEN, Hanquan; XING, Defeng; PEI, Xuanyuan; ZHU, Jiani; REN, Nanqi; LIU, Bingfeng. Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. *Biotechnol Biofuels*, [s. l.], 2017.

MANZOOR, Faezeh; KARBASSI, Abdolreza; GOLZARY, Abooli. Removal of Heavy Metal Contaminants from Wastewater by Using *Chlorella vulgaris* Beijerinck: A Review. *Current Environmental Engineering*, [s. l.], v. 6, 2019.

MARCELINO, Kelly Mendes; MELO, Aline Resmini; MARQUES, Carolina Resmini Melo; BROLESI, Tatiani Malgarise; CAMPOS, Débora De Pellegrin. REMOÇÃO DE FERRO EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS DE POÇOS TUBULARES EM UMA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DE ARROZ. *Revista vincci*, [s. l.], v. 2, 2017.

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C.; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MARTÍN, M.; GROSSMANN, I. E. On the synthesis of sustainable biorefineries. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, [s. l.], v. 52, p. 3044-3064, 2010.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s. l.], v. 14, p. 217-232, 2010.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s. l.], v. 14, p. 217-232, 2010.

MONTEIRO, Ivo José Azevedo. Estudo do efeito da salinidade e concentração de ferro no crescimento e conteúdo lipídico da estirpe de microalga CTP4. 2014. Dissertação (Mestre) - Universidade do Algarve, [S. l.], 2014.

MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos. CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOENERGIA, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE GERAÇÃO DISTRIBUIDA E ENERGIAS RENOVÁVEIS, [s. l.], 2010.

MORCELLI, A.V. Aplicação de tecnologias de extração de clorofilas e carotenoides de microalgas e uso da biomassa microalgal na adsorção de metais pesados. São Paulo, [s. l.], 2021.

MORRIS, Humberto J.; ALMARALES, Angel; CARRILLO, Olimpia; BERMÚDEZ, Rosa C. Utilisation of *Chlorellavulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 99, p. 7723-7729, 2008.

MORUZZI, Rodrigo Braga; REALI, Marco Antonio Penalva. OXIDAÇÃO E REMOÇÃO DE FERRO E MANGANÊS EM ÁGUAS PARA FINS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO OU INDUSTRIAL – UMA ABORDAGEM GERAL. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, [s. l.], v. 4, p. 331-336, 2012.

MUJTABA, Ghulam; LEE, Kisay. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Research*, [s. l.], v. 120, p. 174-184, 2017.

NEMCOVA , YVONNE; KALINA, TOMAs. Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Schweizerbart.sche Verlagsbuchhandlung*, [s. l.], p. 95-105, 2000.

NIDHEESH, P.V.; SINGH, T.S. Anantha. Arsenic removal by electrocoagulation process: Recent trends and removal mechanism. *Chemosphere*, [s. l.], v. 181, p. 418-432, 2017.

NURACHMAN, Zeily; H, Hartini; RAHMANIYAH , Wiwit Ridhani; KURNIA, Dewi; HIDAYAT, Rahmat; PRIJAMBOEDI , Bambang; SUENDO, Veinardi; RATNANINGSIH, Enny; PANGGABEAN , Lily Maria Goretty; NURBAITI, Santi. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Research*, [s. l.], v. 10, 2015.

OBAID, Shamsan S.; GAIKWAD, D. K.; SAYYED, M. I.; AL-RASHDI, Khader; PAWAR, P. P. Heavy metal ions removal from waste water by the natural zeolites. *Materials Today: Proceedings*, [s. l.], v. 5, p. 17930-17934, 2018.

PANAHI, Yunes; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari; SAHEBKAR, Amirhossein; HEIDARI, Hamid Reza. Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [s. l.], p. 182–194., 2019.

PANAHI, Yunes; PISHGOO, Bahram; JALALIAN, Hamid R.; MOHAMMADI, Elaheh; TAGHIPOUR, Hamid R.; SAHEBKAR, Amirhossein; ABOLHASANI, Ehsan. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* as an adjunctive therapy for dyslipidemia: Results of a randomised open-label clinical trial. *Dietitians Association of Australia*, [s. l.], p. 13-19, 2012.

PARK, Kyoung C.; WHITNEY, Crystal E.G.; KOZERA, Catherine; O'LEARY, Stephen J.B.; MCGINN, Patrick J. Seasonal Isolation of Microalgae from Municipal Wastewater for Remediation and Biofuel Applications. *Journal of Applied Microbiology*, [s. l.], v. 119, p. 76-87, 2015.

PARRY NUTRACEUTICALS (2006).

PAULA, Márcio de. INIMIGO INVISÍVEL: METAIS PESADOS E A SAÚDE HUMANA. *Periódico Tchê Química*, [s. l.], v. 3, 2006.

PHYCOLOGY, Lee RE. *Phycology*. 4th ed. Cambridge. England; New York: Cambridge University Press, [s. l.], 2008.

P

IOTROWSKA-NICZYPORUK, Alicja; BAJGUZ, Andrzej; ZAMBRZYCKA, Elzbieta; GODLEWSKA- _ ZY1KIEWICZ, Beata. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, [s. l.], p. 52-65, 2012.

PITTMAN, Jon K.; DEAN, Andrew P.; OSUNDEKO, Olumayowa. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102, [s. l.], p. 17-25, 2011

POSTEN, Clemens. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.*, [s. l.], v. 9, p. 165–177, 2009.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, [s. l.], p. 287–293, 2001.

RAI, Prabhat Kumar. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. *International Journal of Phytoremediation*, [s. l.], p. 133-160, 2008.

RAMÍREZ, M. E.; VÉLEZ, Y. H.; RENDÓN, L.; ALZATE, E. Potential of microalgae in the bioremediation of water with chloride content. *Brazilian Journal of Biology*, [s. l.], p. 472-476, 2017.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 6a. ed. Coord. Trad. J.E.Kraus., [s. l.], p. 906, 2001.

REDAELLI, Cristiane. Estudo da produção de lipídeos e carotenóides por *Chlorella minutissima* em fotobiorreator. 2012. Dissertação (Mestre) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [S. l.], 2012.

REIS, Daiane Felix; JUNIOR, Francisco Roberto da Silva Machado; ORES, Joana da Costa; LEMES, Ailton Cesar; BURKER, Carlos Andre Veiga; BURKERT, Janaina Fernandes de Medeiros. Influência do CO₂ no Crescimento de *Haematococcus Pluvialis* e na Produção de Carotenóides. *UNICIÊNCIAS*, [s. l.], v. 22, p. 25-29, 2018.

RICARDI, Alexandre de Moraes. Análise dos efeitos das variáveis de processo na produção de biomassa e nos parâmetros reológicos da microalga *Chlorella*

minutíssima cultivada em reator Raceway para produção de biocombu. Master's Dissertation, [s. l.], 2020.

RICHMOND, Amos. Handbook of Microalgal Culture. Handbook of Microalgal Culture, [s. l.], 2004.

RODRIGUES, LAUANA. APLICAÇÕES DA TECNOLOGIA DE CULTIVO DE MICROALGAS VERDES COM VISTAS À BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES E PRODUÇÃO DE BIOATIVOS. Orientador: Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros. 2022. Monografia (FACULDADE) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, [S. l.], 2022.

SAFI, Carl; ZEBIB, Bachar; MERAH, Othmane; PONTALIER, Pierre-Yves; VACA-GARCIA, Carlos. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, [s. l.], v. 35, p. 265-278, 2014.

SALAMA, El-Sayed; KURADE, Mayur B.; ABOU-SHANAB, Reda A.I.; EL-DALATONY, Marwa M.; YANG, Il-Seung; MIN, Booki; JEONA, Byong-Hun. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. Renewable and Sustainable Energy Reviews, [s. l.], v. 79, p. 1189-1211, 2017.

SANTOS, L.; CALAZANS, N.; MARINHO, Y.; SANTOS, A.; NASCIMENTO, R.; VASCONCELOS, R.; DANTAS, D.; GÁLVEZ, A. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando a sua inserção na matéria prima do biodiesel. Comunicação apresentada na Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, [s. l.], 2011.

SANTOS, L.; CALAZANS, N.; MARINHO, Y.; SANTOS, A.; NASCIMENTO, R.; VASCONCELOS, R.; DANTAS, D.; GÁLVEZ, A. Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) visando produção de biodiesel. Comunicação apresentada na Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, [s. l.], 2011.

SHANKAR, Shiv; RATNAKAR, Arpna; SINGH, Ratnakar; RAWAT, Shalu. Environmental Contamination, Toxicity Profile, and Bioremediation Approaches for Detoxification of Paper Mill Wastewater. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*, [s. l.], p. 181-206, 2020.

SHEEHAN, John; DUNAHAY, Terri; BENEMANN, John; ROESSLER, Paul. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program. *Biodiesel from Algae*, [s. l.], 1998.

SOARES, Marcio Roberto. Coeficiente de distribuição (Kd) de metais pesados em solos do estado de são paulo. Orientador: Luís Reynaldo Ferraccíu Aleonni. 2004. Tese (Doutorado) - Escola superior de agricultura, [S. l.], 2004.

SOBRINHO, AMARAL, N. M. B.; L.M., COSTA; C, DE OLIVEIRA; A. C. X, VELLOSO. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. *Revista brasileira de ciência do solo*, [s. l.], v. 16, p. 271-276, 1992.

TANK, Tech Trade Initiative. Recirculating aquaculture system ras-2. 2019. fotografia.

TEH, Chee Yang; BUDIMAN, Pretty Mori; SHAK, Katrina Pui Yee; WU, Ta Yeong. Recent advancement of coagulation-flocculation and its application in wastewater treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, [s. l.], p. 4363-4389, 2016.

TOKUŞ, OGLU, Ö.; ÜNAL, M.K. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Food Chemistry and Toxicology*, [s. l.], 2003.

UBANDO, Aristotle T.; AFRICA, Aaron Don M.; MANQUIZ-REDILLAS, Marla C.; CULABA, Alvin B.; CHANG, Jo-Shu. Microalgal biosorption of heavy metals: A comprehensive bibliometric review. *Journal of Hazardous Materials*, [s. l.], 2020.

VANDAMME, Dries; FOUBERT, Imogen; FRAEYE, Ilse; MEESSCHAERT, Boudewijn; MUYLAERT, Koenraad. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 105, p. 114-119, 2012.

VARDHAN, Kilaru Harsha; KUMAR, Ponnusamy Senthil; PANDA, Rames C. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*, [s. l.], v. 290, 2019.

WANG, Jianlong; CHEN, Can. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, [s. l.], p. 195–226, 2009.

WU, Zechen; ZHU, Yi; HUANG, Weiya; ZHANG, Chengwu; LI, Tao; ZHANG, Yuanming; LI, Aifen. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 110, p. 496-502, 2012.

XU, Ling; WEATHERS, Pamela J.; XIONG, Xue-Rong; LIU, Chun-Zhao. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.*, [s. l.], v. 9, p. 178–189, 2009.

YEH, Kuei-Ling; CHANG, Jo-Shu. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, [s. l.], v. 105, p. 120-127, 2012.

YUVRAJ, A.; VIDYARTHI, Ambarish Sharan; SINGH, Jeeoot. Enhancement of *Chlorella vulgaris* cell density: Shake flask and bench-top photobioreactor studies to identify and control limiting factor. *Korean J. Chem. Eng.*, [s. l.], v. 33, ed. 8, p. 2398, 2016.

ZABOCHNICKA-ŚWIĄTEK, M.; RYGAŁA, A. The effect of biomass (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus armatus*) concentrations on Zn²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺ biosorption from zinc smelting wastewater. *Engineering & Environmental*, [s. l.], v. 20, ed. 2, p. 211–220, 2017.

ZENDRON, R. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE E DOENÇAS NEUROLÓGICAS RELACIONADAS À INTOXICAÇÃO POR METAIS PESADOS. REVISTA BRASILEIRA DE NUTRIÇÃO FUNCIONAL, [s. l.], v. 29, ed. 64, 2015.

ZHONGMIN, Jia; SIYUE, Li; LI, Wang. Assessment of soil heavy metals for eco-environment and human health in a rapidly urbanization area of the upper Yangtze Basin. Scientific reports, [s. l.], 2018.