

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
BACHAREL EM ENGENHARIA QUÍMICA**

FELIPE DE ALBUQUERQUE SANTOS

EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA DE EFLUENTE SECUNDÁRIO COM MICROALGA *Chlorella vulgaris* IMOBILIZADA EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PONTA GROSSA
2020**

FELIPE DE ALBUQUERQUE SANTOS

EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA DE EFLUENTE SECUNDÁRIO COM MICROALGA *Chlorella vulgaris* IMOBILIZADA EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Cristine Novak Sydney

PONTA GROSSA

2020





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa
Departamento de Engenharia Química



TERMO DE APROVAÇÃO

EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE NITRATO E AMÔNIA DE EFLUENTE SECUNDÁRIO COM MICROALGA *Chlorella vulgaris* IMOBILIZADA EM ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

por

Felipe de Albuquerque Santos

Monografia apresentada no dia 10 de Novembro de 2020 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Alessandra Cristine Novak Sydney
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
Orientadora

Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

“O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e resiliência.

Agradeço à minha família por todo apoio e incentivo.

Agradeço a orientação da Profa. Dra. Alessandra Cristine Novak Sydney pela ajuda e pela disponibilização do seu tempo.

Agradeço aos membros da banca, Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli e Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney pelas colocações e adições ao trabalho.

Obrigado a todos os demais que participaram de alguma forma do trabalho!

RESUMO

O tratamento de esgotos no Brasil tem, na maioria das vezes, quatro etapas: preliminar, primária, secundária e terciária. Sabe-se que os esgotos domésticos lançados sem tratamento adequado em águas pode causar eutrofização, sendo o nitrogênio um dos responsáveis por tal processo. Este trabalho utiliza a microalga *Chlorella vulgaris* para remover nitrogênio na forma de nitrato e amônia de esgotos domésticos secundários. Neste sentido, o presente trabalho objetiva avaliar a eficiência de remoção de nitrato e amônia de esgoto doméstico coletado da Companhia de Saneamento do Paraná, localizada em Ponta Grossa, utilizando *C. vulgaris* imobilizada em esferas de alginato de cálcio. A metodologia utilizada foi a técnica de encapsulamento, na qual um biopolímero é misturado ao microrganismo e gotejado sobre uma solução de cloreto de cálcio. A técnica de imobilização é utilizada para facilitar a recuperação de células e gerar proteção contra estresse ambiental do meio de cultivo. As esferas com *C. vulgaris* são mantidas em frascos Erlenmeyer, sob iluminação artificial e controle de temperatura, a fim de aumentar a eficiência de remoção dos nutrientes. A microalga *C. vulgaris* foi capaz de remover 85,19% de amônia e 30,95% de nitrato do efluente em questão. Houve aumento de pH de 7,05 para 9,25 devido a atividade fotossintética da microalga. Com os resultados do trabalho, pode-se reduzir a carga nitrogenada no processo de tratamento de efluentes utilizando microrganismos. Assim, podem ser realizados estudos futuros da aplicação da biomassa gerada, contribuindo para o tratamento de efluentes e aumentando a renda com os produtos gerados.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Esgoto doméstico. Imobilização celular.

ABSTRACT

The treatment of sewage in Brazil has, in most cases, four stages: preliminary, primary, secondary and tertiary. It is known that domestic sewage without adequate treatment in water can cause eutrophication, with nitrogen being one of the responsible for this process. This work uses the microalgae *Chlorella vulgaris* to remove nitrogen in the form of nitrate and ammonia from secondary domestic sewage. In this sense, the present work aims to evaluate the efficiency of the removal of nitrate and ammonia from domestic sewage collected from the Sanitation Company of Paraná, located in Ponta Grossa, using *C. vulgaris* immobilized in calcium alginate spheres. The methodology used was the encapsulation technique, in which a biopolymer is mixed with the microorganism and dripped over a solution of calcium chloride. The immobilization technique is used to facilitate the recovery of cells and generate protection against environmental stress in the culture medium. Spheres with *C. vulgaris* are kept in Erlenmeyer flasks, under artificial lighting and temperature control, in order to increase the efficiency of nutrient removal. The microalgae *C. vulgaris* was able to remove 85.19% of ammonia and 30.95% of nitrate from the effluent in question. There was an increase in pH from 7.05 to 9.25 due to the photosynthetic activity of the microalgae. With the results of the work, it is possible to reduce the nitrogen load in the effluent treatment process using microorganisms. Thus, future studies of the application of the generated biomass can be carried out, contributing to the treatment of effluents and increasing the income with the generated products.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Domestic sewage. Cellular immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A. <i>Chroococcus turgidus</i> (Cyanophyceae). B. <i>Bathycoccus prasinos</i> (Chlorophyceae). C. <i>Sporochinales</i> (Phaeophyceae). D. <i>Erythrocladia sp.</i> (Rhodophyceae). E. <i>Cylindrotheca gracilis</i> (Bacillariophyceae).	14
Figura 2 – Estrutura esquemática de organelas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	16
Figura 3 – Representação da estrutura “caixa de ovos”	20
Figura 4. ETE Rio Verde.	28
Figura 5. RALF 1, localizado na ETE Rio Verde.	29
Figura 6. Fluxograma esquemático do processo de preparo dos ensaios 1, 2 e 3.	30
Figura 7. Amostra de efluente coletada do RALF 1.	31
Figura 8 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em MBM.	32
Figura 9 Centrífuga Excelsa modelo 280.	33
Figura 10 Turbidímetro AP 2000	35
Figura 11 Phmetro PHS-3E.	36
Figura 12 Espectrofotômetro digital VIS 325 a 1000nm V-M5.	37
Figura 13. Cultivo de 20mL de <i>Chlorella vulgaris</i> encapsulada em esferas de alginato de cálcio em 250mL de efluente secundário. b) Volume de 20mL de esferas de alginato de cálcio em 250mL de efluente secundário. c) Volume de 250mL efluente secundário.	38
Figura 14. Turbidez da Amostra 1.	40
Figura 15. Turbidez da Amostra 2.	40
Figura 16. Turbidez da Amostra 3.	41
Figura 17. Faixa de pH analisada diariamente para amostra 1.	43
Figura 18. Faixa de pH analisada diariamente para amostra 2.	43
Figura 19. Faixa de pH analisada diariamente para amostra 3.	44
Figura 20. Curva padrão de nitrato.	45
Figura 21. Remoção de Nitrato, amostra 1.	46
Figura 22. Remoção de Nitrato, amostra 2.	47
Figura 23. Remoção de Nitrato, amostra 3.	47

Figura 24. Nitrogênio amoniacal.....	48
--------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Carga orgânica de esgotos subdividida em regiões no Brasil, em 2017.....	21
Tabela 2 – Parâmetros mínimos para lançamento de efluentes de sistemas de tratamento de esgotos sanitários.	24
Tabela 3 – Resultado de parâmetros iniciais.....	38
Tabela 4 – Dados estatísticos de 50 esferas – Amostra 1.....	39
Tabela 5 – Dados estatísticos de 50 esferas – Amostra 2.....	39
Tabela 6 – Concentrações de soluções diluídas para curva padrão de nitrato.....	44
Tabela 7. Resultados finais compilados.....	49

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	American Public Health Association
ATP	Adenosina Trifosfato
ANA	Agência Nacional de Águas
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
MBM	Meio Bristol Modificado
PPM	Partes Por Milhão
RALF	Reator Anaeróbio de Lodo Fluidizado
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SS	Sólidos Sedimentáveis
UASB	Upflow Anaerobic Sludge Blanket

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO	11
1.2 OBJETIVOS	12
1.2.1 Objetivo geral.....	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 MICROALGAS	13
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.2 Imobilização celular	17
2.2.1 Adsorção	18
2.2.2 Ligação covalente.....	18
2.2.3 Envolvimento.....	18
2.3 ALGINATO	19
2.4 ESGOTO DOMÉSTICO	20
2.5 LEGISLAÇÃO RELATIVA AO LANÇAMENTO DE EFLUENTES.....	22
2.6 PROCESSO DE TRATAMENTO DE ESGOTOS DOMÉSTICOS.....	24
2.7 REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE ESGOTO DOMÉSTICO PELA <i>CHLORELLA VULGARIS</i> IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	25
2.8 NITROGÊNIO E SUAS FORMAS.....	26
2.9 ETE RIO VERDE E EFLUENTES.....	27
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 COLETA DA AMOSTRA DA ETE RIO VERDE.....	30
3.2 CULTIVO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	31

3.3 PREPARAÇÃO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM <i>CHLORELLA VULGARIS</i> IMOBILIZADA E ESFERAS DE CONTROLE.....	32
3.4 DISSOLUÇÃO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	34
3.5 TURBIDIMETRIA.....	34
3.6 MEDIÇÃO DE PH.....	35
3.7 PREPARAÇÃO DE ÁCIDO FENOLDISSULFÔNICO	36
3.8 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO NA FORMA DE NITRATO (NO_3^-) E NITRO GÊNIO AMONIAICAL.....	36
3.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO	39
4.2 TURBIDEZ	39
4.3 PH	42
4.4 NITRATO.....	44
4.5 AMÔNIA	48
4.6 LEGISLAÇÃO.....	49
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1 INTRODUÇÃO

O esgoto doméstico é aquele proveniente de águas de banhos, de vasos sanitários, lavanderias, pias de cozinha, carregado com produtos químicos decorrentes das atividades fisiológicas e de higiene. Quando a cidade possui rede coletora de esgotos, estes são despejados diretamente na rede coletora. Entretanto, muitas vezes existe a rede coletora, mas não existe o tratamento ou ainda existe um tratamento precário. O tratamento precário de esgoto doméstico permite resquícios de compostos tóxicos e resquícios de nutrientes que podem provocar desordens ambientais. Tais nutrientes, majoritariamente nitrogênio e fósforo, apesar de essenciais para o crescimento de determinados organismos, são essenciais para microrganismos responsáveis pela proliferação de doenças e desenvolvimento de fenômenos ambientalmente danosos.

Uma das formas alternativas no tratamento de esgotos domésticos pode ser realizada com microrganismos, especialmente com a microalga *Chlorella vulgaris*. Essa microalga é unicelular e de água doce, amplamente cultivada na Ásia devido ao seu elevado teor nutricional, cosmético e para produção de compostos secundários, como lipídeos. Além disso, tem potencial de remoção de nutrientes de esgotos domésticos, visto que nitrogênio e fósforo são macronutrientes essenciais em sua composição. Assim, buscam-se técnicas para melhor aproveitamento dessa microalga em suas respectivas aplicações. Uma das técnicas para utilização da *C. vulgaris* na remoção de nutrientes de esgoto doméstico é o encapsulamento, com a utilização de um biopolímero como matriz.

Dentre as técnicas de encapsulamento, o método de envolvimento é o mais acessível economicamente, além de ter operação simples. As principais vantagens de encapsulamento de microrganismos são que as células são protegidas de condições extremas do meio de cultivo e ainda podem ser recicladas em processos que exigem menor gasto energético. A encapsulação de *Chlorella vulgaris* também permite estudar a potencialidade do uso da biomassa, após o processo, devido à sua rica composição nutricional.

1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO

A justificativa para escolha deste tema pode ser vista da ótica da precariedade do tratamento de esgotos sanitários no Brasil. Altas cargas de nutrientes em esgotos podem ser poluentes extremamente danosos ao meio ambiente. O nitrogênio na forma de nitrato e amônia está intimamente relacionado com a poluição de esgotos em rios e em estações de tratamento de efluentes. O grande problema desse nutriente em suas variadas formas é que a cada ano que passa a população cresce e, conseqüentemente há maior quantidade deste no meio ambiente. A melhoria e ampliação nos sistemas de esgoto sanitário tornam-se uma necessidade. Desta forma, necessitam-se sistemas mais eficientes, sustentáveis e economicamente viáveis neste processo.

Nesse sentido, o presente trabalho respondeu à seguinte pergunta: qual a eficiência de remoção de nitrato e amônia de efluente secundário com microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas de alginato de cálcio?

A percepção da necessidade de obtenção de águas com maior qualidade após os tratamentos convencionais de tratamento de esgotos domésticos torna o presente estudo de suma importância para a melhoria da gestão hídrica e de técnicas de desinfecção. O estudo foi limitado à Companhia de Saneamento do Paraná (SANE-PAR), na cidade de Ponta Grossa.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de remoção de nitrato e amônia de efluente secundário com microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em esferas de alginato de cálcio

1.2.2 Objetivos específicos

- Quantificar nitrato removido do efluente doméstico;
- Estimar amônia removida do efluente doméstico;
- Estabelecer comparação das características do efluente após o tratamento com *C. vulgaris* imobilizada e a legislação;

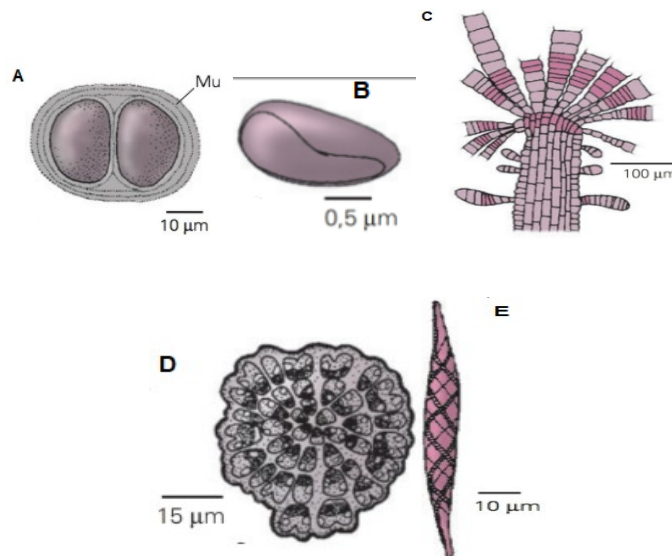
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção serão apresentados os principais conceitos relevantes ao estudo do tema proposto. O referencial teórico é subdividido em capítulos, no qual cada capítulo tem uma explicação e aprofundamento de acordo com a visão de um ou mais autores. Ainda analisam-se convergências e divergências de conceitos e ideias entre os autores pesquisados para o respectivo tópico analisado.

2.1 MICROALGAS

As algas são um grande grupo de organismos provenientes de seres eucarióticos e procarióticos e, muitas das vezes, esses seres não tem uma ligação estreita de parentesco entre si, sendo utilizado o conceito de “algas” por comodidade e perpetuação histórica (FRANCESCHINI et al., 2009). As algas podem ser ordenadas de acordo com suas respectivas colorações e localizações de substâncias de reserva por exemplo, ou seja, uma classificação parcialmente bioquímica. Os cinco principais grupos nos quais elas podem ser classificadas são: *Cyanophyceae* (algas azul esverdeadas), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas marrons), *Rhodophyceae* (algas vermelhas) e *Bacillariophyceae* (diatomáceas). Existe uma variedade muito grande de algas: desde unicelulares com estruturas simples até organismos complexos pluricelulares (CAVALCANTI, 2016) . Na Figura 1, estão representados os cinco principais grupos de algas, com exemplos de células de cada grupo.

Figura 1. A. *Chroococcus turgidus* (Cyanophyceae). B. *Bathycoccus prasinus* (Chlorophyceae). C. *Sporochnales* (Phaeophyceae). D. *Erythrocladia* sp. (Rhodophyceae). E. *Cylindrotheca gracilis* (Bacillariophyceae).



Fonte: Adaptado de Reviere (2006).

Segundo Franceschini et al. (2009), na ramificação da árvore filogenética, apenas as algas do grupo Cyanophyta (algas azul esverdeadas) são procarióticas, enquanto todas as demais são pertencentes ao grupo dos eucariontes. Historicamente, o grupo das cianobactérias é um dos mais antigos (3,5 bilhões de anos) e resistentes, devido ao fato de que possuem clorofila a e de que produzem oxigênio. O oxigênio é um composto oxidativo, o que significa que contribuiu para a seleção de espécies mais resistentes nos tempos primitivos. De acordo com Lourenço (2006), aproximadamente 9/10 do oxigênio terrestre provém de algas marinhas, especialmente das microalgas. O termo microalga é amplamente discutido por vários autores. Para Franceschini et al. (2009, p.287):

Microalgas compreendem um conjunto muito diversificado de organismos microscópicos que crescem no plâncton marinho e de água doce e no perifíton de águas continentais, sobre plantas aquáticas, pedras, madeiras, e outros substratos submersos.

Dessa forma, para esse autor, a principal diferença entre o conceito de alga e microalga está na análise ótica do tamanho desses organismos. Já Tomaselli (2004) apresenta uma visão mais minuciosa e abrangente sobre o conceito de microalga, pois entende que o termo microalga refere-se às algas microscópicas que contêm clorofila a e talos, os quais não se diferenciam em raízes, caules e folhas. Para esse

autor, o conceito de microalga faz referências também às cianobactérias, além das algas microscópicas.

As microalgas são um grupo diverso de microrganismos presentes tanto em ambientes aquáticos quanto em ambientes terrestres. A estimativa é que existam mais de 50000 espécies de microalgas, porém uma quantidade ainda muito baixa foi estudada: apenas 30000 (RICHMOND, 2004). As taxas de conversão de energia solar em biomassa são mais altas para as microalgas pelo fato de que apresentam trocas mais eficientes de água, CO₂ e nutrientes do que as plantas superiores e, além disso, tem uma estrutura mais simples do que as plantas terrestres (SALISBURY e ROSS, 1985; CARLSSON et al., 2007).

Nos dias atuais, muitas microalgas estão sendo usadas como fonte de suplementos alimentares ricos em proteínas, carboidratos, vitaminas, dentre outras fontes nutricionais. Também são utilizadas como fonte de lipídeos para produção de biocombustíveis, tal como biodiesel. A conversão de CO₂ através da absorção pelas microalgas, permite gerar produtos de alto valor agregado sem competir com terras agricultáveis e sem causar desflorestamento, se a instalação dos suportes para cultivo forem feitos de maneira inteligente (SAFI et al., 2014) Alguns autores analisam o cultivo de microalgas em resíduos e subprodutos, tal como Sydney et al. (2011) demonstrou o acúmulo de lipídeos em microalgas sob o cultivo em esgoto doméstico para produção de biodiesel. Outro estudo, de Souza (2016), mostrou o cultivo de microalgas em diferentes concentrações de vinhaça e fontes de luz para potencializar um futuro estudo sobre a aplicação da biomassa microalgal obtida para utilização em ração animal.

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

A microalga *Chlorella vulgaris* pôde ser estudada pela primeira vez em 1890 em um lago situado próximo da cidade de Delft na Holanda, sendo a primeira microalga com um núcleo delimitado (CAVALCANTI, 2016).

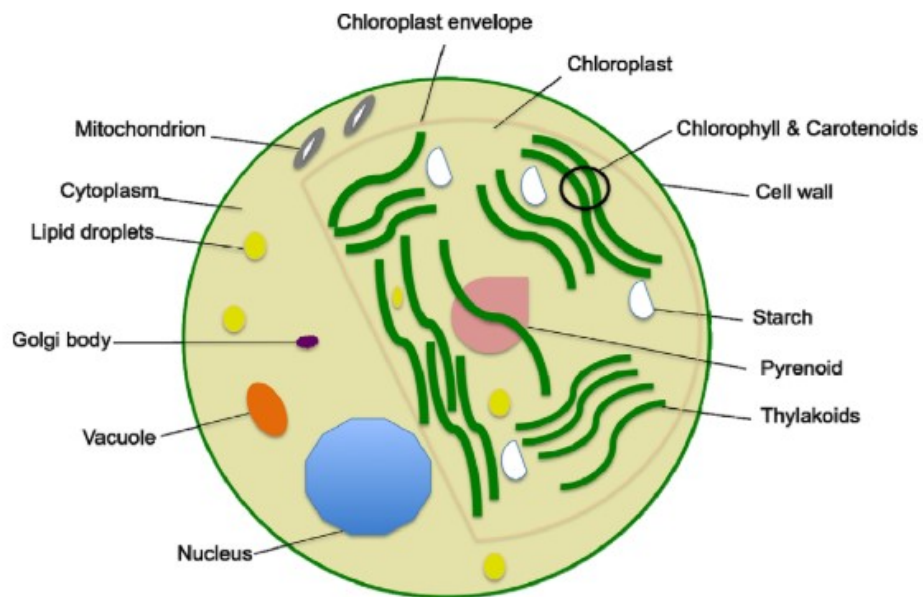
Essa microalga pertence ao domínio Eukaryota, reino Protista, divisão Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales, família Chlorellaceae, gênero *Chlorella*, espécie *Chlorella vulgaris*. O nome *Chlorella* deriva da palavra grega chlo-

ros, que significa verde e do sufixo que vem do latim, ella, que significa tamanho microscópico. É uma microalga unicelular, de água doce, que tem diâmetro médio entre 2µm e 10µm. O amido localizado nos cloroplastos é composto de amilose e amilopectina, sendo que tais açúcares servem como armazenadores de energia na célula (SAFI et al., 2014).

De acordo com Klok (2010), a microalga *C. vulgaris* pode acumular lipídeos sob efeitos adversos de cultivo, como a falta de nitrogênio e fósforo, por exemplo. Além disso, pode acumular clorofila a e b, β-caroteno e xantofilas.

A Figura 2 traz a representação de uma célula de *C. vulgaris*, onde são mostradas as organelas celulares, incluindo as reservas de amido.

Figura 2. Estrutura esquemática de organelas da microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: SAFI et al. (2014).

A microalga *C. vulgaris* pode crescer de maneira autotrófica, heterotrófica, mixotrófica e através de outras técnicas alternativas. A maneira mais comum de produção é realizada em lagoas abertas subdividas em lagoas naturais e artificiais. As lagoas naturais são representadas por lagos, lagunas e tanques, enquanto que cultivo artificial é realizado em resíduos ou lagoas artificiais. O cultivo autotrófico ainda pode ser desenvolvido em fotobiorreatores fechados com controle de pH, temperatura, luminosidade e concentração de dióxido de carbono, de forma que os produtos desse

tipo de cultivo são os mais adequados para aplicação em nutrição e cosméticos. No crescimento heterotrófico não é requerida luz, mas apenas uma fonte orgânica de carbono. Para o crescimento da microalga *C. vulgaris*, as fontes orgânicas de carbono mais utilizadas são glicose, acetato, glicerol e glutamato. No cultivo mixotrófico dessa microalga pode-se combinar tanto técnicas autotróficas quanto heterotróficas, permitindo que a microalga realize fotossíntese e adicionando fontes orgânicas de carbono. Por fim, técnicas de crescimento alternativas estão sendo estudadas utilizando *C. vulgaris* com bactérias imobilizadas a fim de aumentar tamanho das células, aumentar produção de lipídeos, remoção de metais de águas residuais, dentre outros. Essa técnica demonstrou que a microalga utiliza o CO₂ da respiração das bactérias para seu crescimento (SAFI et al., 2014).

2.2 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Para Guisan (2006), a técnica de imobilização celular consiste no aprisionamento de um ativo biológico em um espaço confinado, permitindo altas concentrações celulares e maiores velocidades de processamento dos produtos desejados. Algas imobilizadas tem maior resistência a altas concentrações de metais pesados, maior teor de clorofila e maior eficiência na remoção de nutrientes (MALLICK e RAI, 1993). Uma das vantagens do uso da imobilização celular é a eliminação ou diminuição de ciclos em processos, possibilitando menor gasto energético, tal como a utilização da filtração para reutilizar as partículas de alginato de cálcio com o ativo biotecnológico dentro (BORZANI, 2001).

A técnica de imobilização celular é comprovadamente eficiente na utilização com microalgas em casos que muitos efeitos benéficos foram trazidos ao sistema de cultivo, como redução da competição por nutrientes com organismos de outras espécies e melhorias no seu metabolismo (SILVA, 2011). As células ficam protegidas de meios extremos, como elevado pH e alta concentração de substratos. Dentre as principais técnicas de imobilização celular, encontram-se adsorção, ligação covalente e envolvimento (BORZANI, 2001).

2.2.1 Adsorção

Essa é uma das técnicas de imobilização celular com execução facilitada devido à simplicidade do processo. Para Silva (2011), consiste na aderência natural de microrganismos sobre uma superfície, chamada de suporte para adsorção. Alguns dos materiais que podem ser utilizados como suporte para adsorção são madeira, serragem, carboximetilcelulose, terra diatomácea, bentonita, alumina, dentre outros. Segundo Borzani (2001):

As forças de interação entre a superfície celular e a superfície do suporte no método da adsorção são complexas e envolvem múltiplos tipos de formação de ligações. Deve-se destacar aqui as interações eletrostáticas entre cargas opostas de parede celular e superfície do suporte, a formação de ligações iônicas entre grupos amínicos e carboxílicos da parede celular e um grupo reativo da superfície do suporte e a formação de ligações covalentes parciais entre grupos amínicos da parede celular e grupo hidroxila ou silano (SiO^-) da superfície do suporte.

Um dos agravantes dessa técnica é a difusão comprometida de produtos secretados para o meio extracelular devido a ocorrência da má absorção de nutrientes pelas células devido às condições de crescimento celular disforme (SILVA, 2011).

2.2.2 Ligação covalente

Conforme Silva (2011), a técnica de imobilização por ligação covalente é mais utilizada para imobilização de enzimas, e não de células. Esse tipo de ligação tem uma elevada força e proporciona uma grande rigidez na estrutura devido aos resíduos enzimáticos. A estrutura rígida permite uma maior proteção à enzima frente aos agentes desnaturantes, tais como calor, pH extremos e solventes orgânicos. A imobilização enzimática covalente se inicia com a ativação do suporte através de reações para que o suporte produza intermediários reativos. É uma das técnicas mais efetivas em relação à temperaturas altas e estabilização operacional das enzimas, porém sua desvantagem é que apresenta parcial redução de atividade catalítica devido à alteração conformacional proveniente das características das ligações (RESENDE e SOCCOL, 2017).

2.2.3 Envolvimento

A técnica de imobilização por envolvimento é uma das técnicas mais usadas para encapsular células vivas devido sua baixa toxicidade e alta capacidade de reter

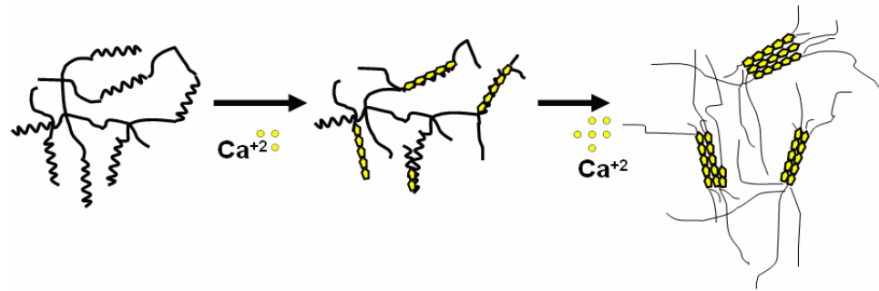
as células aprisionadas. A técnica baseia-se no gotejamento de uma solução polimérica em água contendo as células de interesse entre 1% a 4% em peso sobre uma solução de CaCl_2 , com concentração variando entre 0,05M à 0,5M. As matrizes poliméricas mais utilizadas são os polímeros naturais alginato, k-carragenana, agar e pectina. As partículas formadas através dessa técnica tem diâmetro médio entre 0,5 a 5 mm e densidade de células de 250mg de biomassa seca.g⁻¹ de matriz (BORZANI, 2001).

2.3 ALGINATO

Dentre as matrizes poliméricas mais utilizadas, o alginato apresenta-se como um polímero natural de baixa toxicidade, biocompatível e elevada resistência mecânica a depender das concentrações utilizadas (LIMA et al. 2007). Este polímero é extraído de algas marrons, de diferentes espécies do gênero *Laminaria* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*) e do gênero *Sargassum* (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophillum nodosum*, *Lesonia negrescens*). O alginato de sódio é um polímero linear composto por ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulorônico (G), onde M e G são as unidades monoméricas e os quais se agrupam em séries de MM, GG e MG (BRESSEL, 2007).

A explicação para a estrutura em forma de gel do alginato surgiu em 1973, com Grant. Grant propôs que o alginato forma uma estrutura com configuração de “caixas de ovos”, na qual os íons divalentes – como o cálcio – ficam envoltos pela estrutura do alginato, como exemplificado na Figura 3. O alginato apresenta uma estrutura complexa e, para que ocorra a formação de uma rede tridimensional, altera sua forma linear ao reagir com íons divalentes. Cada vez que ocorre a reação de tais íons com a estrutura do alginato, formam-se redes mais emaranhadas e complexas (GRANT et al., 1973). Alguns estudos demonstram um alto potencial de reutilização das células dentro das esferas de alginato. Lins e Leão (2002) conseguiram reutilizar vinte e três vezes células de *Kluyveromyces marxianus* para obter leite com baixo teor de lactose.

Figura 3. Representação da estrutura “caixa de ovos”.



Fonte: Bressel (2007).

2.4 ESGOTO DOMÉSTICO

O conceito de esgoto doméstico é englobado dentro do conceito de esgoto sanitário pela norma 9648 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), pois segundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1986, p.1), “esgoto sanitário é o despejo líquido constituído de esgoto doméstico e industrial, água de infiltração e a contribuição parasitária”. Quando existe a alteração de características de águas já utilizadas por atividades humanas, a classificação subdivide-se em esgotos doméstico, industrial ou pluvial. O esgoto doméstico é resultante do despejo de águas provenientes de higiene e necessidades fisiológicas; o esgoto industrial provém de atividades da indústria, como águas de refrigeração; já o esgoto pluvial é aquele em que a coleta da água da chuva é direcionada para galerias pluviais (IBRAHIN et al., 2014).

Os esgotos domésticos apresentam composição variada de acordo com o período analisado devido a fatores sazonais, e possuem uma porcentagem muito pequena de sólidos suspensos, coloidais e dissolvidos (aproximadamente 0,07%), enquanto que o restante da composição desse resíduo é água (99,93%). Dentro do grupo de sólidos, os quais são os responsáveis pelas características poluentes do esgoto doméstico, existe a classificação em sólidos orgânicos (50%) e sólidos inorgânicos (50%). O esgoto doméstico ainda pode ser classificado como fraco, médio ou diluído conforme a concentração de seus componentes (MENDONÇA et al., 2018).

O tratamento de esgotos deve ser realizado devido aos depósitos de lodo e condições anaeróbias por sólidos suspensos; consumo de fontes de oxigênio naturais e consequente desenvolvimento de condições sépticas por contaminantes orgânicos

biodegradáveis; enfermidades; possíveis efeitos carcinogênicos, mutanogênicos e tóxicos; alta concentração de detergentes, fenóis, pesticidas, metais pesados e compostos inorgânicos dissolvidos. Um dos contaminantes nutricionais mais estudados atualmente é o nitrogênio, pois aliado ao carbono esse nutriente pode causar crescimento de vida aquática indesejável e contaminar solos e águas subterrâneas (MENDONÇA et al., 2018).

De acordo com Ibrahim (2014), os resíduos patogênicos presentes em esgotos podem ser responsáveis pela proliferação de doenças, como febre tifoide, esquistossomose e cólera. Os esgotos domésticos, em especial, vindos de banhos, despejos de água de vasos sanitários e pias, carregam para a rede coletora vírus, bactérias, protozoários e vermes.

Conforme relatório publicado pela Agência Nacional de Águas (ANA) (2017), 55% da população urbana brasileira possui serviço adequado de tratamento de esgotos, sendo que o Plano Nacional de Saneamento Básico considera como tratamento adequado de esgotos a rede de coleta e tratamento de esgoto e o uso de fossa séptica. Já 45% da população tem a carga diária gerada de esgotos não tratada; e não coletada e nem tratada. Isso significa que quase metade da população está exposta a todas as consequências negativas provenientes da falta de tratamento adequado de esgotos. A distribuição da carga orgânica de esgotos por região e nacional está representada na Tabela 1.

Tabela 1. Carga orgânica de esgotos subdividida em regiões no Brasil, em 2017.

DISTRIBUIÇÃO DA CARGA ORGÂNICA GERADA NO BRASIL POR REGIÃO GEOGRÁFICA						
REGIÃO GEOGRÁFICA	CARGA TOTAL GERADA (t DBO/dia)	DISTRIBUIÇÃO DA CARGA GERADA (t DBO/dia)				CARGA REMANESCENTE* (t DBO/dia)
		COLETADA E TRATADA	SOLUÇÃO INDIVIDUAL	COLETADA NÃO TRATADA	NÃO COLETADA E NÃO TRATADA	
NORTE	684	79	149	27	429	541
NORDESTE	2.204	711	338	245	910	1.602
SUDESTE	4.174	2.261	189	1.195	528	2.290
SUL	1.319	532	322	176	289	707
CENTRO-OESTE	717	352	101	12	253	376
BRASIL	9.098	3.935	1.099	1.655	2.409	5.516

Fonte: ANA (2017).

Para soluções individuais, foi considerada uma taxa de remoção de carga orgânica de 60%. Portanto, a carga tratada remanescente foi de 440 t Demanda Bioquí-

mica de Oxigênio (DBO)/dia. A taxa de remoção projetada para carga coletada e tratada foi de 74% de eficiência, o que representa 26% de carga tratada remanescente. A soma da carga bruta sem coleta e sem tratamento com a carga bruta com coleta e sem tratamento e a carga tratada remanescente resulta no cálculo da carga total remanescente.

De acordo com a ANA (2017), mais de 110 mil quilômetros de cursos d'água possuem baixa qualidade de água, comprometendo a saúde da população e o meio ambiente. Na dimensão operacional, necessita-se ampliar e melhorar os sistemas de tratamento de esgotos no Brasil com novas ferramentas e técnicas mais efetivas de remoção de cargas poluidoras. O esgoto deve ser tratado de maneira a contribuir para uma gestão efetiva de mitigação de impactos dos recursos hídricos. Medidas de dimensão político-estratégica, como discussão acerca da reorganização do setor de saneamento, e medidas organizacionais - a exemplo de institucionalização da gestão e ações de desenvolvimento institucional - também devem ser levadas em conta.

Do ponto de vista econômico, Ibrahim (2014) apresenta a relação de custos e benefícios trazidos para população com o investimento em tratamento adequado de esgotos domésticos: a cada R\$ 1,00 investido com o tratamento de esgoto são economizados R\$ 4,00 em custos com saúde pública, como tratamento de doenças graves. De acordo com a ANA (2017), o investimento a ser realizado para universalização de tratamento adequado de esgoto seria no valor de R\$ 150 bilhões de reais até 2035, com custos variando de acordo com cada região. Os maiores investimentos devem ser feitos no Norte e os menores no Sudeste.

2.5 LEGISLAÇÃO RELATIVA AO LANÇAMENTO DE EFLUENTES

A legislação regente no Brasil para tratar de assuntos relativos ao tratamento de efluentes, classificação de corpos de águas e diretrizes ambientais para seu enquadramento é a Resolução nº 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 2005. A Resolução nº 430/2011 do CONAMA surgiu para complementar e alterar a Resolução 357/2005, trazendo novas definições e mudanças no texto relativas ao texto anterior. Para Von Sperling (2005), existe a necessidade de se criar pa-

drões em relação à qualidade de águas e, com isso, as entidades que fazem o lançamento dos efluentes em corpos hídricos devem se adequar aos padrões estabelecidos na legislação.

Os corpos d'água são divididos em águas doces, salinas e salobras. De acordo com (CONAMA, 2005, p.2), define-se como “I - águas doces: águas com salinidade igual ou inferior a 0,5%; II – águas salobras: águas com salinidade superior a 0,5% e inferior a 30%; III – águas salinas: águas com salinidade igual ou superior a 30%”. Os esgotos domésticos geralmente são despejados em águas doces, as quais são classificadas em classe especial, classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4.

Na classe especial encaixam-se águas destinadas ao consumo humano sem nenhum tratamento; a classe 1 abrange águas que podem ser consumidas por humanos após tratamento simplificado; na classe 2 estão inseridas águas que são destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional; na classe 3 estão as águas destinadas à irrigação de culturas alimentícias e para consumo humano após tratamento avançado; e a classe 4 representa as águas que são destinadas para navegação e harmonia de paisagens.

O lançamento de esgotos deve ser realizado de acordo com a classificação das águas nas quais será despejado, a fim de realizar a diluição do resíduo e, conseqüente diminuição de compostos causadores de transtornos ambientais, conforme diz a ANA (2017). A Resolução 430/2011 regulamenta a exigência de alguns parâmetros mínimos para lançar efluentes de tratamentos de esgotos sanitários diretamente nas águas doces, assim como expresso na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros mínimos para lançamento de efluentes de sistemas de tratamento de esgotos sanitários.

Parâmetros	Condições permitidas
pH	Entre 5 e 9
Temperatura	Inferior a 40°C
Materiais sedimentáveis	Até 1ml.L ⁻¹ em teste de 1h cone <i>Inmhoff</i> / Lagos e lagoas: virtualmente ausentes
DBO 5 dias, 20°C	Máximo de 1200mg.L ⁻¹ /poderá ser ultrapassado em caso de eficiência de 60% de remoção de DBO
Substâncias solúveis em hexano	Até 100mg.L ⁻¹
Nitrogênio Amoniacal Total	Até 20mg.L ⁻¹ N
Materiais flutuantes	Ausentes

Fonte: Adaptado de CONAMA 430/2011.

A Resolução 430/2011 do CONAMA não exige padrão de nitrato em casos de lançamento de esgotos sanitários, porém exige nitrogênio amoniacal. É vedado o lançamento de efluentes em águas de classe especial, sendo permitido apenas o lançamento nas outras categorias desde que atendidos os parâmetros estabelecidos.

2.6 PROCESSO DE TRATAMENTO DE ESGOTOS DOMÉSTICOS

O tratamento de esgotos domésticos é uma questão atual e fundamental a ser discutida para a diminuição da poluição ambiental e doenças que acometem os seres humanos e animais, pois é um dos fatores operacionais sujeitos a melhorias e adequações. De acordo com Mendonça e Mendonça (2017), a eficiência do tratamento depende de fatores como o corpo receptor, a legislação ambiental vigente, capacidade do resíduo em se diluir nos corpos d'água, dentre outros. Os processos de tratamento podem ser biológicos ou físico-químicos, sendo realizados na maioria das vezes em quatro etapas principais: tratamento preliminar, tratamento primário, tratamento secundário e tratamento terciário. Conforme Mendonça e Mendonça (2017), as etapas são descritas como:

- O tratamento preliminar é responsável pela eliminação de sólidos com maiores tamanhos e sólidos suspensos fixos, feito por equipamentos adequados, como grades de barras para o caso de sólidos mais grosseiros; e caixas de areia para sólidos em suspensão, os quais apresentam alta velocidade de decantação. A remoção dos sólidos é feita de forma manual ou mecanizada, onde os sólidos são dispostos em aterros

sanitários. O objetivo dessa etapa é evitar o acúmulo de sólidos e materiais abrasivos nas tubulações das ETEs.

- O tratamento primário está relacionado à eliminação da matéria orgânica e sólidos que se depositam no fundo dos tanques. Essa etapa inclui sedimentação e flotação.
- Na etapa do tratamento secundário, bactérias realizam degradação biológica de compostos carbonáceos, transformando-os em outros compostos, como CH₄, NH₃, H₂S etc. Ocorre, portanto, a diminuição da carga orgânica e acumulação de biomassa, a qual é denominada lodo.
- O tratamento terciário, também chamado de tratamento avançado, é o processo responsável pela desinfecção e eliminação de compostos tóxicos.

No Brasil, grande parte das estações de tratamento de efluentes (ETEs) trata apenas até o processo secundário, visto que o tratamento terciário apresenta elevado custo na sua implementação. Entretanto, em algumas ETEs o processo terciário é obrigatório, sendo exigido processos avançados de desinfecção. Geralmente, esse processo é utilizado para quando se deseja obter baixas quantidades de DBO e sólidos sedimentáveis (SS).

2.7 REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE ESGOTO DOMÉSTICO PELA *CHLORELLA VULGARIS* IMOBILIZADA EM MATRIZ DE ALGINATO DE CÁLCIO

A partir da década de 1990, mais da metade dos estudos envolvendo microalgas imobilizadas em esferas de alginato de cálcio estavam relacionados ao tratamento de efluentes provindos de esgotos domésticos (SHINY et al., 2004). A utilização de nutrientes de efluentes domésticos por parte de microalgas é um tema muito estudado atualmente, devido à necessidade de baratear tecnologias e simplificar processos de tratamento de esgotos domésticos. O tratamento desse tipo de água residual com microalgas, especialmente a *C. vulgaris*, pode alavancar a sustentabilidade do processo, ao passo que a reutilização do ativo biotecnológico torna-se mais barata e dispense menor quantidade energética, além do processo possuir elevada eficiência.

De acordo com Vidotti (2015), nitrogênio e fósforo são os dois principais macronutrientes utilizados por microalgas para o crescimento e metabolismo celular, com

o nitrogênio sendo fundamental na formação de ácidos nucleicos e proteínas, e o fósforo sendo essencial na constituição de moléculas fundamentais, como Adenosina Trifosfato (ATP). Carbono, hidrogênio e oxigênio são nutrientes não minerais de grande importância para fotossíntese, crescimento e reprodução celular. Além desses nutrientes, as microalgas ainda necessitam de metais traços – componentes presentes em pequenas quantidades (inferiores a 4 partes por milhão (ppm)) – para que o crescimento não seja limitado e o metabolismo celular funcione de maneira adequada.

Nesse sentido, o encontro das necessidades nutricionais da *Chlorella vulgaris* com a disponibilidade de tais nutrientes em esgotos domésticos torna o sistema viável. A *Chlorella vulgaris* é uma das microalgas que tem sido estudadas para realizar a remoção de nutrientes em esgotos domésticos quando imobilizada em esferas de alginato de cálcio, ajudando na remoção de nutrientes presentes nesse meio e proporcionando alta eficiência. Grande parte dos estudos apontam que a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta alta eficiência na remoção de nitratos (SILVA, 2011).

Para melhorar o aproveitamento na remoção de nutrientes utilizando microalgas, diversos fatores devem ser levados em conta: a espécie da microalga utilizada, a técnica de imobilização aplicada, a morfologia das esferas, tempo de retenção, dentre outros. A *C. vulgaris* imobilizada é a microalga mais utilizada na remoção de nutrientes porque suporta grandes oscilações de pH e altas concentrações salinas (MARCON, 2005).

2.8 NITROGÊNIO E SUAS FORMAS

Segundo Von Sperling e Bastos (2009), o nitrogênio pode ser encontrado em várias formas na biosfera: nitrogênio molecular (N_2), nitrogênio orgânico (variável), amônia livre (NH_3), íon amônio (NH_4^+), íon nitrito (NO_2^-), íon nitrato (NO_3^-). No tratamento de esgotos, é indispensável para o crescimento de microrganismos responsáveis pelo tratamento, entretanto em quantidade muito altas pode gerar eutrofização. No esgoto doméstico bruto, as formas predominantes de nitrogênio são nitrogênio orgânico e amônia. Em um curso de água com poluição remota, encontra-se em maior quantidade nitrogênio na forma de nitrato. Nitrogênio total pode ser definido como:

$$NT = NTK + NO_2^- + NO_3^-$$

Onde:

NTK = Nitrogênio Total Kjeldahl (nitrogênio orgânico e amônia)

2.9 ETE RIO VERDE E EFLUENTES

A ETE Verde possui os seguintes processos no tratamento do efluente: sistema de gradeamento com a utilização de limpeza manual e gradeamento mecanizado, com grades metálicas com espaçamento de 25 e 10 mm, respectivamente. A estação contém dois desarenadores ciclônicos com diâmetro de 4 m, com forma cônica e fluxo em espiral. A velocidade média de escoamento é de $0,3 \text{ m.s}^{-1}$. O vertedor Parshall tem largura $w = 1'$ e medidor de nível ultrassônico, a fim de medir a vazão de esgotos. A estação possui 4 reatores anaeróbios Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), do tipo Reator Aneróbio de Lodo Fluidizado (RALF), padrão SANEPAR, projetados para vazão média de 70 L.s^{-1} e vazão máxima de 140 L.s^{-1} . Cada reator tem volume útil de 1.900 m^3 e todos são interligados entre si. Antes de chegar ao corpo receptor (Rio Verde), o efluente é tratado na lagoa de estabilização. As dimensões da lagoa são: 160 m de comprimento, 130 m de largura e 4,0 m de profundidade. A unidade ainda possui os leitos de secagem. A desinfecção e desaguamento do lodo são realizados juntamente com a unidade de gerenciamento de lodo e a centrífuga. O fluxo de vazão da ETE é de 210 L.s^{-1} de esgoto doméstico. A imagem ETE Rio Verde está apresentada na Figura 4.

Figura 4. ETE Rio Verde.



Fonte: Autoria própria (2020).

O RALF 1 operava com tempo de detenção hidráulica (TDH) médio anual de 10,1 horas. A imagem do RALF 1, de onde foi retirada a amostra, está representada na Figura 5.

Figura 5. RALF 1, localizado na ETE Rio Verde.



Fonte: Autoria própria (2020).

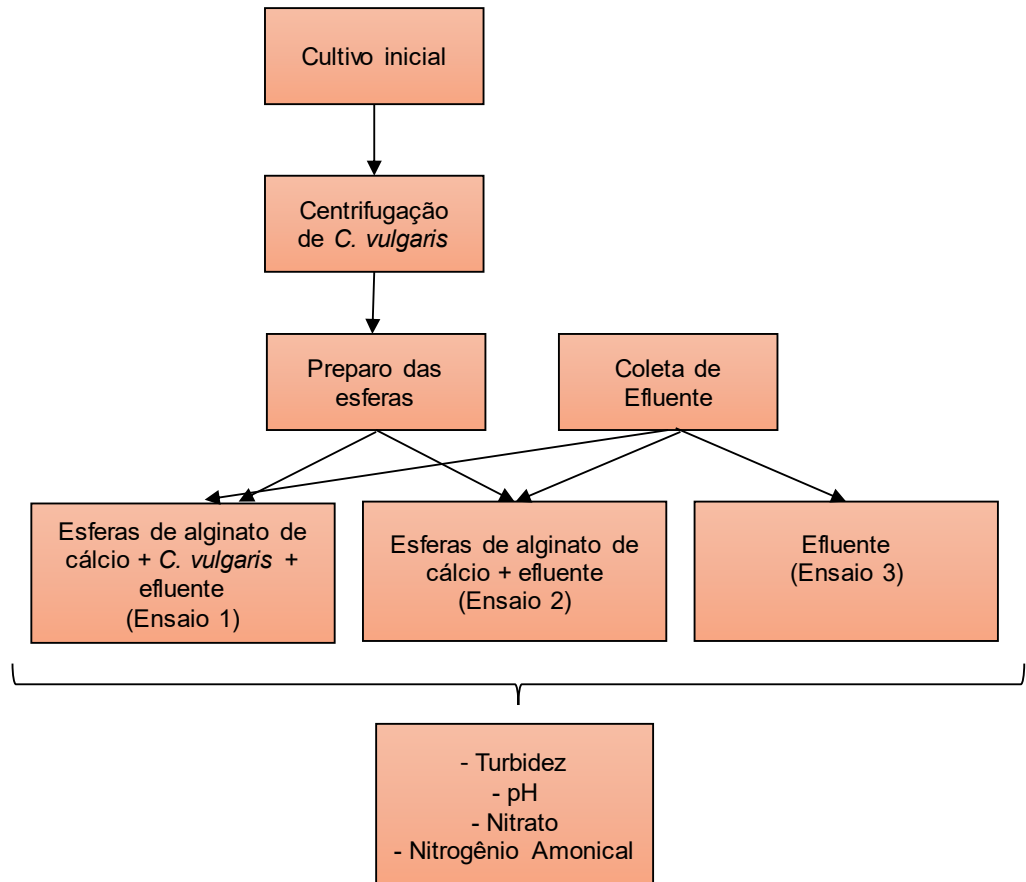
3 METODOLOGIA

O método de pesquisa adotado para este estudo caracterizou-se como exploratório, visto que é um tema pouco explorado, sendo necessária a construção de hipóteses. Apresenta ainda o método dedutivo e experimental, pois são realizados experimentos partindo de uma premissa geral para uma premissa particular e, de maneira dedutiva, inferindo uma sentença. O enfoque é predominantemente quantitativo, visto que serão quantificados turbidez, pH, N-NO_3^- e N-NH_3 . Além disso, a pesquisa apresenta análises estatísticas, mensuração e objetividade.

O estudo foi realizado nos Laboratórios D-002 e D-003 da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Ponta Grossa.

A Figura 6 traz um desenho esquemático simplificado do processo seguido durante a metodologia.

Figura 6. Fluxograma esquemático do processo de preparo dos ensaios 1, 2 e 3.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.1 COLETA DA AMOSTRA DA ETE RIO VERDE

Na época relativa à coleta da amostra (01/07/2020), o desarenador da ETE Rio Verde apresentava problemas e estava em manutenção.

Foram coletados 5L de efluente doméstico secundário no dia 01/07/2020, às 13h da tarde em um dia que apresentava temperatura média de 15°C, do Ralf nº 1 proveniente da ETE Rio Verde - Sanepar, localizada na cidade de Ponta Grossa, coordenadas 25°02'43.8"S 50°07'43.4"W. A amostra foi mantida fechada em um frasco esterilizado, guardada em refrigerador para não haver choque mecânicos e, conseqüentemente, gerar aeração. A amostra está representada na Figura 7.

Figura 7. Amostra de efluente coletada do RALF 1.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.2 CULTIVO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

A microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivada em um Erlenmeyer de 6L (volume de trabalho de 2,5L) na sala de microalgas do laboratório D-003 a $25\pm 1^\circ\text{C}$, sob o fluxo luminoso de 1577,6 lux e fotoperíodo 12:12h, em Meio Bristol Modificado (MBM) (Watanabe, 1960). O cultivo está representado na Figura 8.

Figura 8. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em MBM.

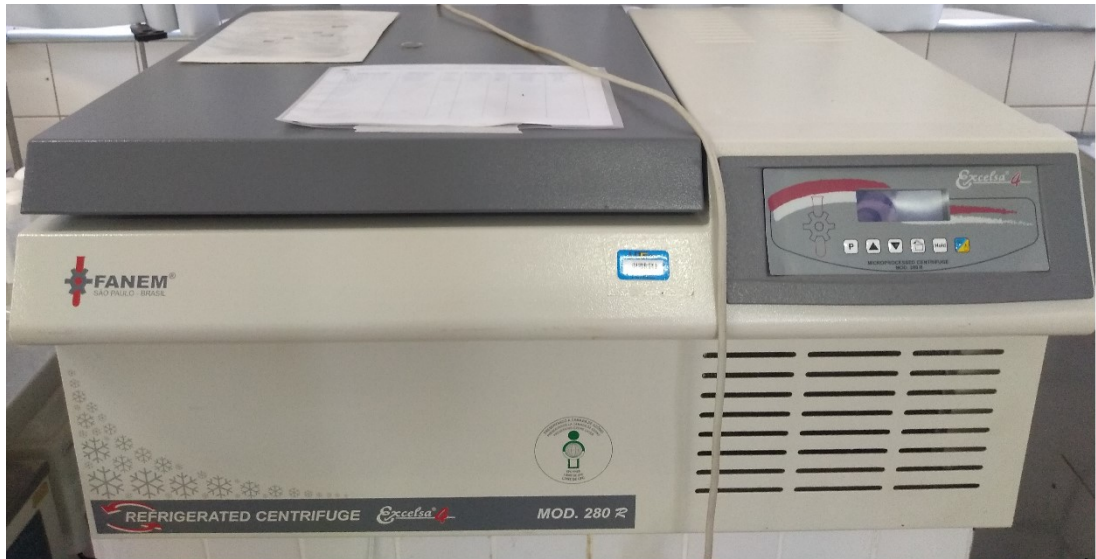


Fonte: Autoria própria (2019).

3.3 PREPARAÇÃO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM *CHLORELLA VULGARIS* IMOBILIZADA E ESFERAS DE CONTROLE

Retirou-se uma alíquota de 200mL do cultivo inicial e foi dividida em 16 tubos Falcon com 12,5mL cada. Os tubos foram agitados em centrífuga Excelsa modelo 280 a 5000 rpm durante trinta minutos, baseado em Marcon (2005). Após realizada a centrifugação, foi descartado 6,25mL de sobrenadante de cada tubo. Posteriormente, foram misturadas as quantias restantes de cada tubo, totalizando 100mL de uma solução microalgal densa. Por fim, misturou-se essa quantidade a 100mL de alginato de sódio (4%) em um béquer, formando uma solução 2%. O processo foi realizado na centrífuga mostrada na Figura 9.

Figura 9. Centrífuga Excelsa modelo 280.



Fonte: Autoria própria (2019).

A preparação do sistema de geração de esferas de alginato de cálcio baseia-se em sistema proposto por Bressel (2007), com mudanças na retirada do fluxo de ar, utilização de uma ponteira de micropipeta de 200 μ L ao invés de seringa, mudança na altura do béquer contendo *C. vulgaris* (utilização de altura de 33cm). Foi preparada uma solução de 2,0% de alginato de cálcio com adição de *C. vulgaris* e gotejada através da bomba peristáltica a um fluxo de 180mL.h⁻¹ sobre uma solução de cloreto de cálcio 125mM. A distância entre o bico da ponteira e a superfície da solução de cloreto de cálcio foi de 3cm. Toda o esquema foi montado dentro do fluxo laminar a fim de proporcionar maior esterilidade ao processo.

As esferas contendo *C. vulgaris* foram lavadas com água destilada e deixadas em repouso durante trinta minutos, assim como sugerido por Costa (2014). Logo em seguida, foram filtradas utilizando peneira metálica e adicionadas ao Erlenmeyer contendo efluente doméstico. Todo o processo se deu em condições estéreis, dentro da capela de fluxo laminar.

As esferas de controle seguiram os mesmos passos de produção, entretanto foram desenvolvidas sem a utilização da microalga *C. vulgaris*. Preparou-se uma solução 2,0% de alginato de sódio e foi gotejada sobre a solução de cloreto de cálcio 125mM sob as mesmas condições da preparação utilizando microalga encapsulada.

As esferas de controle também foram adicionados em um Erlenmeyer contendo efluente doméstico.

Foi adicionado apenas efluente em um terceiro Erlenmeyer a fim de ter uma referência da variação da quantidade de nitrato e nitrogênio amoniacal, além dos outros parâmetros para fins comparativos.

Após preparadas, as microalgas encapsuladas, as esferas de controle e o frasco contendo apenas efluente foram mantidos em uma incubadora shaker sob temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12:12h, e fluxo luminoso de 1577,6 lux, com rotação de 50 rpm na sala de microalgas do laboratório D-002 durante sete dias.

3.4 DISSOLUÇÃO DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

As esferas de alginato de cálcio foram dissolvidas com citrato de sódio 50mM, assim como sugerido por Simpson et al (2003). Utiliza-se um agitador Vórtex para auxiliar na homogeneização e agitação da solução contendo as esferas de alginato de cálcio.

3.5 TURBIDIMETRIA

A análise de turbidimetria foi realizada com o turbidímetro digital AP 2000 durante o período analisado, expresso na Figura 10. Primeiramente, o equipamento foi calibrado diariamente antes de iniciar as análises. Posteriormente, foi coletado 2mL de efluente de cada ensaio e inserida em uma cubeta específica do equipamento. Realizou-se a leitura e foram anotados os valores diários de cada ensaio. Cada amostra foi realizada em duplicata.

Figura 10. Turbidímetro AP 2000.



Fonte: Autoria própria (2020).

3.6 MEDIÇÃO DE PH

A medição de pH foi realizada diariamente através da retirada de amostra de cada Erlenmeyer, com a utilização do pHmetro de bancada PHS, modelo 3E, representado na Figura 11. O pHmetro foi calibrado diariamente com soluções tampão de pH 4,86 e 9,81. Em seguida, coletou-se amostra de efluente de cada um dos ensaios e foi medido o pH.

Figura 11. Phmetro PHS-3E.



Fonte: Autoria própria (2019).

3.7 PREPARAÇÃO DE ÁCIDO FENOLDISSULFÔNICO

Foi dissolvido 25g de fenol PA, C_6H_5OH , em 150ml de ácido sulfúrico concentrado PA foi adicionado 75ml de ácido sulfúrico fumegante PA, H_2SO_4 (15% SO_3 livre), homogeneizado e aquecido durante 2h, assim como sugerido pela NBR 12620/1992, para posterior utilização na determinação de nitrogênio na forma de nitrato.

3.8 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO NA FORMA DE NITRATO (NO_3^-) E NITROGÊNIO AMONIACAL

Como sugerido pela NBR 12620/1992, utiliza-se nitrato de potássio para esta preparação da solução estoque de nitrato. O procedimento foi realizado com a secagem do nitrato de potássio a $105^\circ C$ por 24h. Logo em seguida, foi dissolvido 0,7218g em água e diluído a 1000mL.

Em seguida, foi preparada a solução padrão de nitrato, sendo diluído 50mL da solução estoque de nitrato a 500mL com água destilada em balão volumétrico, como sugerido pela NBR 12620/1992.

Foi utilizado o método do ácido fenoldissulfônico para determinação de nitrato nas amostras (ABNT 12620:1992). Após a coleta e ajuste de pH dos ensaios 1, 2 e 3, as amostras foram colocadas em cápsulas de porcelana cada uma em banho-maria

para ocorrer evaporação até a secura. Após secas, foi adicionado 2mL de ácido fenedissulfônico em cada amostra e atritado com bastão de vidro para dissolver os resíduos. Adicionou-se 10mL de água destilada e, em seguida, 6mL de hidróxido de amônio. Foi esperado resfriar a mistura e transferida para um balão volumétrico de 100mL. Transferiu-se para uma cubeta para leitura e foi realizada a leitura com espectrofotômetro a 410nm. A análise espectrofotométrica foi realizada diariamente com o espectrofotômetro Digital VIS 325 a 1000nm V-M5, representado na Figura 12.

Figura 12. Espectrofotômetro digital VIS 325 a 1000nm V-M5.



Fonte: Autoria própria (2020).

Para determinação de nitrogênio amoniacal, foram utilizadas fitas de análise visual. A fita foi inserida diretamente na amostra. A leitura é realizada por comparação das cores com o padrão. Assim, cada cor representa uma faixa de concentração.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de $N-NO_3^-$ e $N-NH_3$ foram registrados diariamente durante sete dias e transferidos para planilhas do software Microsoft Excel. Foram construídos gráficos relativos ao decaimento ou crescimento de cada conjunto de dados analisados para examinar a eficiência do tratamento alternativo com *C. vulgaris* em esferas imobilizadas.

Foi realizado levantamento estatístico de 100 esferas de alginato de cálcio utilizando Microsoft Excel para realizar média e desvio-padrão do tamanho das esferas. Anotam-se os dados de pH e turbidez do efluente, também diariamente, para

posterior construção dos gráficos e análise da variação, visto que esses parâmetros influem de maneira significativa no processo.

4. RESULTADOS

Os resultados de análise inicial dos parâmetros estão expressos na Tabela 3. A amostra foi subdividida; foram transferidos 250mL igualmente para 3 frascos Erlenmeyer previamente autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

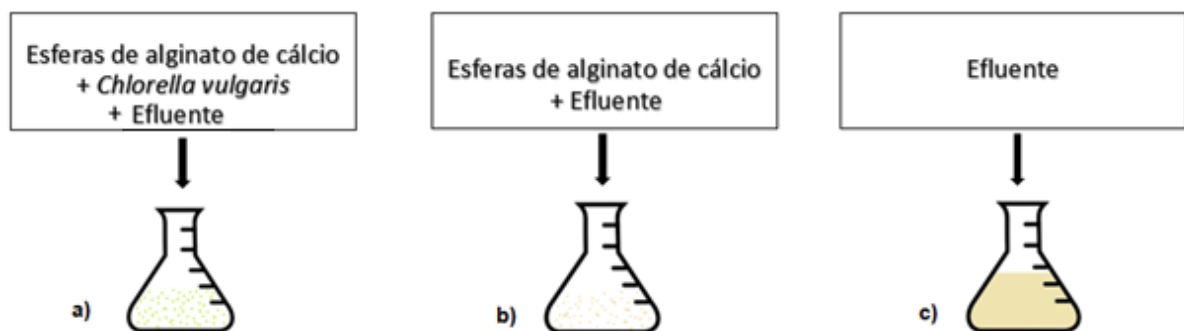
Tabela 3. Resultado de parâmetros iniciais.

Parâmetros	Amostra
Temperatura (°C)	15,05
pH	7,05
Turbidez (NTU)	45,5
Nitrogênio -NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,2048
Nitrogênio -NH ₃ (mg.L ⁻¹)	21

Fonte: Autoria própria (2020).

O volume coletado de amostra foi subdividido da seguinte forma: a) 250mL de efluente + 20mL de esferas de alginato de cálcio com *Chlorella vulgaris*; b) 250 mL de efluente + 20mL de esferas de alginato de cálcio; c) 250 mL de efluente; e está representado na Figura 13.

Figura 13. a) Cultivo de 20mL de *Chlorella vulgaris* encapsulada em esferas de alginato de cálcio em 250mL de efluente secundário (Ensaio 1). b) Volume de 20mL de esferas de alginato de cálcio em 250mL de efluente secundário (Ensaio 2). c) Volume de 250mL efluente secundário (Ensaio 3).



Fonte: Autoria própria (2020).

4. 1 ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

O tamanho das esferas de alginato de cálcio é importante no sentido de que esferas significativamente grandes (acima de 5mm de diâmetro) não permitem uma troca de gases e nutrientes tão efetiva quanto esferas menores e de tamanho homogêneo.

Das 100 esferas analisadas, 50 do ensaio 1 e 50 do ensaio 2, tem-se os seguintes resultados expressos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Dados estatísticos de 50 esferas – Ensaio 1.

<i>Ensaio 1</i>	
Média (mm)	2,5200
Erro padrão (mm)	0,0714
Desvio padrão	0,2147
Variância da amostra	0,2547

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 5. Dados estatísticos de 50 esferas – Ensaio 2.

<i>Ensaio 2</i>	
Média (mm)	2,4600
Erro padrão (mm)	0,0712
Desvio padrão	0,3235
Variância da amostra	0,2535

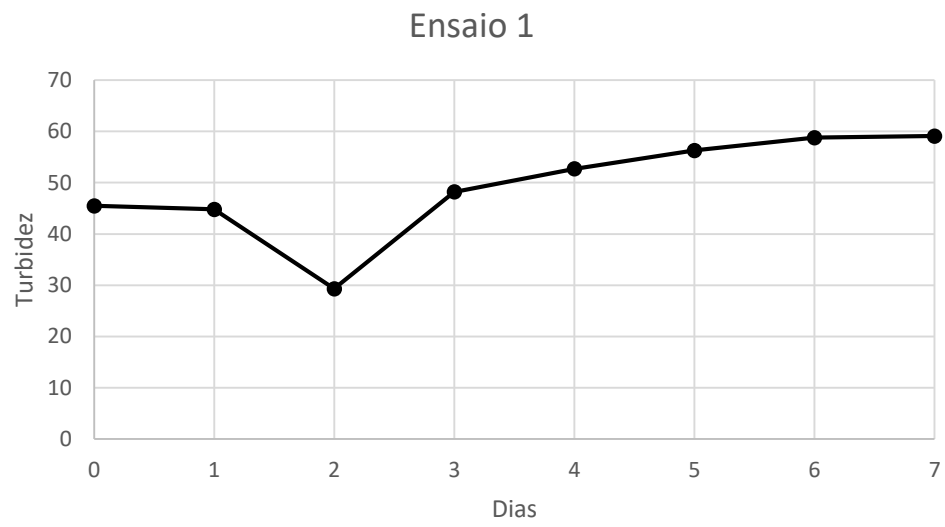
Fonte: Autoria própria (2020).

Nota-se baixo desvio padrão tanto para o tamanho das esferas do ensaio 1 quanto para o tamanho das esferas do ensaio 2. A baixa variabilidade no tamanho das esferas possibilita maior troca gasosa e difusão de nutrientes para as células aprisionadas na matriz de alginato no caso do ensaio 1.

4.2 TURBIDEZ

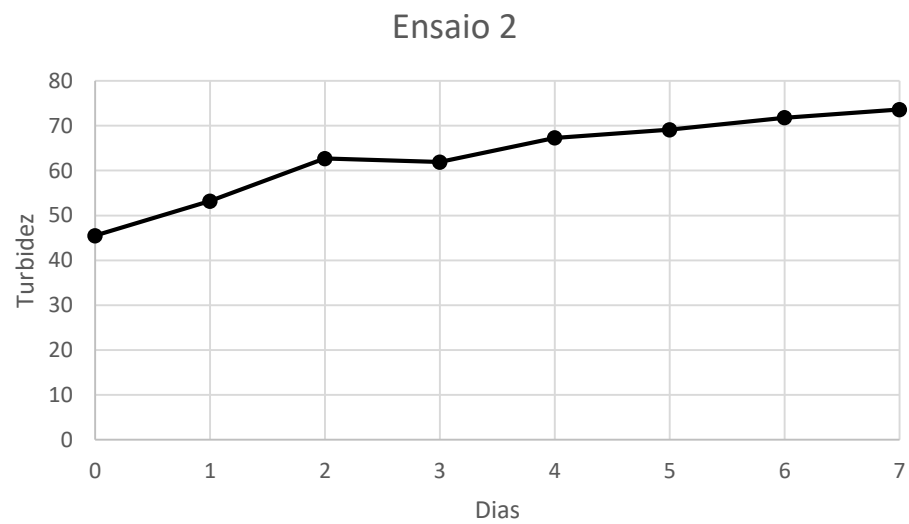
Os ensaios foram analisados diariamente durante 7 dias. A turbidez está representada nas Figuras 14, 15 e 16.

Figura 14. Turbidez do ensaio 1.



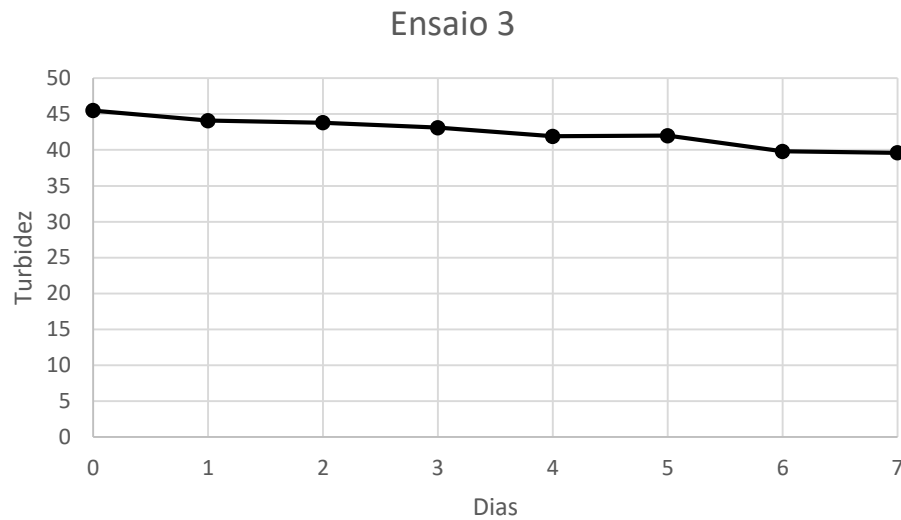
Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 15. Turbidez do ensaio 2.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 16. Turbidez do ensaio 3.



Fonte: Autoria própria (2020).

Enquanto o ensaio 3 teve leve alteração da turbidez nos dias analisados, nota-se que os ensaios 1 e 2 apresentaram aumento de turbidez. O ensaio 1 apresentou aumento de turbidez a partir do terceiro dia, enquanto que o ensaio 2 apresentou elevação de turbidez já do primeiro para o segundo dia. Uma das explicações para esse fato pode ser dada devido ao rompimento das partículas de alginato de cálcio. Considerando que a turbidez é uma propriedade que representa a redução da transparência de um fluido devido a matérias em suspensão, no caso do ensaio 1, o fato foi confirmado através da coleta de amostras e contagem de células no microscópio óptico. O ensaio apresentou número de células no efluente de 1×10^3 células.mL⁻¹ no dia 3.

As amostras podem ter sido rompidas pela baixa concentração de CaCl₂, assim como sugere Simpson et al (2003). A baixa concentração de CaCl₂ na preparação das partículas torna a estrutura “egg-box” mais frágil e propensa ao rompimento. No caso do presente estudo, as esferas estavam dentro de um shaker rotativo à 50 rpm para aumentar a taxa de oxigenação das células. Entretanto, esse é um ponto a ser levado em conta no rompimento das partículas. A fragilidade das esferas devido à baixa concentração de CaCl₂ somada à rotação pode ter sido um dos fatores propulsores do rompimento.

Além disso, no dia 2 teve-se um problema com o equipamento shaker rotativo. O mesmo apresenta um termopar acoplado para o controle de temperatura. Durante os dias 1 e 2 o equipamento apresentou controle eficiente da temperatura sempre mantendo temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. No entanto, no dia 3 houve queda de energia e ao religar o equipamento, houve um pico de energia. Durante aproximadamente 3h, o equipamento teve oscilações de temperatura entre 25°C e 35°C . Após esse período, o equipamento se estabilizou novamente.

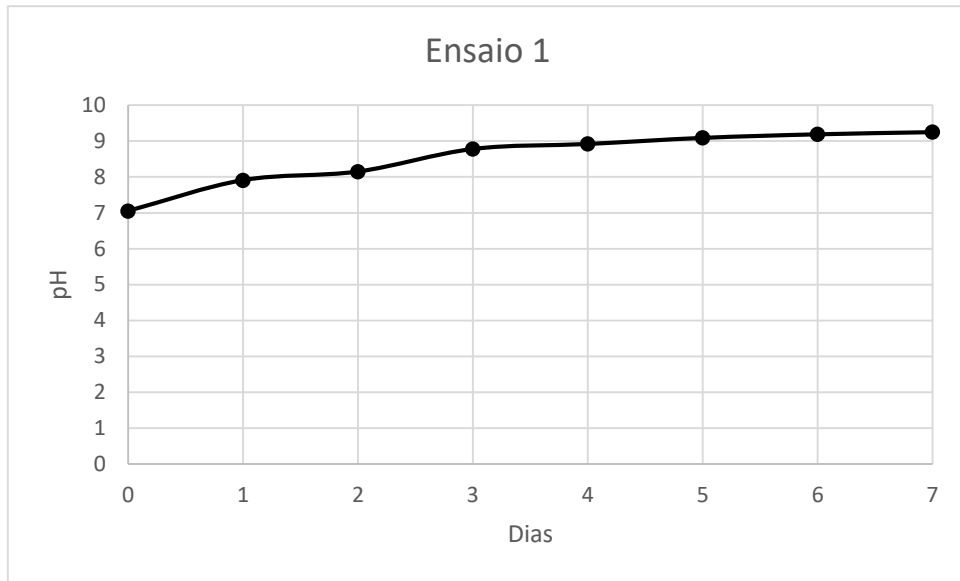
De acordo com Silva (2011), sabe-se que a elevação da temperatura é outro fator que afeta a estrutura das esferas de alginato de cálcio, possibilitando o rompimento das mesmas, pois a elevação da temperatura permite a solubilidade do alginato em água.

4.3 pH

Todos os valores de pH dos ensaios aumentaram se comparados o primeiro e último dia de experimento. Para o ensaio 2, o aumento do pH se deve ao fato da ruptura das esferas de alginato de cálcio. O caráter alcalino do sal confere o aumento de pH conforme a passagem dos dias.

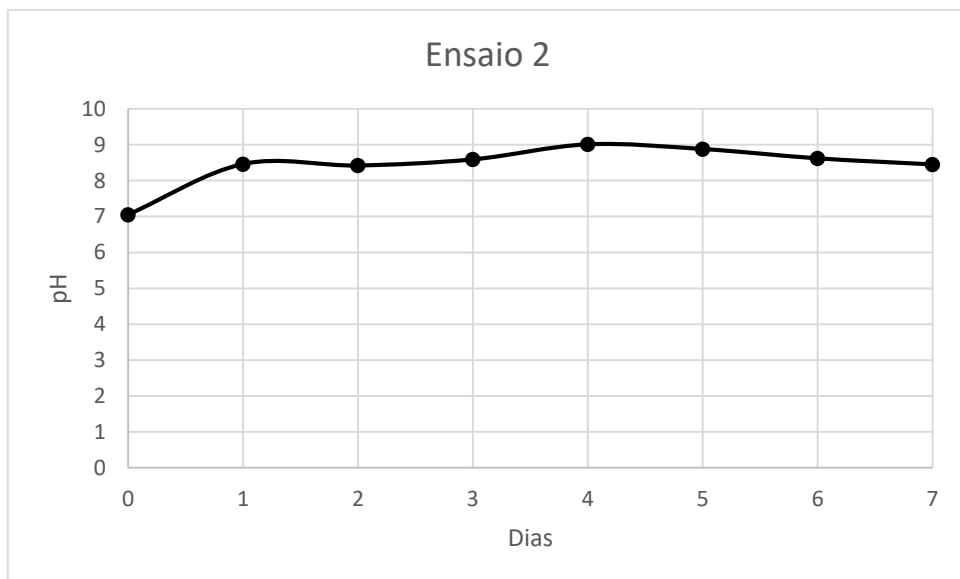
O ensaio 1 teve aumento de 7,05 para 9,25 de pH nos dias analisados. O aumento do pH ocorre em função da atividade fotossintética das microalgas. Com a remoção de CO_2 da água, há elevação de pH e consumo de íons H^+ . A elevação do pH pode ser um indicador de consumo de carbono inorgânico pelas células (LEE et al., 2006). As Figuras 17, 18 e 19 apresentam as variações de pH diárias dos ensaios 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 17. Faixa de pH analisada diariamente para o ensaio 1.



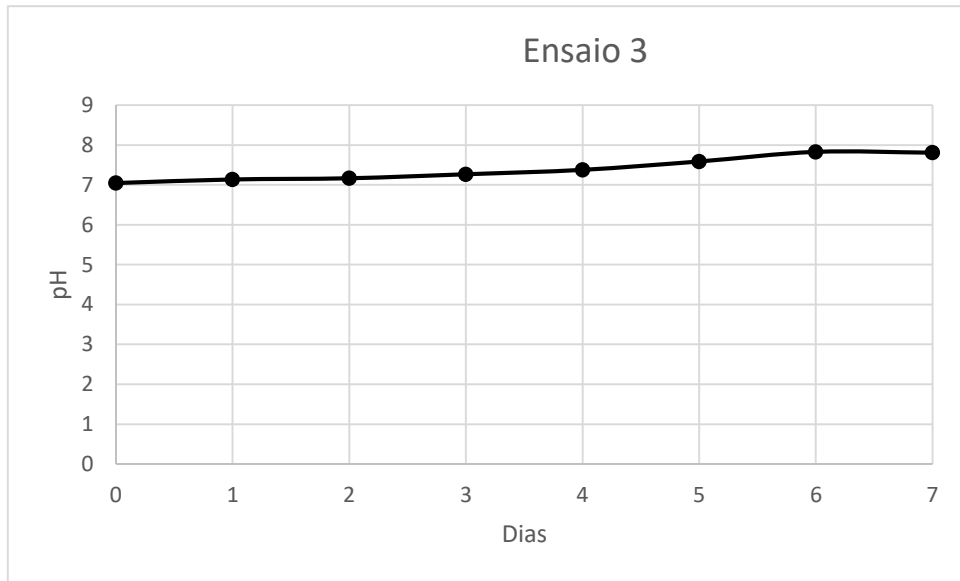
Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 18. Faixa de pH analisada diariamente para o ensaio 2.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 19. Faixa de pH analisada diariamente para o ensaio 3.



Fonte: Autoria própria (2020).

4.4 NITRATO

Foi plotada curva padrão de nitrato utilizando solução padrão de nitrato previamente preparada, representada na figura 20. A Tabela 6 apresenta as concentrações das soluções diluídas de nitrato para leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410nm.

Tabela 6. Concentrações de soluções diluídas para curva padrão de nitrato.

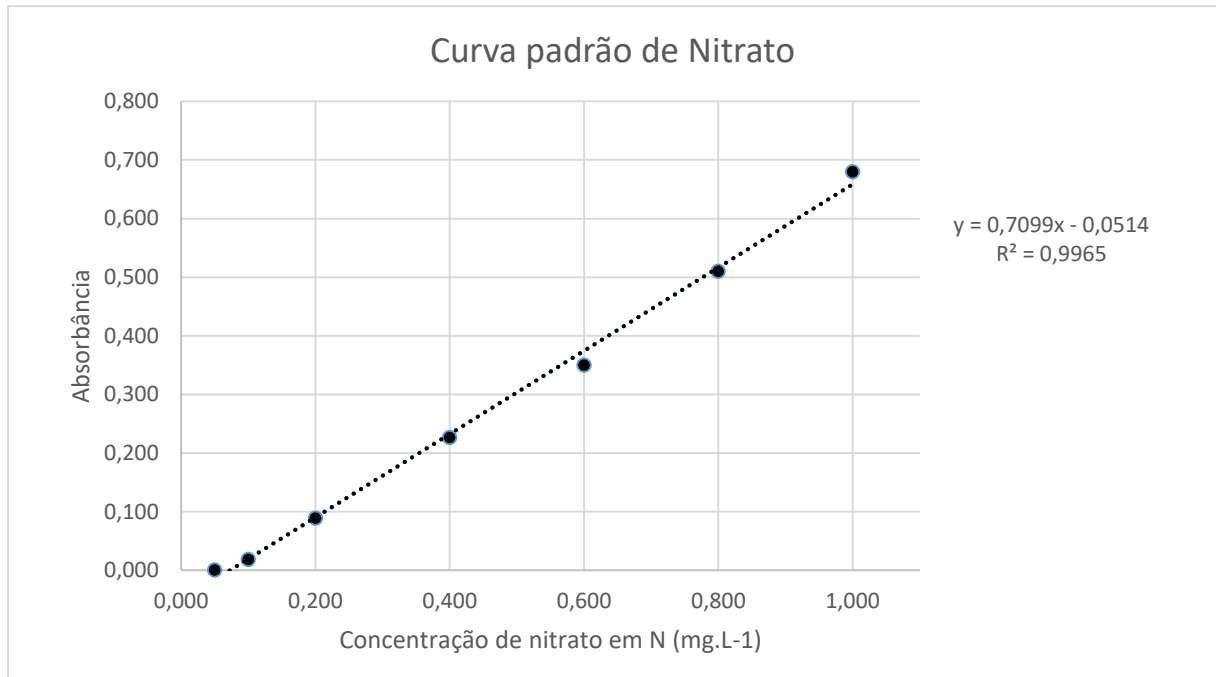
Ensaio	Concentração de Nitrato em N (mg.L^{-1})	Volume (mL) a elevar a 100mL
Branco	0	0
1	0,05	2,5
2	0,1	5
3	0,2	10
4	0,4	20
5	0,6	30
6	0,8	40
7	1	50

Fonte: Autoria própria (2020).

A curva padrão de nitrato resultante está apresentada na seguinte equação:

$$\text{Concentração de nitrato (mg.L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbância (410nm)} + 0,0514}{0,7099}$$

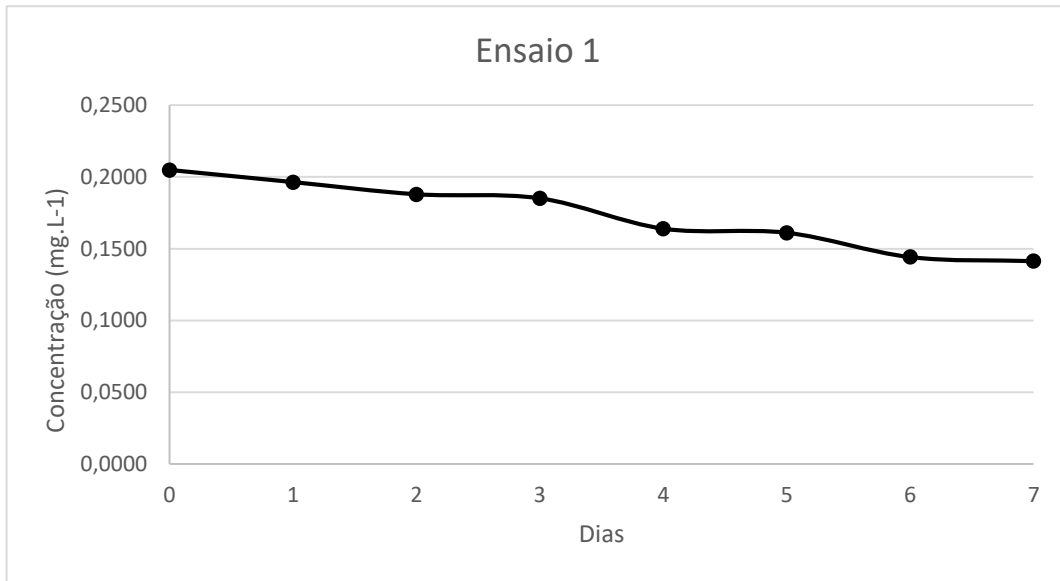
Figura 20. Curva padrão de nitrato.



Fonte: Autoria própria (2020).

A quantidade de nitrato removida em cada amostra está representada nos gráficos 21, 22 e 23. Nota-se que a partir do terceiro dia de experimento houve uma queda significativa na concentração de nitrato. Um dos motivos desse fato pode ser explicado pela variação de temperatura no controlador. Ao atingir temperaturas maiores, pode ter favorecido a taxa fotossintética e, conseqüentemente, a microalga pode ter utilizado mais nutrientes. Melo (2014) obteve remoção de 46,15% de remoção de nitrato em 7 dias de cultivo em efluente sintético com cultivo de *C. vulgaris* com 11000 lux. Entretanto, no ensaio 1 foi observada queda significativa na concentração de nitrato durante os 7 dias de experimento. Houve eficiência de remoção de nitrato de 30,95%, ou seja, no último dia de análise atingiu $0,1414 \text{ mg.L}^{-1}$ em efluente com uma quantidade significativamente menor de energia (1577,6 lux), atendendo assim a legislação vigente baseada em águas de classe 1: máximo permitido de nitrato é de até 10 mg.L^{-1} .

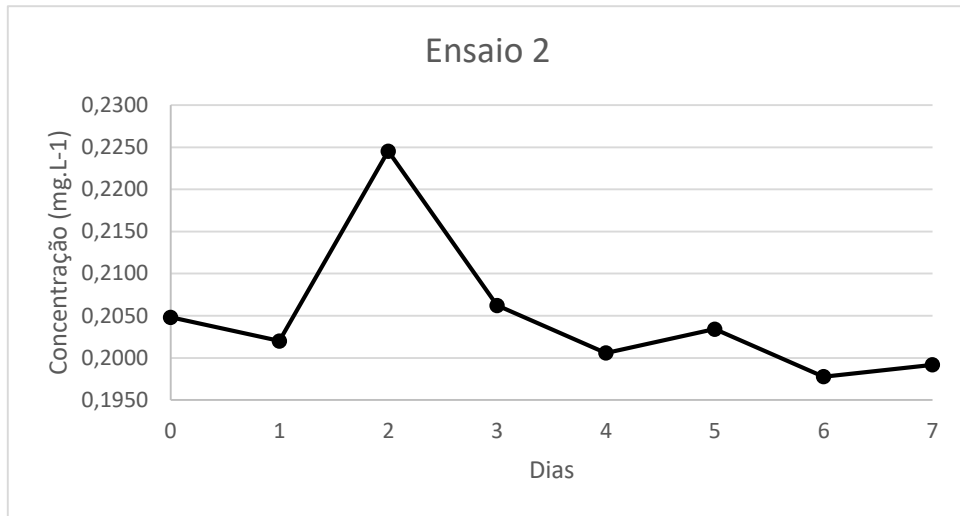
Figura 21. Remoção de Nitrato, ensaio 1.



Fonte: Autoria própria (2020).

O ensaio 2 mostrou alguns desvios no processo, principalmente a partir do dia 2. Como houve rompimento das esferas de alginato de cálcio devido ao choque mecânico, mesmo que em escala menor, a interferência do material na leitura da absorção tem relação com resquícios de íons cloreto na solução, visto que se houve rompimento das partículas liberou íons cloreto remanescentes. Sabe-se que um dos interferentes na análise espectrofotométrica são íons cloreto no método fenoldissulfônico (NBR 12620:1992).

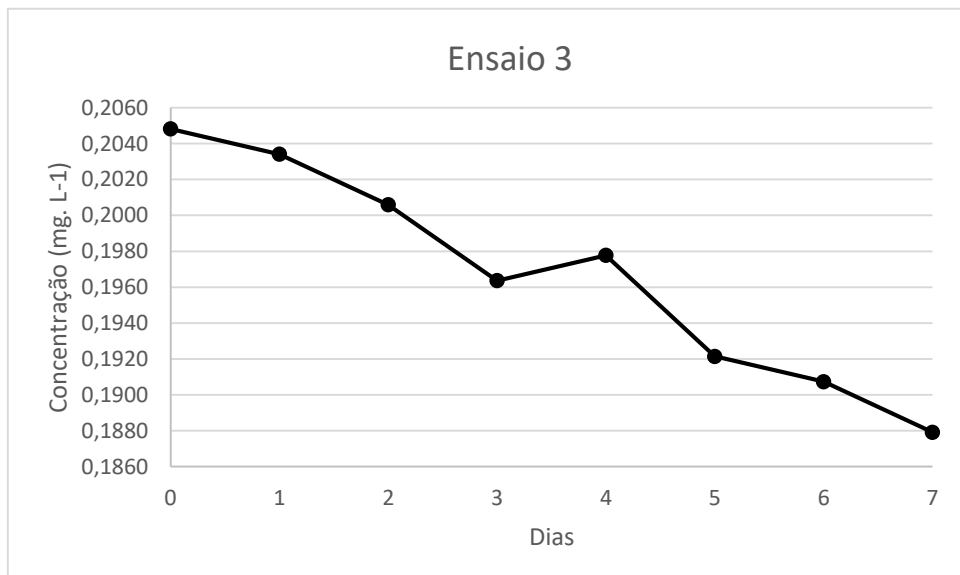
Figura 22. Remoção de Nitrato, ensaio 2.



Fonte: Autoria própria (2020).

O ensaio 3 apresentou queda de 8,25% de nitrato. Uma das possíveis causas pode ter sido interferência na análise espectrofotométrica, visto que a análise de nitrato do efluente deveria se manter constante. Compostos orgânicos e íons cloreto podem ser interferentes nesse tipo de análise.

Figura 23. Remoção de Nitrato, ensaio 3.

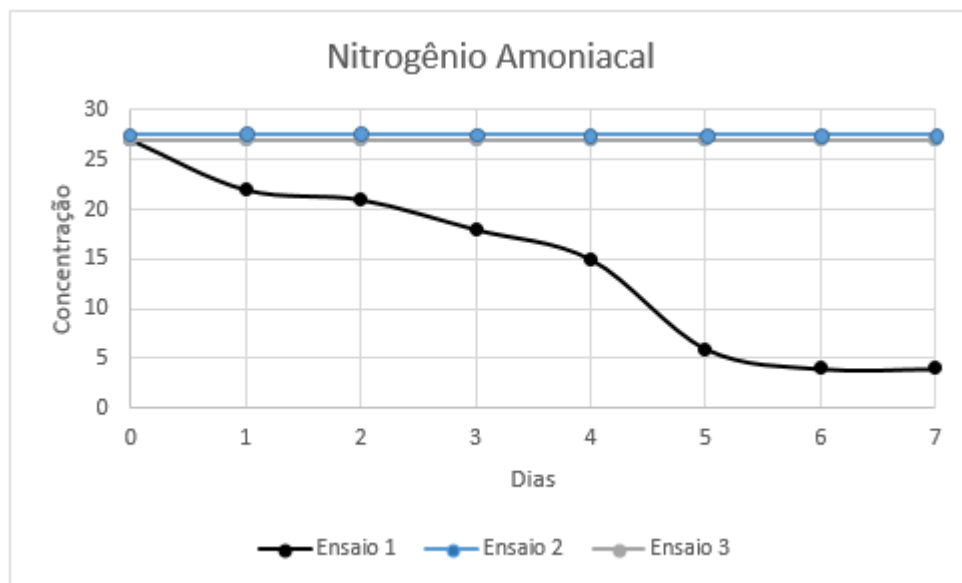


Fonte: Autoria própria (2020).

4.5 AMÔNIA

Os resultados diários de amônia foram analisados com fitas de medição de nitrogênio na forma de nitrogênio amoniacal, da marca Aquacheck. Os resultados da concentração de nitrogênio amoniacal no decorrer do período analisado estão expressos na Figura 24.

Figura 24. Análise de Nitrogênio Amoniacal.



Fonte: Autoria própria (2020).

Os ensaios 2 e 3 não sofreram variação na concentração de amônia nos dias analisados. Já a amostra 1 apresentou queda de 81,48% de amônia. Dias et. al (2019) encontrou valores próximos: 82,2% de remoção de nitrato utilizando *C. vulgaris* livre. As esferas de alginato de cálcio auxiliam na proteção contra o estresse ambiental das células.

Nota-se uma queda significativa de nitrogênio amoniacal entre o quarto e quinto dias. Isso ocorre porque a microalga está em fase de crescimento exponencial (levando em conta que a curva de crescimento da *C. vulgaris* é de aproximadamente quatorze dias) e deve consumir mais nutrientes para a reprodução e manutenção celular.

4.6 LEGISLAÇÃO

Na Tabela 7, tem-se os principais parâmetros analisados durante o período de sete dias.

Tabela 7. Resultados finais compilados.

Parâmetros	Resultados Ensaio 1	Resultados Iniciais	Parâmetros Legislação
pH	9,25	7,05	Entre 5 e 9
Temperatura (°C)	23,5	15,05	Abaixo de 40°C
N - NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,14	0,2048	-
N - NH ₃ (mg.L ⁻¹)	3	21	Até 20
Turbidez (NTU)	59,1	45,5	-

Fonte: Aatoria Própria (2020).

De acordo com os critérios analisados, nota-se que o pH apresenta-se levemente acima do que permitido pela Resolução 430/2011 do CONAMA. A faixa ideal é entre 5 e 9 de acordo com a Resolução 430/2011 do CONAMA. Melo (2014) obteve pH de 10,32 após sete dias de cultivo. Uma das diferenças encontradas para aquele é o fator da luminosidade, pois no presente trabalho foi utilizada intensidade luminosa de 1577,6 lux, enquanto Melo(2014) utilizou intensidade luminosa de 9500lux.

A temperatura está na faixa abaixo de 40°C exigidos pela Resolução. A quantidade de nitrogênio amoniacal permitido na Resolução para lançamento de efluentes é de até 20mg.L⁻¹, enquanto que o resultado do ensaio 1 foi de 3,0 mg.L⁻¹ de N-NH₃. A Resolução 430/2011 do CONAMA não exige padrão de nitrato em casos de lançamento de esgotos sanitários, porém o lançamento de efluentes em qualquer outro tipo de classe de água, desde que não seja classe especial, deve atender às exigências impostas pela categoria. A classe 1 de águas doces permite uma carga de nitrato de até 10mg.L⁻¹. Melo (2014) encontrou remoção de 46,15% de nitrato na primeira semana de cultivo, porém utilizou efluente sintético e iluminação superior ao do presente trabalho.

5 CONCLUSÃO

Em virtude das análises experimentais da pesquisa, pode-se dizer que a microalga *C. vulgaris* apresenta eficiência de remoção de 30,95% de nitrato e 85,15%

de remoção de amônia do efluente em questão da ETE Rio Verde de Ponta Grossa. A microalga *C. vulgaris* apresenta alta capacidade de adaptação em ambientes de elevado estresse ambiental, sendo os efluentes uma das vertentes mais estudadas como meio cultivo ou complemento de meio de cultivo artificial.

Um dos pontos a serem considerados na produção de esferas com alginato de cálcio deve ser a concentração dos reagentes, tanto do alginato de sódio quanto do cloreto de cálcio. Neste estudo, foi utilizada concentração de cloreto de cálcio sugerida na literatura. Entretanto, ao utilizar agitação ou ambientes com agitação mecânica deve-se elevar a concentração de cloreto de cálcio.

A solução de sulfato de prata é capaz de precipitar possíveis interferentes de análises espectrofotométricas com a elevação da concentração de cloreto de cálcio. Os íons cloreto podem ser precipitados e removidos por filtração ou centrifugação.

A sugestão para estudos futuros é utilizar concentração maior de cloreto de cálcio para produção de esferas de alginato de cálcio e utilização de reator air-lift durante um período maior de tempo para aumentar a eficiência de remoção de nutrientes de efluentes. Outro ponto importante a ser estudado é a reutilização das esferas, principalmente o tempo de duração que as esferas se mantêm rígidas.

A eficiência de remoção de nutrientes pode ser testada também em efluentes primários e terciários, em diferentes condições artificiais ou naturais, proporcionando diferentes cenários para simular em pequena escala a aplicação de tais projetos, sendo de vital importância para a ampliação da gestão hídrica e de efluentes no país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. **Standard Methods for the examination of Water and Wastewater**. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Association, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Atlas Esgotos**: Despoluição de Bacias Hidrográficas. Brasília, 2017. Disponível em: http://arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/ATLASESGOTOSDespoluicaoodeBaciasHidrograficas-ResumoExecutivo_livro.pdf. Acessado dia 19/10/2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9648**: Estudos de concepção de sistemas de esgoto sanitário. Rio de Janeiro, p.1 1986.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12620**: Águas - Determinação de nitrato - Métodos do ácido cromotrópico e do ácido fenoldissulfônico - Método de ensaio. Rio de Janeiro, p.1 1992.

BORZANI, Walter et al. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2001. v. 2.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de março de 2005. Disponível em <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>>. Acesso em 20 de out. 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 de maio de 2011. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=114770>>. Acesso em 20 de out. 2019.

BRESSEL, Tatiana Azevedo Bastian. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications In Soil Science And Plant Analysis**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.71-80, jan. 1975. Informa UK Limited.

CAVALCANTI, Davi de Lima. **Potencial biotecnológico de *Chlorella vulgaris***: Aplicação em biocélulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂. 2016. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COSTA, B. S. **Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja**. 2014. 49 p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

DIAS, Guilherme; HIPÓLITO, Matheus; SANTOS, Fernando; LOUREGA, Rogério; MATTIA, Jaqueline de; EICHLER, Paulo; ALVES, Jonathan. BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES POR MEIO DA APLICAÇÃO DE MICROALGAS - UMA REVISÃO. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 8, p. 1678-1682, ago. 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422019004800891. Acesso em: 01 out. 2020.

FRANCESCHINI, Iara Maria et al. **Algas**: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GRANT, Gregor T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **Febs Letters**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.195-198, 15 maio 1973. Wiley.

GUISÁN, José Manuel. **Immobilization of enzymes and cells**. Madrid: Humana Press, 2006.

HAJIMAHMOODI, Mannan et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.43-50, 19 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC.

IBRAHIN, Francini Imene Dias; IBRAHIN, Fábio José; CANTUÁRIA, Eliane Ramos. **Análise Ambiental**: Gerenciamento de resíduos e tratamento de efluentes. São Paulo: Érica, 2014.

KLOK, Anne José. **Lipid production in microalgae**. 2013. 224 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Bioprocessos, Wageningen University, Wageningen, 2013.

LEE, Brady D.; APEL, William A.; WALTON, Michelle R.. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 97, n. 18, p. 2427-2434, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.028>.

LIMA, Aline Margarete Furuyama et al. Influência da adição de plastificante do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.832-837, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO).

LINS, Angela de Carvalho; LEÃO, Maria Helena M. Rocha. Removal of skim milk lactose using free and immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.187-192, 2002. Springer Nature.

LOURENÇO, Sérgio de Oliveira. **Cultivo de microalgas marinhas**: Princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006.

MACHADO, Adriana R. et al. Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.264-278, mar. 2017. Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal.

MALLICK, N.; RAI, L. C.. Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.196-201, mar. 1993. Springer Nature.

MARCON, Alexandre Endres. **Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

MELO, Thais Borini. **Remoção de nitrato e fosfato presente em efluente sintético, por meio do cultivo de *Chlorella vulgaris*, com foco preliminar para produção de biodiesel**. 2014. 111f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

MENDONÇA, Sérgio Rolim; MENDONÇA, Luciana Côelho. **Sistemas sustentáveis de esgoto**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2017.

RESENDE, Rodrigo Ribeiro; SOCCOL, Carlos Ricardo; FRANÇA, Luis Renato de. **Bi-otecnologia Aplicada à Agro&Indústria: fundamentos e aplicações**. 1ª edição. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4.

REVIERS, Bruno de. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford, Iowa: Blackwell Publishing, 2003.

SAFI, Carl et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 35, p.265-278, jul. 2014. Elsevier BV

SALISBURY, Frank Boyer; ROSS, Cleon Wesley. **Plant Physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1985.

SHINY, K. Biotreatment of wastewater using aquatic invertebrates, *Daphnia magna* and *Paramecium caudatum*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.55-58, jan. 2005. Elsevier BV.

SILVA, Maria Célia Cavalcante de Paula e. **Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella sp.* imobilizada em matriz de alginato de cálcio**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

SILVA, Marília Lordêlo Cardoso et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p.669-682, jul. 2010.

SIMPSON, Nicholas E. et al. NMR properties of alginate microbeads. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 27, p.4941-4948, dez. 2003. Elsevier BV..

SOUZA, Andréa Cristina Moralez de. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes de luz.** 2016. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SYDNEY, E.b. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, [s.l.], v. 88, n. 10, p.3291-3294, out. 2011. Elsevier BV.

TOMASELLI, Luisa. The microalgal cell. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** Oxford, Iowa: Blackwell Publishing, 2004. p. 1-19.

VIDOTTI, Annamaria Dória Souza. **Análise Proteômica, crescimento e composição celular da microalga *Chlorella vulgaris* sob autotrofia, mixotrofia e heterotrofia.** 2015. 191 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3^a ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 2005. v.1.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 6, p.1 – 4, 1960.