



Vasco Manuel Soares Jorge

Licenciado em Engenharia do Ambiente
(Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa)

Potencial de produção de bioetanol a partir da microalga *S. obliquus* utilizada na bioremediação de lixiviado de aterro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia das Energias Renováveis

Orientadora: Maria Margarida Boavida Pontes
Gonçalves, Professora Auxiliar da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa

Co-orientador: Mário Ventim Neves,
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Anabela Monteiro Gonçalves Pronto

Arguente: Prof. Doutora Alexandra de Jesus Branco Ribeiro

Vogal: Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Vasco Manuel Soares Jorge

Licenciado em Engenharia do Ambiente
Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa

**Potencial de produção de bioetanol a partir
da microalga *S. obliquus* utilizada na
bioremediação de lixiviado de aterro**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia das Energias Renováveis

Orientadora: Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Mário Ventim Neves, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Setembro 2017

Copyright

“Potencial de produção de bioetanol a partir da microalga *S. obliquus* utilizada na bioremediação de lixiviado de aterro”

Copyright © Vasco Soares Jorge, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Partes deste trabalho submetidas para publicação

Jorge V. S., Nobre C., Gonçalves M. and Mendes B., "Physical-chemical pretreatment and phytoremediation of landfill leachate: an integrated approach", *Book of Proceedings from the conference: WASTES: Solutions, Treatments and Opportunities*, p.277, Porto, Portugal, 26 de Setembro 2017.

Agradecimentos

A realização de qualquer projeto ao longo da vida, seja ele pessoal ou profissional, só se torna verdadeiramente especial se for feito com o apoio e a amizade das pessoas que estão ao nosso lado. Assim sendo, a presente dissertação não teria sido possível sem o contributo de um conjunto de pessoas a quem passo a expressar o meu profundo agradecimento:

À Professora Doutora Margarida Gonçalves por me ter dado a oportunidade de trabalhar neste tema e apoiado na orientação do mesmo. Agradeço-lhe por toda a disponibilidade, confiança e motivação dada ao longo deste ano, mas, especialmente, por ser um exemplo de conhecimento, brio e inspiração para a minha vida futura.

À Catarina Nobre, um muito obrigado não chega para retribuir tudo o que fizeste por mim durante esta etapa. Obrigado por toda a incansável dedicação, sempre disponível para esclareceres qualquer dúvida que eu tivesse. Obrigado por todo o conhecimento científico que me deste, por seres um exemplo de profissionalismo e integridade. Obrigado por toda a amizade e carinho, por aturares a minha teimosia, as minhas manias, as minhas parvoíces. És um exemplo para todos nós, lá no laboratório. Sem ti esta tese não teria sido possível. Muito obrigado.

Ao Professor Doutor Mário Ventim Neves, coordenador do Mestrado de Engenharia das Energias Renováveis e co-orientador desta tese, pela presença e apoio ao longo do mestrado.

À Professora Doutora Benilde Mendes, Presidente do Departamento de Ciências e Tecnologia de Biomassa (DCTB), pelo apoio e amabilidade demonstrada. A todos os Professores, colaboradores e colegas do DCTB que contribuíram, de alguma forma, para a concretização desta dissertação.

Aos meus colegas de laboratório do dia-a-dia, Ricardo, Catarina Sousa, Mariana, Noe, Marcelo, Inês e Ana Paula, por toda a ajuda e espírito de equipa demonstrada ao longo deste trabalho. Obrigado a todos pelos momentos divertidos, de amizade e carinho essenciais para um bom ambiente de trabalho. Aos meus amigos de mestrado, em especial, Miguel, André e Hélio, mas também a todos os meus amigos que me acompanharam ao longo da minha licenciatura. Sem vocês este percurso académico não teria sido o mesmo.

Aos meus amigos de Cascais, em especial ao Thomas, Álvaro e Daniel, um muito obrigado por toda a amizade fundamental na conclusão desta etapa.

À Mariana, a minha melhor amiga, a pessoa com quem sempre pude contar desde o primeiro ano de faculdade até hoje. Obrigado por todos os momentos de amizade, de apoio, de gargalhadas e descontração. Obrigado por ficares sempre comigo até tarde, mesmo quando a Catarina Nobre dizia para não ficarmos sozinhos no laboratório. Obrigado por tudo “siamesa”.

À minha família: aos meus pais, irmãos, avós e tias por sempre acreditarem em mim e a quem devo tudo. Em especial à minha mãe Susana que sempre foi, é e será uma referência para mim de dedicação, fé e carinho.

Ao meu avô Manel

Resumo

A utilização da biomassa de microalgas como fonte alternativa e sustentável de energia tem vindo a ser desenvolvida nas últimas décadas, havendo um grande foco na produção de biocombustíveis líquidos a partir desta. Por outro lado, a gestão de resíduos é uma fonte de impactes económicos, sociais e ambientais derivados da sua deposição em aterro, nomeadamente, a geração de grandes volumes de lixiviado.

A presente tese consistiu no estudo da bioremediação do lixiviado de um aterro industrial por meio da microalga *Scenedesmus obliquus* e a avaliação da biomassa algal obtida como matéria-prima potencial para a produção de bioetanol. O estudo decorreu em três etapas: a) aplicação de um pré-tratamento ao lixiviado e caracterização do efluente pré-tratado, b) inoculação dos lixiviados pré-tratados com as microalgas e caracterização do efluente final e c) avaliação do potencial de produção de bioetanol a partir da biomassa algal produzida.

Foram realizados ensaios de pré-tratamento por precipitação química sob arejamento, tendo sido testadas diferentes condições reacionais. Posteriormente, foi realizada a caracterização físico-química dos efluentes pré-tratados. Verificou-se que a condição ótima de pré-tratamento com hidróxido de cálcio obteve valores de remoção para densidade ótica, SST CQO e NH_4^+ de 94%, 87%, 57% e 31%, respetivamente. Nas condições ótimas de pré-tratamento com cinzas de biomassa foram obtidas taxas de remoção de 99%, 58%, 61% e 77%, para os mesmos parâmetros referidos anteriormente. Com esta abordagem foi possível comprovar um grande potencial na aplicação cinzas de biomassa como agente precipitante, apresentando-se este resíduo como uma alternativa viável, sustentável e eficaz no pré-tratamento de lixiviado de aterro.

Na fase de bioremediação do lixiviado pré-tratado, efetuou-se a monitorização do crescimento das microalgas, observando-se produtividades médias nos reatores com lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio e cinzas de 9 e 19 $\text{mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, respetivamente. A caracterização do efluente final do reator com lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio permitiu a determinação de uma redução nos SST, CQO e NH_4^+ de 61%, 50% e 40%, respetivamente. No caso do reator contendo lixiviado pré-tratado com cinzas, as taxas de remoção para SST e CQO situaram-se nos 81% e 41%, porém para o NH_4^+ houve um aumento, possivelmente em resultado da morte da cultura na fase final do ensaio.

Finalmente, estudou-se o potencial de produção de bioetanol a partir da biomassa obtida. A realização de uma hidrólise ácida permitiu obter uma concentração de açúcares totais de 7,18 $\text{g}_{\text{eq.glucose}}.\text{L}^{-1}$, o que equivale a um rendimento teórico de bioetanol de 90 $\text{mg}_{\text{etanol}} / \text{g}_{\text{biomassa}}$. Este rendimento não foi elevado pois as microalgas têm teores de hidratos de carbono reduzidos mas podem ser utilizadas em combinação com outras matérias-primas mais ricas em açúcares e constituir uma fonte de nutrientes necessários às leveduras durante o processo de fermentação.

Palavras-chave: lixiviado de aterro, pré-tratamento, cinza de biomassa, bioremediação, microalgas, *S. obliquus*, bioetanol.

Abstract

The use of microalgae biomass as an alternative and sustainable source of energy has been largely studied in the last decades, with a great focus on the production of liquid biofuels. On the other hand, waste management is a source of economic, social and environmental impacts derived from landfill deposition, namely by generation of large volumes of landfill leachate.

The present dissertation consisted in the study of the bioremediation of an industrial landfill leachate using the microalgae *Scenedesmus obliquus*. After remediation the algal biomass was evaluated as a potential feedstock for bioethanol production.

This study was carried out in three stages: a) application of a chemical precipitation pretreatment to the leachate and characterization of the pretreated effluent, b) inoculation of microalgae in the pretreated leachate with final effluent characterization and c) evaluation of the produced algal biomass regarding bioethanol production.

Pretreatment tests were performed by chemical precipitation under aeration at different reactional conditions. Subsequently, the physical-chemical characterization of the pretreated effluents was carried out. It was verified that at the optimal treatment condition with calcium hydroxide the removal efficiencies obtained for optical density, TSS COD and NH_4^+ were 94%, 87%, 57% and 31%, respectively. For the optimal treatment condition using biomass ash it were attained removal rates of 99%, 58%, 61% and 77% for the same parameters described above. With this approach, it was possible to assess the great potential of the application of biomass ash as a precipitating agent, establishing this residue as a viable, sustainable and effective alternative in the pretreatment of landfill leachate.

In the bioremediation assays, the microalgae growth was monitored, with average biomass production yields for the reactors with leachate pretreated with calcium hydroxide and with biomass ash of 9 and 19 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectively. The final effluent composition from the reactor with leachate pretreated with calcium hydroxide presented reductions in TSS, COD and NH_4^+ of 61%, 50% and 40%, respectively. The final effluent composition of leachate pretreated with biomass ash showed removal efficiencies for TSS and COD of 81% and 41%, but the NH_4^+ value suffered an increase, possibly as a result of microalgae culture death in the final phase of the assay.

Finally, the potential of bioethanol production from the obtained algal biomass was evaluated. The acid hydrolysis yielded a total sugar concentration of 7.18 $\text{g}_{\text{glucose}}.\text{L}^{-1}$, which is equivalent to a theoretical bioethanol yield of 90 $\text{mg}_{\text{ethanol}} / \text{g}_{\text{biomass}}$. This yield wasn't high mostly because microalgae have reduced carbohydrate contents. Nevertheless, algae biomass can be used in combination with other raw materials richer in sugars and provide a source of nutrients needed by the yeasts during the fermentation process.

Keywords: landfill leachate, pretreatment, biomass ash, bioremediation, microalgae, *S. obliquus*, bioethanol.

Índice

| | |
|---|-------|
| Copyright | V |
| Partes deste trabalho submetidas para publicação | vii |
| Agradecimentos..... | ix |
| Resumo | xiii |
| Abstract | xv |
| Índice | xvii |
| Índice de figuras | xix |
| Índice de tabelas | xxiii |
| Lista de abreviaturas | xxv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Enquadramento e relevância do tema..... | 1 |
| 1.2 Objetivos e estrutura do trabalho | 2 |
| 2. ESTADO DA ARTE | 3 |
| 2.1 Perspetiva energética mundial | 3 |
| 2.2 Política energética da Europa e de Portugal | 3 |
| 2.3 Biomassa e biocombustíveis | 5 |
| 2.4 Bioetanol..... | 8 |
| 2.5 Microalgas..... | 10 |
| 2.6 Lixiviado de aterro | 32 |
| 3. METODOLOGIA..... | 47 |
| 3.1 Matérias-primas | 47 |
| 3.2 Caracterização do lixiviado de aterro | 48 |
| 3.3 Pré-tratamento físico-químico do lixiviado de aterro | 53 |
| 3.4 Bioremediação do lixiviado pré-tratado com a microalga <i>S. obliquus</i> | 55 |
| 3.5 Determinação do teor em açúcares presentes na biomassa algal | 58 |
| 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS | 61 |
| 4.1 Caracterização do lixiviado de aterro | 61 |
| 4.2 Caracterização do pré-tratamento físico – químico..... | 63 |
| 4.3 Bioremediação do lixiviado pré-tratado | 81 |
| 4.4 Avaliação do potencial de produção de bioetanol | 103 |
| 5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 107 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 111 |
| | xvii |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 - Esquema genérico do processo de produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas..... | 9 |
| Figura 2.2 - Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> observada ao microscópio..... | 11 |
| Figura 2.3 - Esquema genérico do processo de produção de microalgas. | 13 |
| Figura 2.4 - Sistema aberto (<i>raceway</i>) pertencente à Texas A&M AgriLife Research, Texas E.U.A. | 14 |
| Figura 2.5 - Sistema fechado (fotobioreatores tubulares) pertencente à Secil, Leiria Portugal. | 15 |
| Figura 2.6 - Esquema do método de secagem térmica para a biomassa algal..... | 20 |
| Figura 2.7 - Diferentes biocombustíveis produzidos a partir das microalgas e respetivas tecnologias de conversão..... | 23 |
| Figura 2.8 - Produto alimentar obtida a partir de biomassa de microalga comercializado pela empresa EnerGaia. | 28 |
| Figura 2.9 - Hierarquia da gestão de resíduos..... | 33 |
| Figura 2.10 - Lagoa de regularização para o lixiviado produzido no aterro..... | 37 |
| Figura 2.11 - Esquema representativo do processo de agregação dos ácidos húmicos (AH) na presença de iões Ca^{2+} (esferas). | 41 |
| | |
| Figura 3.1 - a: lixiviado bruto, b: <i>S. obliquus</i> , c: efluente de vacaria e d: cinza de biomassa..... | 47 |
| Figura 3.2 - Instalação dos ensaios de bioremediação. a) esquema e b) instalação real. | 56 |
| Figura 3.3 - Colheita e secagem das microalgas. a) centrifuga, b) recolha da biomassa após centrifugação e c) biomassa após secagem em estufa..... | 58 |
| Figura 3.4 - Reta de calibração utilizada na determinação dos açúcares totais. | 59 |
| Figura 3.5 - Reta de calibração utilizada na determinação dos açúcares redutores..... | 60 |
| | |
| Figura 4.1 - Percentagem de remoção para densidade ótica (600 e 540 nm) nas várias condições de pré-tratamento..... | 65 |
| Figura 4.2 - Evolução da cor do lixiviado nas várias condições de pré-tratamento..... | 65 |
| Figura 4.3 - Valores de pH e condutividade medidos para as várias condições e bruto..... | 66 |
| Figura 4.4 - Percentagem de remoção de SST nas várias condições de pré-tratamento..... | 67 |
| Figura 4.5 - Percentagem de remoção para a CQO nas várias condições de pré-tratamento.. | 68 |
| Figura 4.6 - Percentagem de remoção para o azoto total nas várias condições de pré-tratamento.. | 69 |
| Figura 4.7 - Valores de fósforo total medidos para as várias condições e bruto..... | 69 |
| Figura 4.8 - Percentagem de remoção para densidade ótica (600 e 540 nm) para C7 e C9..... | 70 |
| Figura 4.9 - Diferença na cor do lixiviado bruto e pré-tratado com $Ca(OH)_2$ (C7) e cinza (C9). | 72 |
| Figura 4.10 - Valores de pH e condutividade para as condições C7, C9 e bruto..... | 73 |
| Figura 4.11 - Valores de ST, SV, SF e SST para as condições C7, C9 e bruto..... | 74 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.12 - Valores para a CQO e CBO ₅ nas condições C7, C9 e bruto. | 75 |
| Figura 4.13 - Valores para cloretos e sulfatos nas condições C7, C9 e bruto..... | 76 |
| Figura 4.14 - Percentagem de remoção de azoto amoniacal para as condições C7 e C9. | 77 |
| Figura 4.15 - Valores para o fósforo total nas condições C7, C9 e bruto. | 78 |
| Figura 4.16 - Valores para o Al, Ca, Fe, K, Mg e Na nas condições C7 e C9 e bruto..... | 79 |
| Figura 4.17 - Valores para os metais pesados nas condições C7, C9 e bruto..... | 80 |
| Figura 4.18 - Curvas de variação da densidade ótica a 540 nm para as várias condições de bioremediação. | 82 |
| Figura 4.19 - Evolução das condições R2 e R3..... | 84 |
| Figura 4.20 - Evolução da remoção da CQO ao longo do ensaio para a condição R1 (lixiviado pré-tratado com Ca(OH) ₂). | 85 |
| Figura 4.21 - Evolução da remoção da CQO ao longo do ensaio para as restantes condições.85 | |
| Figura 4.22 - Comparação entre efluentes antes (esquerda) e após (direita) bioremediação. .. | 90 |
| Figura 4.23 - Percentagens de remoção para a condutividade nas diferentes condições de bioremediação relativamente ao pré-tratamento. | 91 |
| Figura 4.24 - Valores de SST antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas. | 92 |
| Figura 4.25 - Valores da CQO antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas. | 94 |
| Figura 4.26 - Percentagem de remoção para a CBO ₅ nas diferentes condições de bioremediação relativamente ao pré-tratamento. | 94 |
| Figura 4.27 - Valores de cloretos antes e depois da bioremediação para as diferentes condições. | 95 |
| Figura 4.28 - Valores de sulfatos antes e depois da bioremediação para as diferentes condições. | 96 |
| Figura 4.29 - Valores de NH ₄ ⁺ antes e depois da bioremediação para as diferentes condições. | 97 |
| Figura 4.30 - Valores de fósforo total antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas..... | 97 |
| Figura 4.31 - Valores de Al, Ca, Fe, K, Mg e Na antes da bioremediação para as várias condições. | 98 |
| Figura 4.32 - Valores de metais minoritários antes da bioremediação para as várias condições. | 99 |
| Figura 4.33 - Valores de Al, Ca, Fe, K, Mg, e Na depois da bioremediação para as várias condições. | 100 |
| Figura 4.34 - Valores de metais minoritários depois da bioremediação para as várias condições. | 101 |
| Figura 4.35 - Diagrama do potencial de produção de bioetanol a partir do sistema de bioremediação do presente estudo (<i>scale-up</i>). | 104 |

Índice de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 2.1 - Principais benefícios e desafios associados ao uso de biocombustíveis..... | 7 |
| Tabela 2.2 - Principais vantagens e desvantagens das três gerações de biocombustíveis..... | 8 |
| Tabela 2.3 - Valores de consumo de água, uso do solo e rendimento de biocombustível para diferentes culturas | 10 |
| Tabela 2.4 - Classificação taxonómica das microalgas consoante a sua pigmentação..... | 12 |
| Tabela 2.5 - Diferentes espécies de microalgas e respetiva produtividade de biomassa. | 12 |
| Tabela 2.6 - Principais vantagens e desvantagens dos sistemas de produção abertos e fechados. | 15 |
| Tabela 2.7 - Diferentes espécies de microalgas e o seu conteúdo em hidratos de carbono. | 24 |
| Tabela 2.8 - Características do lixiviado em função da idade do aterro | 34 |
| Tabela 2.9 - Valores limite de emissão na descarga de água residuais, de acordo com o Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto..... | 36 |
| Tabela 2.10 - Métodos de tratamento do lixiviado de aterro e respetivas eficiências de remoção consoante as características do lixiviado..... | 38 |
| | |
| Tabela 3.1 - Valores utilizados para a determinação da CBO ₅ na metodologia utilizada neste trabalho..... | 51 |
| Tabela 3.2 - Identificação das diferentes condições de pré-tratamento em estudo na primeira fase de pré-tratamento. | 54 |
| Tabela 3.3 - Identificação das diferentes condições de pré-tratamento em estudo na segunda fase de pré-tratamento. | 55 |
| Tabela 3.4 - Condições selecionadas para os ensaios de bioremediação com <i>S. obliquus</i> | 57 |
| | |
| Tabela 4.1 - Caracterização do lixiviado de aterro utilizado no estudo. | 61 |
| Tabela 4.2 - Caracterização das condições testadas na 1.ª fase do pré-tratamento físico-químico do lixiviado. | 64 |
| Tabela 4.3 - Caracterização das condições testadas na 2.ª fase do pré-tratamento físico-químico do lixiviado. | 71 |
| Tabela 4.4 - Concentrações de biomassa no final dos ensaios e produtividades médias para cada condição testada. | 83 |
| Tabela 4.5 - Caracterização das condições testadas antes da bioremediação do lixiviado pré-tratado. | 87 |
| Tabela 4.6 - Caracterização das condições testadas após a bioremediação do lixiviado pré-tratado. | 88 |
| Tabela 4.7 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para as medições de açúcares totais e açúcares redutores da biomassa algal. | 103 |

Lista de abreviaturas

Siglas e símbolos

bs – base seca
CQO – carência química de oxigénio
CBO₅ – carência bioquímica de oxigénio
Ca(OH)₂ – hidróxido de sódio
ETAR – estação de tratamento de águas residuais
ETAL – estação de tratamento de águas lixiviantes
GEE – gases com efeito de estufa
HSF – hidrólise separada de fermentação
IEA – *Internacional Energy Agency*
NH₄⁺ - azoto amoniacal
OI – osmose inversa
PCI – poder calorífico inferior
SFS – sacarificação e fermentação simultâneas
UE – União Europeia
VLE – valor limite de emissão

Unidades

%(v/v) – percentagem volúmica
d - dia
g – grama
g.L⁻¹ – grama por litro
g_{eq. glucose} – grama equivalente de glucose
GJ – giga Joule
Gtep – giga tonelada equivalente de petróleo
°C – grau Celsius
h – hora
kg – quilograma
kPa – quilo Pascal
L – litro
mL – mililitro
µmol – micromole
µm – micrómetro
mg.L⁻¹ – miligrama por litro
m² – metro quadrado
m³ – metro cúbico
MJ.kg⁻¹ – mega Joule por quilograma
min. - minuto
m/m – razão mássica
nm - nanómetro
s - segundo
t – tonelada

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enquadramento e relevância do tema

O paradigma energético mundial está assente, maioritariamente, na produção e consumo de recursos energéticos fósseis, conduzindo a uma multitude de consequências económicas, sociais e ambientais. A União Europeia, com a intenção de favorecer a segurança e a sustentabilidade energética, elaborou em 2007 o pacote europeu de energia/clima, no qual estabelece um conjunto de metas a atingir até ao horizonte 2020. Entre os vários desígnios presentes neste pacote encontra-se a contribuição cada vez maior do setor das renováveis, com Portugal em lugar de destaque, apresentando uma quota na produção de energia elétrica renovável de 52%.

Paralelamente, o elevado crescimento demográfico nos centros urbanos conduz à geração de elevadas quantidades de resíduos. Em Portugal cerca de 42% dos resíduos produzidos foram encaminhados para aterros, induzindo vários impactes entre os quais, a produção de grandes volumes de lixiviado de aterro. Este efluente é caracterizado pela presença de uma componente orgânica e inorgânica elevada, sendo sujeito a um processo de tratamento convencional, no qual se destaca a osmose inversa. Apesar da elevada eficiência de remediação desta última, os custos energéticos e de manutenção das membranas impõem a necessidade de encontrar métodos mais sustentáveis, capazes de serem integrados nos sistemas de tratamento convencionais.

Surge assim a oportunidade, tema desta dissertação, de bioremediar o lixiviado de aterro por meio de microalgas. Estes microrganismos, a maioria fotossintéticos, apresentam a capacidade de remover eficientemente a carga orgânica e inorgânica presente no lixiviado. Além disso, determinadas espécies tendem a suportar condições adversas do meio, resistindo a níveis de poluição elevados, o que as torna adequadas para o tratamento de lixiviados. Importa salientar que, antes dos métodos de tratamento biológicos convencionais, é comum aplicar-se uma etapa de pré-tratamento físico-químico ao lixiviado. Com isto, é possível potenciar a eficiência dos métodos biológicos e alcançar uma qualidade final do efluente mais apreciável.

No final da remediação, a biomassa algal obtida pode ainda ser valorizada, sendo que uma das vias possíveis consiste na produção de um biocombustível, como é o caso do bioetanol. Embora, nas últimas décadas a investigação se tenha centrado, essencialmente, na produção de biodiesel a partir de algas, tem havido um esforço da comunidade científica no estudo do potencial de produção de bioetanol. Torna-se assim possível, diversificar o mercado dos combustíveis, estabilizar as flutuações dos preços e criar novas possibilidades de negócios.

O trabalho incluiu ainda o desenvolvimento de um sistema de pré-tratamento do lixiviado de aterro, de forma a baixar alguns parâmetros que contribuem para a sua recalcitrância e toxicidade, e assim tornar possível o passo de bioremediação com microalgas. Nesta etapa

utilizaram-se cinzas de biomassa o que constitui também uma forma de valorização deste resíduo.

Este resíduo é produzido em largas quantidades e encaminhado sobretudo para aterros, emergindo assim uma oportunidade de economia circular.

1.2 Objetivos e estrutura do trabalho

O objetivo principal deste trabalho centrou-se no estudo da bioremediação de um lixiviado de aterro por meio da microalga *Scenedesmus obliquus* e, por sua vez, o aproveitamento da biomassa algal obtida como matéria-prima para a produção de bioetanol.

Devido ao elevado nível de contaminação do lixiviado estudado, foi necessário proceder a um pré-tratamento físico-químico, por precipitação química com agitação. Para isso foram utilizados dois agentes de precipitação, hidróxido de cálcio (agente de precipitação convencional) e cinzas de biomassa (resíduo), este último com o intuito de contribuir para a sustentabilidade do processo.

Assim, de forma a atingir estes objetivos, o trabalho foi estruturado da seguinte forma:

- Realização do pré-tratamento por precipitação química em diferentes condições, variando a razão mássica, o tipo de agente de precipitação e o tempo de contato;
- Caracterização do lixiviado bruto e pré-tratado nas diferentes condições estudadas através da análise de diversos parâmetros físico-químicos;
- Ensaio de bioremediação, do lixiviado pré-tratado, com a microalga *S. obliquus*, monitorização do crescimento da microalga;
- Separação do efluente pré-tratado e biomassa algal. Caracterização do efluente final tratado e hidrólise da biomassa;
- Avaliação do potencial de produção de bioetanol através da determinação da concentração de açúcares fermentáveis presentes no hidrolisado.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Perspetiva energética mundial

A evolução do setor energético no último século permitiu alcançar objetivos cada vez mais ambiciosos no que respeita ao crescimento económico mundial. A utilização de recursos energéticos fósseis de baixo custo conduziu a grandes avanços industriais e tecnológicos, bem como a uma melhoria da qualidade de vida das populações. No entanto, à medida que o consumo energético mundial aumentava a par com o crescimento demográfico, sérios problemas económicos, sociais e ambientais começaram a surgir.

Atualmente, o sistema económico mundial baseia-se, maioritariamente, em recursos energéticos fósseis o que se traduz num aumento da vulnerabilidade energética, das falhas na segurança de aprovisionamento, das flutuações dos preços da energia, bem como numa intensificação das alterações climáticas, em parte causadas pelas elevadas emissões de gases com efeito de estufa (GEE). Segundo dados estatísticos da *Internacional Energy Agency* a produção primária de energia mundial em 2014 alcançou os 13,7 Gtep dos quais 81% foram obtidos a partir de recursos energéticos fósseis (IEA, 2016).

Surge assim a urgência de medidas de natureza política e técnica que permitam alterar os padrões de consumo de energia para níveis mais sustentáveis e que ao mesmo tempo garantam uma maior e melhor segurança energética no futuro. Isto torna-se possível com a criação de várias estratégias de ação, nas quais se destaca o processo de transição para fontes de energia renováveis.

Embora o uso de fontes de energia renovável remonte há vários séculos, a importância que representam nos dias de hoje é sem dúvida diferente. A inevitável redução das reservas fósseis, o surgimento de economias emergentes com necessidades energéticas cada vez maiores, a instabilidade geopolítica estabelecida em determinadas zonas do planeta, e as consequências ambientais do uso intensivo da energia fóssil, são algumas das razões que promovem a utilização de tecnologia renovável. As fontes de energia renovável contribuíram 19,2% para o consumo final de energia em 2014 e com 23,7% para a produção de energia elétrica em 2015 no planeta (REN21, 2016). Relativamente às diferentes tecnologias renováveis na produção de energia elétrica em 2015, a hidroelétrica continua a ter a maior quota (16,6%) seguida do setor da eólica (3,7%) e da bioenergia (2,0%). Contudo, ao analisar o crescimento de cada tecnologia no período 2010-2015 verificou-se uma grande expansão do solar fotovoltaico (42%) e do solar térmico concentrado (35%) (REN21, 2016).

2.2 Política energética da Europa e de Portugal

A União Europeia (UE) pretende alcançar uma política energética segura, competitiva e sustentável e com esse propósito foi necessário estabelecer determinados objetivos

estratégicos. Entre os vários objetivos definidos destaca-se o fornecimento seguro de energia a preços acessíveis, a promoção de um mercado de energia competitivo, a redução da vulnerabilidade externa e a promoção de um consumo sustentável de energia como forma de combate às alterações climáticas (Comissão Europeia, 2017).

Tendo a UE identificado os principais desafios do setor energético, surge então em 2007 o pacote legislativo de energia/clima proposto pela Comissão Europeia. Essencialmente, este pacote abrange um conjunto de metas que os vários estados-membros se comprometem a alcançar até ao horizonte 2020. As principais metas incluídas são as seguintes: redução em 20% nas emissões de GEE; 20% para a quota global de energia proveniente de fontes renováveis e uma melhoria da eficiência energética em 20% e 10 % para a quota de biocombustíveis no consumo de gasolina e gasóleo pelos transportes. Além disto, foram definidas metas vinculativas para cada estado-membro, tendo estas sido definidas consoante a capacidade económica, social, tecnológica e legislativa de cada estado (Comissão Europeia, 2008). Este pacote de energia/clima está contemplado na Diretiva 2009/28/CE, na qual se promove a utilização de energia proveniente de fontes renováveis, tendo sido alterada em 2015 pela Diretiva (EU) 2015/1513 (Comissão Europeia, 2009; Comissão Europeia, 2015).

De acordo com estatísticas recentes, o esforço comunitário realizado permitiu reduzir, em 2015, mais de 22% as emissões de GEE relativamente a 1990 (EUROSTAT, 2017a) e uma quota global de renováveis de 16,7% (EUROSTAT, 2017b). Embora tenha havido um progresso significativo, por forma a cumprir as metas para 2020 e para o novo pacote 2030, é necessário implementar novas políticas que salvaguardem os interesses da UE. Em termos de fontes renováveis na UE-28, a principal corresponde à biomassa e resíduos contribuindo com 63,5% para energia primária produzida, seguida da hídrica e eólica com 14,3% e 12,7%, respetivamente (EUROSTAT, 2017b).

Relativamente à situação portuguesa, em 2007 o país apresentava uma dependência energética fóssil de aproximadamente 82,5% (DGEG, 2016), muito acima dos 53% correspondentes à média europeia (EUROSTAT, 2017c). Além disso, o risco de incumprimento das metas definidas no protocolo de Quioto, juntamente com a frágil conjuntura económica e financeira, conduziu a um panorama complexo e de difícil solução à vista. Todavia, o investimento em tecnologia renovável permitiu a Portugal destacar-se como um dos países com maior incorporação de renováveis no *mix*-energético, designadamente, o setor da eólica com um crescimento anual na potência média instalada de 65% entre o período de 2001 e 2007 (Ferreira and Martins, 2009).

Surge então a necessidade de traçar novos objetivos e orientações estratégicas, tendo como base as metas definidas pela Diretiva 2009/28/EC que teriam que estar consagradas nos Planos Nacionais de Ação para as Energias Renováveis (PNAER) dos vários estados membros. É então que em 2010, o XVII Governo Constitucional publica em Diário da República a Resolução do

Conselho de Ministros n.º 29/2010 que estabelece uma nova estratégia energética colocando em evidência as medidas consagradas na ENE (Estratégia Nacional para a Energia) 2020¹. Com esta define-se a aposta nas fontes de energia renovável de modo a que em 2020 representem 31% de toda a energia consumida (acima da meta dos 20% proposta pela Comissão Europeia) e 60% da energia elétrica consumida. Em 2014 o consumo final bruto de energia a partir de renováveis situou-se nos 27%, enquanto a produção de energia elétrica a partir de renováveis alcançou os 52% (meta de 45%), o que mostra o verdadeiro esforço para mudar o paradigma energético (REN21, 2016). Tudo isto conduzirá a uma redução estimada de 10 milhões de toneladas de CO₂ até 2020, bem como de 25% do saldo importador energético.

2.3 Biomassa e biocombustíveis

De acordo com a Diretiva (EU) 2015/1513 entende-se por biomassa “a fracção biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fracção biodegradável dos resíduos industriais e urbanos”. Assim, a partir da definição anterior, é possível concluir que o termo biomassa engloba uma variedade de materiais orgânicos com composições e origens distintas, permitindo com isso aumentar o potencial de utilização deste recurso.

A biomassa apresenta importantes benefícios ambientais, económicos e sociais sendo uma alternativa estratégica na mudança do paradigma energético mundial.

Esta matéria-prima pode ser classificada como um recurso energético renovável, praticamente neutro em termos de emissões de carbono. Teoricamente, para a produção de uma dada quantidade de biomassa foi necessário remover uma dada quantidade de CO₂ da atmosfera, sendo este último libertado de novo aquando da combustão dessa mesma biomassa. Contudo, este balanço não será totalmente neutro, visto que na prática o processo de conversão energético da biomassa envolve um conjunto de etapas (e.g. colheita, transporte, processamento) que consomem recursos energéticos fósseis. Assim, quanto mais sustentável for o processo de conversão, mais próximo se aproxima de um balanço neutro (Demirbas, 2001).

Além disso, a utilização da biomassa permite reduzir a quantidade de resíduos que são encaminhados para os aterros reduzindo assim o impacto destes últimos sobre os vários compartimentos ambientais (Demirbas, 2001). Uma cadeia “resíduo-energia” resulta numa gestão mais eficiente dos resíduos produzidos, oportunidade para o surgimento de novos produtos, bem como uma contribuição para a redução das emissões de GEE (OECD/IEA, 2017).

Relativamente aos aspetos económicos e sociais, como se trata de um recurso endógeno presente na maioria dos países, o uso da biomassa conduz a uma menor dependência

¹ Atualmente esta resolução foi revogada pela Resolução do Conselho de Ministros nº 20/ 2013, de 10 de abril.

energética, reduzindo a importação de combustíveis fósseis e promovendo assim uma economia mais segura e sustentável (McKendry, 2002). A utilização deste recurso permite dar novas oportunidades para as populações de zonas rurais e gerar emprego (Demirbas, 2001)

Porém, a exploração deste recurso deverá seguir práticas sustentáveis que permitam prevenir ou mesmo impedir situações de desequilíbrio. Um destes casos corresponde à alocação de terrenos agrícolas para a produção de culturas energéticas, levando à depleção de recursos minerais e hídricos importantes para a produção de culturas alimentares. A destruição de vastas áreas de floresta autóctone com o intuito de produzir monoculturas florestais de crescimento rápido leva à redução da diversidade biológica, bem como a perda de atividades económicas e sociais. Por outro lado, o transporte da biomassa para os centros de processamento continua a ter um custo significativo nos custos totais do processo de produção (Demirbas, 2001).

Apesar da grande variabilidade que o recurso biomassa representa, este pode ser convertido, de uma forma genérica, em três tipos de produtos: calor/energia elétrica, combustível e matéria-prima (McKendry, 2002).

Relativamente aos combustíveis, a Diretiva (EU) 2015/1513 define o termo biocombustível como sendo “*combustíveis líquidos ou gasosos para os transportes, produzidos a partir de biomassa*”. Além disso, a mesma diretiva estabelece critérios de sustentabilidade para os biocombustíveis que deverão ser cumpridos a fim de se alcançarem os objetivos estratégicos definidos pela UE.

Em 2015, o consumo mundial de biocombustíveis para transportes alcançou os 4% (OECD/IEA, 2017), valor bastante inferior aos 58% de energia primária de origem fóssil consumida pelo setor dos transportes (Savaliya et al., 2015a). Embora haja vários desafios impostos ao setor, a utilização de biocombustíveis apresenta um conjunto de benefícios importantes de salientar (tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Principais benefícios e desafios associados ao uso de biocombustíveis (Savaliya et al., 2015; Voloshin et al., 2016).

| Benefícios | Desafios |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Reduzidas emissões de GEE (\approx neutro) - Reduzida formação de compostos tóxicos após a combustão - Qualidades semelhantes aos combustíveis fósseis (sem necessidade de alterar os motores) - Fornecimento contínuo da matéria-prima ao longo do ano - Aumento da segurança energética - Redução da dependência externa - Capacidade de utilização de resíduos | <ul style="list-style-type: none"> - Ocupação de terrenos agrícolas e florestais (competição direta com a produção de alimentos) - Redução da biodiversidade - Criação de cadeias de recolha de resíduos de biomassa |

Uma das formas mais comuns de classificar os biocombustíveis consiste em separá-los em gerações, sendo estas distinguidas conforme a origem da matéria-prima e a tecnologia de conversão utilizada para produzir o biocombustível (Naik et al., 2010; Savaliya et al., 2015). Existem fundamentalmente três tipos de gerações de biocombustíveis, cada uma apresentando vantagens e desvantagens (tabela 2.2).

A primeira geração distingue-se das restantes ao utilizar culturas alimentares ricas em açúcares (e.g. cana-de-açúcar), amido (e.g. trigo, milho) e óleo (e.g. girassol, soja), sendo o bioetanol, o biodiesel e o biogás os principais combustíveis produzidos (Naik et al., 2010; Voloshin et al., 2016). Os processos de conversão aplicados são a fermentação e a transesterificação, caracterizando-se pela sua simplicidade e tecnologia acessível (Savaliya et al., 2015a; Voloshin et al., 2016). Atualmente os líderes mundiais em termos de produção de etanol são os E.U.A. (milho) e o Brasil (cana-de-açúcar), estando as produções mundiais na ordem dos 94 mil milhões de litros em 2014 (REN21, 2017; UNCTAD, 2016).

A segunda geração de biocombustíveis resulta da utilização de biomassa lenhocelulósica o que inclui tantos os resíduos agrícolas e florestais, bem como culturas energéticas dedicadas (e.g. álamo, salgueiro, gramíneas) (Naik et al., 2010; Savaliya et al., 2015). Nesta geração é possível seguir duas vias diferentes em termos de processos de conversão, os termoquímicos e os bioquímicos, apresentando um grau de sofisticação mais elevado comparado com os da geração anterior. A partir dos vários processos obtém-se diferentes produtos tais como, o bioetanol, o *diesel* Fischer-Tropsch e o *syngas* (Naik et al., 2010).

Tabela 2.2 - Principais vantagens e desvantagens das três gerações de biocombustíveis (Jambo et al., 2016; Naik et al., 2010; Razack and Surendhiran, 2016; Savaliya et al., 2015; Voloshin et al., 2016).

| | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------|---|--|
| 1.ª Geração | <ul style="list-style-type: none"> - Simples - Económica - Tecnicamente bem estabelecida | <ul style="list-style-type: none"> - Utilização de culturas alimentares (energia vs. alimentos) - Baixa eficiência do uso do solo (pequena fração da biomassa é convertida) - Depleção de recursos minerais e hídrico em solos com potencial agrícola - Destruição de biodiversidade - Flutuações dos preços nos mercados de bens alimentares |
| 2.ª Geração | <ul style="list-style-type: none"> - Utilização de culturas não-alimentares e resíduos agroflorestais - Maior eficiência do uso do solo (grande parte da biomassa é convertida) - Ocupação em solos com baixo potencial agrícola | <ul style="list-style-type: none"> - Dificuldades técnicas no pré-tratamento da biomassa - Necessidade de maiores investimentos - Maior área para as instalações de processamento - Destruição da biodiversidade |
| 3.ª Geração | <ul style="list-style-type: none"> - Elevada produtividade de biomassa - Ocupação de solos com baixo potencial agrícola - Elevada eficiência do uso do solo - Pré-tratamento relativamente fácil - Utilização de efluentes contaminados (remediação e fonte de nutrientes) - Diversidade de sub-produtos com valor acrescentado | <ul style="list-style-type: none"> - Investimentos elevados - Dificuldades no <i>scale-up</i> |

A terceira geração de biocombustíveis corresponde à utilização de microrganismos, tais como as microalgas, possibilitando a produção de uma variedade de combustíveis, sendo uma abordagem relativamente recente que permite responder a um conjunto de desafios associados às gerações anteriores (Voloshin et al., 2016). No que respeita às microalgas, a investigação como potencial fonte de produção de combustíveis surge nas décadas de 30 e 40 do século XX, com o despoletar da 2.ª Guerra Mundial. Mais tarde, em 1970 com a crise do petróleo, as microalgas voltaram a ser alvo de interesse, particularmente, na produção de combustíveis alternativos aos fósseis (Baicha et al., 2016). Atualmente, a produção de biocombustíveis a partir de algas apresenta uma abordagem mais sustentável ao utilizar águas contaminadas, como é o caso de águas residuais domésticas e industriais, como meio de crescimento para as microalgas. Deste modo é possível criar um sistema integrado, no qual a produção de biocombustíveis e a remediação de efluentes ocorrem em simultâneo (Maity et al., 2014; Saladini et al., 2016).

2.4 Bioetanol

O bioetanol é um combustível líquido produzido a partir de matérias-primas ricas em açúcares simples, amido ou celulose, largamente utilizado no setor dos transportes. Este biocombustível obtém-se através de um processo de fermentação alcoólica, no qual os hidratos de carbono complexos são previamente hidrolisados em açúcares simples antes de serem convertidos em bioetanol e CO₂ por meio de leveduras (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*) ou bactérias (e.g.

Zymomonas mobilis). Na figura 2.1 está representado o esquema genérico do processo de produção de bioetanol, estando descritas as principais matérias-primas utilizadas e as etapas fundamentais.

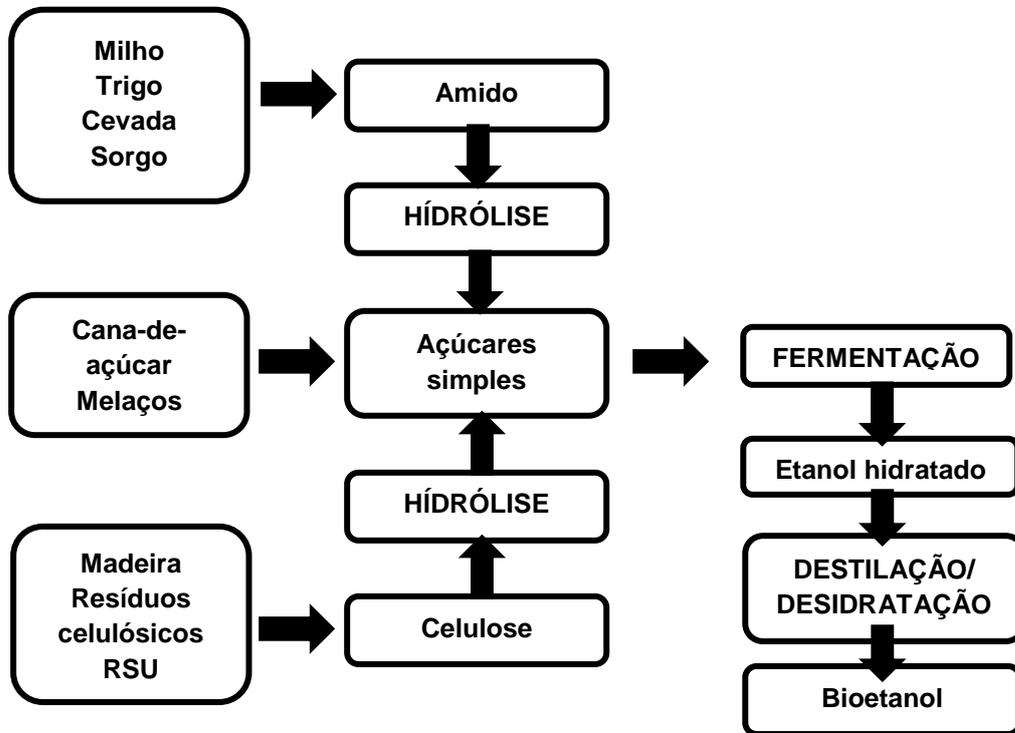


Figura 2.1 - Esquema genérico do processo de produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas (fonte: autor).

Tal como demonstrado na figura 2.1, após a etapa de fermentação, o etanol atravessa um processo de purificação consistindo fundamentalmente na destilação e desidratação do mesmo. No processo de destilação, a mistura resultante da fermentação é aquecida, havendo separação dos vários produtos consoante a sua componente volátil (Jambo et al., 2016). No final, após se ter verificado se o bioetanol cumpre com as normas de qualidade estabelecidas, este pode ser utilizado diretamente como combustível ou ser incorporado na gasolina.

De entre as várias matérias-primas passíveis de serem utilizadas na geração de bioetanol, a biomassa de microalgas começa a ter cada vez mais interesse. Uma das principais razões corresponde ao facto de estes microrganismos serem os maiores produtores de oxigénio do planeta, apresentando elevadas eficiências fotossintéticas. Algumas espécies apresentam um conteúdo em hidratos de carbono superior às culturas terrestres. Por outro lado, ao contrário das outras gerações de bioetanol, as microalgas não competem com a produção de alimentos nem com a ocupação de terrenos férteis. Outra vantagem das microalgas relativamente a outras culturas, particularmente as lenhocelulósicas, corresponde à quase inexistência de lenhina na sua composição, sendo possível desconsiderar a aplicação um pré-tratamento mais exigente (Castro et al., 2015; Markou et al., 2013). Os sistemas de produção podem ser integrados em

sistemas de remediação de efluentes contaminados, estes últimos fornecendo os nutrientes necessários ao crescimento das microalgas. Por fim, as microalgas contribuem entre 5 a 7 vezes mais para o sequestro de carbono comparado com outras culturas (Farias Silva and Bertucco, 2015; Lee et al., 2015b).

Na tabela 2.3 estão descritos os valores para o consumo de água, o uso do solo, bem como os rendimentos de biocombustíveis obtidos para várias culturas.

Tabela 2.3 - Valores de consumo de água, uso do solo e rendimento de biocombustível para diferentes culturas (Razack and Surendhiran, 2016).

| Matéria-prima | Consumo de água (m ³ .GJ ⁻¹) | Uso do solo (m ² .GJ ⁻¹) | Rendimento de biocombustível (L.ha ⁻¹) |
|--------------------|--|--|---|
| Trigo | 93 | 305 | 1560 |
| Milho (grão) | 50 | 133 | 3571 |
| Cana-de-açúcar | 50 | 81 | 5882 |
| Beterraba sacarina | 46 | 95 | 5000 |
| Soja | 383 | 386 | 1235 |
| Cassava | 148 | 79 | 6000 |
| Microalgas | <379 | 2 -13 | 24355 - 136886 |

Em suma, o uso de microalgas como fonte de produção de biocombustíveis, nomeadamente, de bioetanol, permite diversificar o mercado dos combustíveis, equilibrando os preços dos mesmos. Além disso, a utilização destes microrganismos apresenta inúmeras vantagens ambientais, contribuindo para a sustentabilidade do planeta.

2.5 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos eucariontes ou procariontes, de dimensões compreendidas entre os 5-100 µm (Ren, 2014; Votano et al., 2004), que têm a capacidade de converter a energia luminosa proveniente do sol em energia química utilizando nutrientes (e.g. azoto, fósforo e sais minerais), dióxido de carbono e água. A figura 2.2 apresenta a microalga *Scenedesmus obliquus* observada ao microscópio. Estes microrganismos, maioritariamente aquáticos, apresentam uma estrutura unicelular que lhes confere taxas de crescimento elevadas e uma considerável capacidade de adaptação em condições ambientais extremas (Baicha et al., 2016; Moreno-Garcia et al., 2017). Este tipo de características, entre outras, faz destes organismos uma potencial fonte de biomassa para a produção de biocombustíveis.

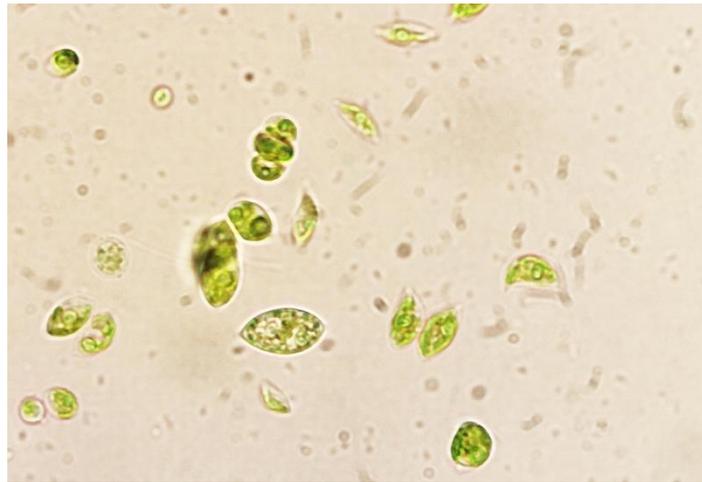


Figura 2.2 - Microalga *Scenedesmus obliquus* observada ao microscópio (fonte: autor).

Existe uma grande diversidade de espécies de microalgas, contudo, apenas 30000 dessas espécies apresentam características potencialmente interessantes, fazendo com que sejam utilizadas para os mais diversos fins (Baicha et al., 2016).

Em termos metabólicos, as microalgas podem ser classificadas em autotróficas e heterotróficas. As primeiras utilizam fontes de carbono inorgânico para produzir moléculas de hidratos de carbono, sendo estas as espécies geralmente utilizadas para a produção de bioetanol por fermentação dos açúcares. No caso das espécies heterotróficas, estas convertem o carbono orgânico em lípidos, podendo estes serem utilizados na produção de biodiesel (Brennan and Owende, 2010; Milano et al., 2016). Além destas duas vias metabólicas existe ainda a possibilidade das microalgas apresentarem um comportamento mixotrófico, isto é, a capacidade de obterem energia a partir de fontes orgânicas e inorgânicas (Brennan and Owende, 2010; Moreno-Garcia et al., 2017).

Existe uma diversidade de formas de classificar estes microrganismos, no entanto, uma das formas mais comuns é a sua coloração, estando diretamente relacionada com os pigmentos que constituem as suas células. Na tabela 2.4 estão representados os grupos geralmente descritos.

Tabela 2.4 - Classificação taxonómica das microalgas consoante a sua pigmentação (adaptado de Milano et al. 2016).

| Designação comum | Designação científica |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Diatomáceas | <i>Bacillariophyceae</i> |
| Algas amarelas-verdes | <i>Xanthophyceae</i> |
| Algas azuis-verdes (Cianobactérias) | <i>Cyanophyceae</i> |
| Algas douradas | <i>Chrysophyceae</i> |
| Algas verdes | <i>Chlorophyceae</i> |

Como referido, apenas um determinado número de espécies de microalgas são atualmente utilizadas em processos à escala industrial, visto apresentarem um conjunto de características que as tornam interessantes do ponto de vista da sua produção. Nesta fase, a engenharia genética tem alcançado uma otimização do processo de produção de microalgas através da seleção e/ou modificação de certas estirpes (Hlavova et al., 2015).

Em qualquer produção de microalgas à escala industrial existem determinadas características que têm um papel mais preponderante relativamente a outras. De entre todas estas é possível destacar a velocidade de crescimento, tolerância a variações de temperatura, pH e salinidade, velocidade de deposição, produtividade de amido e celulose (bioetanol), produtividade de óleo (biodiesel), resistência da parede celular e tipo de subprodutos (John et al., 2011; Razack and Surendhiran, 2016). A tabela 2.5 apresenta uma lista de espécies de microalgas lacustres e marinhas e a sua respetiva produtividade de biomassa.

Tabela 2.5 - Diferentes espécies de microalgas e respetiva produtividade de biomassa (adaptado de Mata et al. 2010; Razack & Surendhiran 2016).

| Espécie | Produtividade de biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹) |
|---------------------------------|---|
| <i>Botryococcus braunii</i> | 0,02 |
| <i>Chaetoceros calcitrans</i> | 0,04 |
| <i>Chlorella sp.</i> | 0,02 – 2,5 |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | 2,00 – 7,7 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 0,02 – 0,2 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 0,22 – 0,34 |
| <i>Haematococcus pluvialis</i> | 0,05 – 0,06 |
| <i>Isochrysis sp.</i> | 0,08 – 0,17 |
| <i>Nannochloropsis sp.</i> | 0,17 – 1,43 |
| <i>Nannochloropsis oculata</i> | 0,37 – 0,48 |
| <i>Scenedesmus sp.</i> | 0,03 – 0,26 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 0,004 – 0,74 |
| <i>Spirulina platensis</i> | 0,06 – 4,3 |
| <i>Spirulina maxima</i> | 0,21 – 0,25 |

2.5.1 Processo de produção de microalgas

O processo de produção de microalgas e a sua respetiva conversão num dado produto final consiste num conjunto de etapas que, embora possam apresentar algumas diferenças consoante o tipo de produto a obter, acabam por apresentar linhas comuns nos vários processos de conversão. A figura 2.3 apresenta o esquema genérico do processo de produção de microalgas.

A utilização de estrume proveniente do setor pecuário tem vindo a ser investigado como fonte de nutrientes para as microalgas, visto este ter grandes quantidades de azoto e fósforo, nutrientes essenciais para o crescimento de algas. Com isto seria possível eliminar os custos associados à suplementação das microalgas, conferindo ao mesmo tempo um novo uso para este subproduto do setor pecuário (Zhu and Hiltunen, 2016).

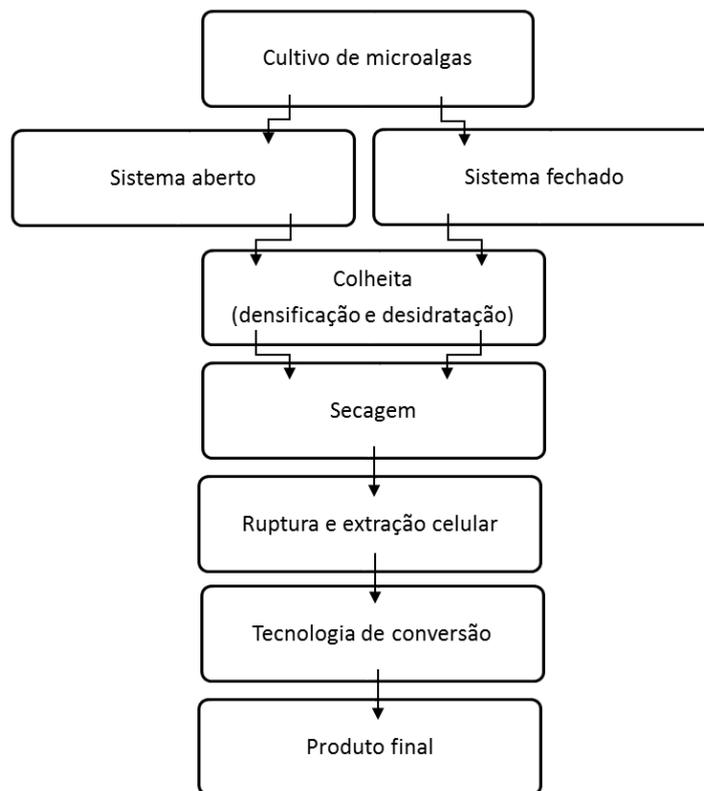


Figura 2.3 - Esquema genérico do processo de produção de microalgas (adaptado de Mata et al, 2010).

2.5.1.1 Sistemas de produção de microalgas

Relativamente aos sistemas de produção de microalgas é possível distinguir dois tipos principais, os sistemas abertos e os sistemas fechados, sendo que as principais diferenças entre estes dois tipos de sistemas encontram-se nas eficiências de produção e nos custos associados (Milano et al., 2016). Além disso, é importante referir que consoante a espécie de microalga utilizada, a tecnologia disponível e o processo de conversão biológico adotado o sistema de produção irá variar.

No caso dos sistemas abertos, umas das tipologias mais comuns e simples corresponde aos tanques abertos (*raceway ponds*), nos quais a água circula por meio de um mecanismo de pás promovendo uma melhor circulação e contacto das microalgas com os nutrientes e CO₂ introduzidos no meio (figura 2.4). Estes tanques caracterizam-se por serem pouco profundos de modo a facilitar a entrada da radiação, maximizando a sua utilização por parte das microalgas (Milano et al., 2016; Moreno-Garcia et al., 2017). As principais vantagens neste tipo de sistema são os baixos custos de operação e manutenção devido à sua estrutura simples. No entanto, devido ao facto de serem sistemas abertos, encontram-se consideravelmente mais expostos às condições do ambiente envolvente, nomeadamente a contaminações por outros microrganismos (e.g. bactérias), condições meteorológicas (e.g. variações de temperatura, radiação) e perdas por evaporação ou difusão de CO₂ para a atmosfera, levando a reduções das taxas de produtividade de biomassa (Milano et al., 2016; Pacheco et al., 2015).



Figura 2.4 - Sistema aberto (*raceway*) pertencente à Texas A&M AgriLife Research, Texas E.U.A. (fonte: phys.org).

No que diz respeito aos sistemas fechados, estes são compostos por foto-bioreatores podendo os mesmos apresentar diferentes configurações consoante os objetivos que se pretendem alcançar na produção. Na figura 2.5 apresenta-se, a título de exemplo, um sistema fechado de reatores com configuração tubular. Fundamentalmente, a estrutura de um foto-

bioreator consiste num reservatório plano ou cilíndrico de vidro ou plástico disposto na horizontal ou na vertical, apresentando um sistema de bombagem com o intuito de promover a circulação das microalgas evitando a deposição das mesmas (Milano et al., 2016; Pacheco et al., 2015).

De uma forma geral, nestes sistemas é possível atingir um nível de controlo sobre o meio de produção significativamente superior aos sistemas abertos, garantindo maiores eficiências na produtividade de biomassa. Além disso, como a exposição à radiação (natural e/ou artificial) é maximizada, bem como outros fatores (disponibilidade de nutrientes, CO₂), o intervalo de tempo entre colheitas acaba por ser menor, alcançando elevadas produtividades. As limitações destes sistemas estão geralmente associadas aos custos de instalação, operação e manutenção, havendo alguma dificuldade em *scale-up* (Milano et al., 2016; Moreno-Garcia et al., 2017).



Figura 2.5 - Sistema fechado (fotobioreatores tubulares) pertencente à Secil, Leiria Portugal (fonte: allma).

Na tabela 2.6 estão representadas as principais vantagens e desvantagens destes dois sistemas.

Tabela 2.6 - Principais vantagens e desvantagens dos sistemas de produção abertos e fechados (Bahadar and Bilal Khan, 2013; Brennan and Owende, 2010; Milano et al., 2016; Moreno-Garcia et al., 2017; Voloshin et al., 2016).

| | Vantagens | Desvantagens |
|-------------------------|--|--|
| Sistemas abertos | <ul style="list-style-type: none"> - Menores investimentos - Baixos custos de O&M - Sistema simples - Baixos consumos energéticos - Facilidade no <i>scale-up</i> | <ul style="list-style-type: none"> - Baixas produtividades de biomassa - Necessidade de extensas áreas de terra - Dificuldade no controlo dos parâmetros do meio de cultivo - Elevado grau de contaminação - Sujeito às condições meteorológicas - Limitação de espécies possíveis de serem utilizadas - Maiores consumos de água |

(continuação da tabela 2.6)

| | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------------|---|---|
| Sistemas fechados | <ul style="list-style-type: none"> - Maiores produtividades de biomassa - Não necessita de extensas áreas - Maior controlo dos parâmetros do meio de cultivo - Baixo grau de contaminação - Melhor utilização da radiação solar e CO₂ - Menor dependência das condições meteorológicas - Possibilidade de produção de monoculturas para um dado sub-produto - Utilização mais eficiente do uso da água | <ul style="list-style-type: none"> - Maiores investimentos - Maiores custos de O&M - Sistema mais complexo - Maiores consumos energéticos - Dificuldade no <i>scale-up</i> |

2.5.1.2 Colheita

A colheita das microalgas consiste numa operação que tem como objetivo concentrar uma amostra significativamente diluída de microalgas numa pasta húmida contendo cerca de 25% sólidos suspensos totais (SST) (Shelef and Sukenik, 1984). Atualmente tem-se vindo a optar por uma combinação de vários métodos, com o intuito de alcançar maiores eficiências com menores custos. A escolha do(s) método(s) utilizado(s) deverá ter em conta o tipo de microalga e a sua respetiva densidade celular, bem como o produto que se pretende obter (Milano et al., 2016). A importância desta escolha prende-se com o facto de ser uma etapa capaz de contribuir com 20 a 30% dos custos totais da produção (Demirbas, 2010).

A etapa de colheita compreende duas fases: a fase de densificação (ou espessamento) e a fase de desidratação. A fase de densificação consiste em sujeitar a suspensão de microalgas a vários métodos que promovam o aumento até cerca de 2-7% de SST. No caso da fase de desidratação, como o próprio nome indica, pretende-se remover a água contida na biomassa algal após a fase de espessamento, alcançando entre 15-25% SST (Barros et al., 2015; Shelef and Sukenik, 1984). Dentro de cada uma destas fases existem vários métodos possíveis de serem aplicados, podendo estes ser métodos de base química, mecânica, elétrica ou biológica, apresentando cada um vantagens e limitações (Christenson and Sims, 2011).

2.5.1.2.1 Métodos químicos

Os métodos químicos baseiam-se na utilização de agentes químicos flocculantes e coagulantes, frequentemente utilizados numa fase inicial com o intuito de aumentar a dimensão das partículas facilitando posteriormente a sua separação do meio de cultura (Christenson and Sims, 2011). De uma forma geral, estes agentes químicos promovem a concentração das partículas/células em agregados, sendo que após um processo de aglomeração, formam-se flocos suficientemente densos e de dimensões significativas capazes de se depositarem por ação da gravidade (Barros et al., 2015). Pelo facto de ser um método simples e relativamente rápido, torna-se um dos mais atrativos. No entanto, apresenta algumas limitações em termos de custos de aquisição dos reagentes, contaminação das microalgas com metais, modificação do pH do meio, bem como as baixas taxas de recuperação destes reagentes no final do processo (Barros et al., 2015; Christenson and Sims, 2011; Gerardo et al., 2015).

2.5.1.2.2 Métodos mecânicos

No caso dos métodos mecânicos, existem várias abordagens possíveis, tais como a centrifugação, técnicas de filtração, sedimentação e a flotação por ar dissolvido (Christenson and Sims, 2011). A centrifugação consiste num método que utiliza a força centrífuga como forma de separação em função da densidade dos materiais (Gerardo et al., 2015). Normalmente a centrifugação é realizada após se terem efetuado as operações de floculação-coagulação, sendo um dos métodos mais eficientes e versáteis no que respeita ao tipo de microalga utilizado. Todavia, os consumos elevados de energia e os custos de equipamento e manutenção dos mesmos fazem da centrifugação um método inviável para instalações em grande escala (Barros et al., 2015; Christenson and Sims, 2011; Gerardo et al., 2015).

Relativamente à filtração existem diversos tipos, sendo que a sua escolha dependerá principalmente da dimensão das células das microalgas. Esta operação requer uma diferença de pressão no sistema capaz de promover a passagem das microalgas pela membrana ficando estas retidas na mesma (Barros et al., 2015; Gerardo et al., 2015). No caso de microalgas de dimensões de apenas alguns dezenas de micrómetros, é necessário aplicar métodos de ultrafiltração e microfiltração por membrana (Brennan and Owende, 2010). As vantagens principais da filtração são a sua elevada eficiência e reduzidos danos à integridade das microalgas, estando as limitações associadas aos custos de manutenção das membranas e bombagem (Barros et al., 2015).

No que respeita à sedimentação, este é considerado um dos métodos mais simples e com custos de operação e manutenção mais baixos, sendo por isso bastante aplicado em sistemas de produção de microalgas com o intuito de produzir biocombustíveis (Barros et al., 2015; Gerardo et al., 2015). Este método, baseado na Lei de Stokes, é conseguido devido à diferença de valores de densidade entre o meio aquoso e as microalgas, permitindo que estas se depositem no fundo dos tanques. Relativamente às velocidades de deposição, estas dependem

do tipo de microalga utilizada, variando de 0,4 a 2,2 m.d⁻¹ (Gerardo et al., 2015). Em termos de limitações, a sedimentação necessita de áreas relativamente grandes para a instalação dos tanques, sendo um processo algo moroso (Christenson and Sims, 2011). De modo a aumentar as velocidades de deposição é comum combinar a sedimentação com um método químico de coagulação-floculação aplicado previamente, facilitando o processo de colheita (Barros et al., 2015).

Por último, é possível aplicar ainda um outro método designado por flotação, consistindo na introdução de bolhas de ar (ou gás) no fundo dos tanques promovendo o transporte das partículas/células de microalgas para a superfície, permanecendo estas a flutuar até serem colhidas (Shelef and Sukenik, 1984). Este método requer que as células sejam hidrofóbicas para que possam aderir às bolhas de gás, sendo possível aumentar a adesão através de agentes coagulantes ou surfactantes (Barros et al., 2015; Gerardo et al., 2015). Vulgarmente utilizado em estações de tratamento de águas residuais (ETAR's), a flotação apresenta rendimentos de separação mais elevados comparativamente à sedimentação. Além disso, já foram realizados estudos com microalgas, nomeadamente com *C. vulgaris* que provam a facilidade em *scale-up* com custos de colheita relativamente baixos. A principal desvantagem é a necessidade de introduzir agentes químicos coagulantes no processo e os custos de determinados equipamentos (Barros et al., 2015; Christenson and Sims, 2011). A título informativo importa referir que este tipo de método tem diversas variantes tais como, a flotação por ar dissolvido, a flotação por ar disperso, a flotação eletrolítica e a flotação dispersa por ozonização, sendo o primeiro método o mais aplicado em grande escala (Barros et al., 2015).

2.5.1.2.3 Métodos biológicos

Os métodos biológicos baseiam-se na capacidade de floculação (sem adição de agentes químicos) de algumas espécies de microalgas. Existem dois tipos principais: a autofloculação e a biofloculação.

A autofloculação ocorre em situações de aumento do pH do meio (pH>9) em resultado do consumo de CO₂ dissolvido, levando a um fenómeno de supersaturação de iões cálcio e fosfato que interagem com a parede celular das microalgas. O aumento da concentração de iões cálcio conduz à precipitação dos iões fosfato de carga positiva, o que por sua vez promove a neutralização das cargas negativas da parede celular (Christenson and Sims, 2011; Gerardo et al., 2015). Por forma a aumentar o pH do meio, torna-se necessário reduzir o *input* de CO₂, sendo que Knuckey e colaboradores (2016) realizaram um estudo com a microalga *Scenedesmus* onde verificaram que um aumento do pH superior a 10 conduz à formação de flocos mais estáveis num menor período de tempo (Knuckey et al., 2006). Apesar de não ser necessário introduzir agentes químicos, o que reduz os custos de colheita, a autofloculação apresenta algumas condicionantes que levam a ponderar sua utilização em sistemas de produção de microalgas. A presença ou não dos iões de cálcio e fósforo no meio de cultura, o aumento da mortalidade das células em resultado dos elevados valores de pH e as baixas velocidade a que ocorre a

floculação poderão estar incluídas nas possíveis limitações deste método (Christenson and Sims, 2011; Gerardo et al., 2015).

No caso da biofloculação as microalgas floculam devido à presença de biopolímeros produzidos por outros microrganismos, tais como bactérias, algas ou fungos. Tal como a autofloculação, este método evita a adição de floclulantes químicos, reduzindo os custos de produção. Contudo, a introdução de um consórcio de microrganismos juntamente com as microalgas limita os usos deste método para a produção de alguns tipos de produtos finais (e.g. indústria alimentar, farmacêutica e cosmética) (Barros et al., 2015).

2.5.1.2.4 Métodos elétricos

Um outro conjunto de métodos baseados nas propriedades elétricas das microalgas têm sido testados, contudo ainda se encontram em desenvolvimento. Um desses métodos corresponde à eletroforese, na qual se aplica um campo elétrico capaz de concentrar as células das microalgas em flocos. Devido à eletrólise da água, forma-se hidrogénio no meio que adere aos flocos formados promovendo a sua subida para a superfície do tanque, sendo depois recolhidos (Christenson and Sims, 2011; Pragma et al., 2013). Apesar de ser um método que não necessita de adição de químicos e que garante a integridade das microalgas, a quantidade de energia necessária e o equipamento dispendioso tornam-no inviável para produções em larga escala (Barros et al., 2015; Pragma et al., 2013).

2.5.1.3 Secagem

Após a colheita da biomassa algal do meio de cultura, é necessário proceder à secagem do material. Esta etapa consiste na remoção do conteúdo em água da biomassa de modo a atingir um teor de humidade próximo dos 12% (Shelef and Sukenik, 1984). Tal como na etapa de colheita, a escolha do método de secagem irá influenciar tanto a qualidade do produto final, bem como os custos de obtenção do mesmo (Chen et al., 2015; Pohndorf et al., 2016). Torna-se importante referir que um teor elevado em água na biomassa é um fator inibidor durante a extração de lípidos e no processo de transesterificação para a produção de biodiesel (Lam and Lee, 2012). Apesar das várias vantagens que a operação de secagem oferece os custos associados são significativamente elevados, podendo contribuir com 70-75% do custo total da produção (Shelef and Sukenik, 1984). De entre os vários métodos de secagem destaca-se a secagem solar, a secagem em estufa, a secagem rotativa, a secagem por pulverização e a liofilização.

A secagem solar constitui um dos métodos mais simples e exequíveis, podendo ser efetuado de duas formas: exposição do material à radiação solar direta ou através de um secador solar.

O primeiro método consiste em distribuir uniformemente a biomassa, expondo-a diretamente à radiação, o que promove modificações nos pigmentos de clorofila alterando a cor e a textura

do produto final (Show et al., 2015). Apesar dos baixos custos associados, os longos períodos de tempo, a área necessária e a dependência das condições meteorológicas constituem obstáculos à utilização deste método (Chen et al., 2015). Além disso, o controlo sobre a qualidade do material é relativamente baixo, podendo ocorrer degradação devido a sobreaquecimento. De acordo com um estudo realizado por Guldhe e colaboradores (2014), utilizando a microalga *Scenedesmus* sp., os autores verificaram que a secagem solar constitui o método mais adequado para instalações em larga escala, mesmo tendo sido o método com maior tempo de secagem (72h) comparativamente à secagem em estufa (12h) e a liofilização (24h). Além disso, o mesmo estudo mostrou não ter havido diferenças significativas em termos do rendimento de lípidos extraídos posteriormente (Guldhe et al., 2014).

Alternativamente, existem os secadores solares que utilizam a energia térmica do sol armazenada num fluido circulando em sistema fechado (e.g. água), sendo que o calor proveniente do fluido permite secar a biomassa algal (figura 2.6). A grande vantagem deste método comparativamente ao anterior está no facto de ser possível controlar melhor a secagem, evitando fenómenos de sobreaquecimento (Show et al., 2015). No entanto, as limitações continuam a ser semelhantes às já mencionadas acrescentando os custos associados à instalação dos coletores solares térmicos.

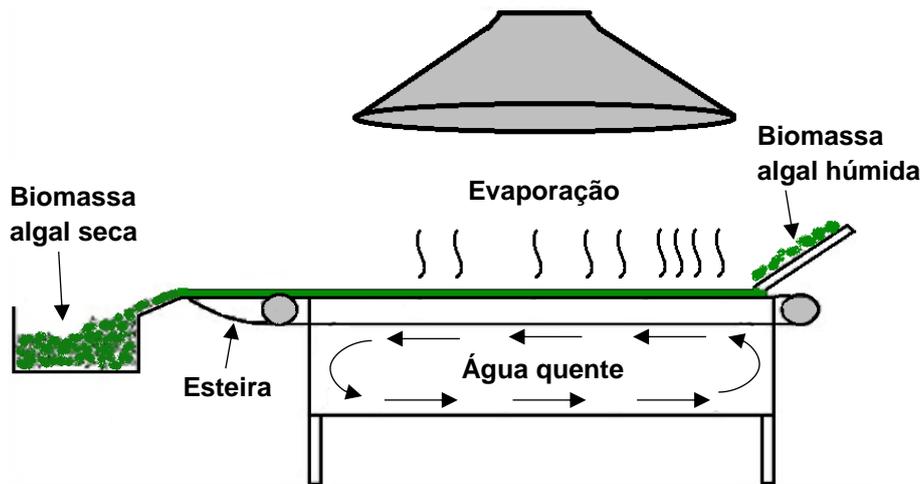


Figura 2.6 - Esquema do método de secagem térmica para a biomassa algal (Holanda and Ramos, 2015)

A secagem em estufa é outro método usualmente aplicado em laboratório por ser acessível, eficaz e relativamente rápido comparado a outros métodos (Guldhe et al., 2014). Este modo de secagem consiste em expor a biomassa a um fluxo de ar quente, durante um certo período de tempo (12 a 24h) e a uma dada temperatura (70 a 100°C). A principal limitação desta operação deve-se principalmente ao facto de ter um consumo energético intensivo, excluindo a possibilidade de ser aplicado em larga escala (Guldhe et al., 2014).

De seguida apresenta-se a secagem rotativa, na qual um cilindro rotativo inclinado encaminha a biomassa de uma extremidade para a outra, sendo que a humidade é removida através do contacto (direto ou indireto) da biomassa com gases quentes (Shelef and Sukenik, 1984; Show

et al., 2015). Este método é um dos mais utilizados para a secagem da biomassa algal, tendo-se verificado em vários estudos a possibilidade de alcançar um produto final de elevada qualidade usando *Scenedesmus* sp. (Show et al., 2015).

A secagem por pulverização (*spray drying*) corresponde a um método alternativo que consiste em utilizar a atomização de líquidos através da mistura de gases quentes e gotículas do líquido, dando origem a um produto de elevado valor comercial. O processo ocorre quando a pasta húmida proveniente da colheita é introduzida no topo do atomizador sob a forma de gotículas. Ao mesmo tempo gases quentes previamente aquecidos são encaminhados para o atomizador. A vantagem da atomização é permitir um aumento da área superficial de contacto entre o líquido (pasta húmida) e os gases quentes. De seguida esta mistura é encaminhada para a câmara de secagem onde ocorrerá a evaporação e seguidamente a separação das partículas sólidas no fundo da câmara. (Chen et al., 2015; Shelef and Sukenik, 1984; Show et al., 2015). A secagem da biomassa algal é facilmente atingida em poucos segundos, sendo que as principais limitações estão associadas ao elevado investimento, custos de operação significativos e baixas digestibilidades (Show et al., 2015).

Por último, existe ainda a liofilização, na qual a biomassa algal é congelada e, posteriormente, sujeita a pressões e temperatura significativamente baixas (e.g. 1kPa e - 40°C), conduzindo à formação de cristais de gelo. Estes cristais ao formarem-se no interior da célula promovem um aumento de porosidade da mesma, facilitando a extração dos constituintes internos (Lee et al., 2012). De facto, verificou-se que, comparativamente a outros métodos de secagem, a liofilização apresenta perdas na quantidade de proteína extraída inferiores a 10% (Chen et al., 2015), sendo uma das razões pela qual é utilizada como forma de obter produtos de alimentação humana. Tal como a secagem por pulverização, as principais condicionantes estão relacionadas com os consumos elevados de energia, elevados custos de operação e manutenção, bem como a possibilidade de haver rutura da parede celular levando a perda de qualidade do produto final (Lee et al., 2012).

2.5.1.4 Rutura e extração celular

Após completada a fase de secagem das microalgas é necessário proceder às operações de quebra das paredes celulares com o intuito de extrair os constituintes de interesse (e.g. óleos, açúcares, carotenoides). As etapas de rutura e extração podem ser conduzidas em separado ou em conjunto consoante o objetivo que se pretende alcançar na produção (Kim et al., 2016). Os tipos de métodos utilizados para a rutura das paredes celulares podem ser classificados como físicos/mecânicos, químicos ou enzimáticos (Razack and Surendhiran, 2016). Nem todos os métodos são possíveis de serem aplicados, isto porque dependem da espécie de microalga, do sistema de produção e do tipo de produto final que pretendemos obter. Por exemplo, no caso da produção de biocombustíveis, designadamente bioetanol, pretende-se aumentar a

disponibilidade de açúcares a partir dos hidratos de carbono que constituem o meio intracelular e as paredes celulares das microalgas.

Relativamente aos métodos físicos/mecânicos estes são dos mais aplicados, visto dependerem pouco da espécie de microalga e não promoverem a contaminação das mesmas, contudo os consumos energéticos são significativos comparados a outros métodos (Lee et al., 2012). Neste tipo de métodos destacam-se a técnicas por termólise (autoclave), ultrasonificação, micro-ondas, moinho de esferas e homogeneizador de alta pressão (Lee et al., 2012; Razack and Surendhiran, 2016).

No caso dos métodos químicos, estes caracterizam-se por serem mais eficientes em termos de consumo de energia comparados com os métodos físicos, mais fáceis de aplicar em larga escala, contudo podem conduzir a contaminações nas algas e destruição dos produtos finais de interesse (Kim et al., 2016). O uso de ácidos e bases é de longe o mais aplicado, sendo que o primeiro apresenta melhores resultados. Num estudo de Razack e Surendhiran (2016), realizado com *C. vulgaris*, a utilização de ácido sulfúrico 1% apresentou uma eficiência próxima dos 94% comparativamente a um pré-tratamento enzimático que alcançou aproximadamente os 90% (Razack and Surendhiran, 2016).

Por último, temos os métodos enzimáticos, que se distinguem dos anteriores por terem elevadas eficiências, baixos consumos energéticos e não serem prejudiciais para as microalgas. As principais limitações estão relacionadas com a velocidade do processo e no custo obtenção das enzimas específicas para a espécie de microalga com que se está a trabalhar (Razack and Surendhiran, 2016).

Após terminada a etapa de extração é necessário aplicar a tecnologia de conversão adequada ao produto final que se pretende obter. Na secção seguinte irá abordar-se as várias aplicações para a biomassa algal produzida, destacando-se a produção de bioetanol, tema desta dissertação.

2.5.2 Aplicações de biomassa algal

2.5.2.1 Produção de biocombustíveis

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas é atualmente um dos campos de investigação científica mais estudados, em resultado da urgência cada vez maior em diversificar o setor energético global. Os principais biocombustíveis produzidos a partir de microalgas são o biodiesel, o bioetanol, o biometanol, o bio-óleo e o biohidrogénio (Bahadar and Bilal Khan, 2013; Lam and Lee, 2012). Na figura 2.7 está representado um esquema com os diferentes biocombustíveis produzidos a partir de microalgas e a respetiva tecnologia de conversão.

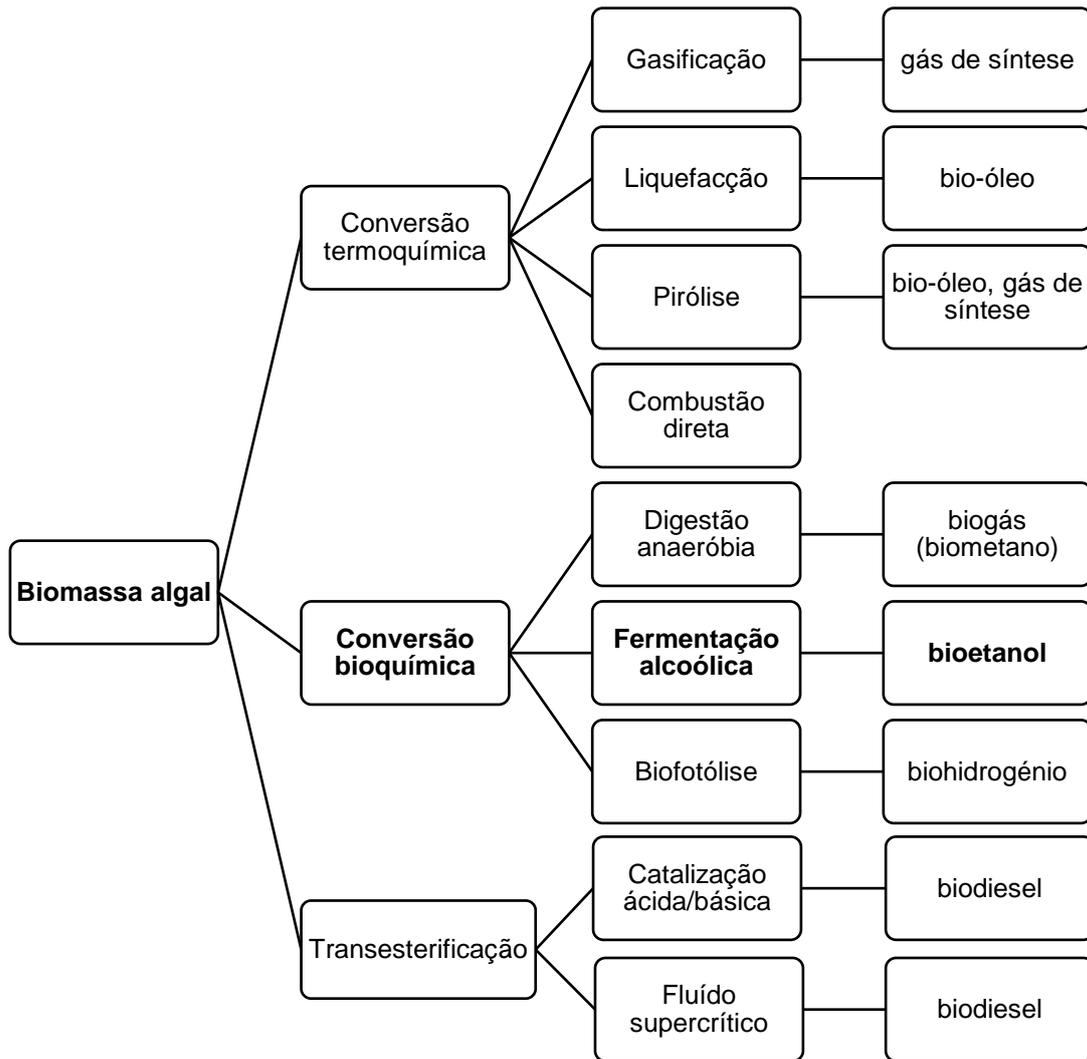


Figura 2.7 - Diferentes biocombustíveis produzidos a partir das microalgas e respectivas tecnologias de conversão (adaptado de Brennan and Owende, 2010; Milano et al., 2016).

Apesar de nas últimas décadas ter havido uma maior aposta na produção de biodiesel a partir de microalgas (Farias Silva and Bertucco, 2016; Lam and Lee, 2012; Markou et al., 2013), a necessidade de aumentar a eficiência de utilização da biomassa algal impôs a procura de outras formas de valorização energética.

Uma das alternativas corresponde à produção de bioetanol a partir da conversão de moléculas de açúcares fermentáveis de biomassas ricas em amido e/ou celulose, tal como as microalgas. Na tabela 2.7 estão representadas diferentes espécies de microalgas e o seu respetivo conteúdo em hidratos de carbono.

Tabela 2.7 - Diferentes espécies de microalgas e o seu conteúdo em hidratos de carbono (adaptado de Razack and Surendhiran 2016; Milano et al. 2016).

| Espécie | Conteúdo em hidratos de carbono (% bs) |
|--|--|
| <i>Anabaena cylindrica</i> | 25 – 30 |
| <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> | 8 – 16 |
| <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 17 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 12 – 17 |
| <i>Chlorella protothecoides</i> | 11 - 15 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 32 |
| <i>Nannochloropsis sp.</i> | 22 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | 40 – 57 |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> | 10 – 23 |
| <i>Scenedesmus dimorphus</i> | 21 – 52 |
| <i>Spirogyra sp.</i> | 33 – 64 |
| <i>Spirulina fusiformis</i> | 37 – 56 |

Determinados géneros tais como, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* destacam-se por apresentarem quantidades significativas de amido na sua composição (John et al., 2011; Lee et al., 2015b). De facto, em resultado de um estudo feito por Hirano e colaboradores (1997) com o objetivo de produzir bioetanol, foi quantificada a presença de 37 e 45% de amido nas microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii*, respectivamente (Hirano et al., 1997). Ainda num outro estudo conduzido por Ueno e colaboradores (1998) verificou-se a presença de 27% de amido na microalga marinha *Chlorococcum littorale* (Ueno et al., 1998).

A capacidade de modificar algumas das condições de crescimento das microalgas (e.g. luz, temperatura, nutrientes) com a finalidade de aumentar o seu conteúdo em hidratos de carbono é algo que tem sido investigado.

Ho e colaboradores (2012) investigaram o efeito da intensidade da luz e da limitação de azoto amoniacal no conteúdo em hidratos de carbono na microalga *S. obliquus*. Na experiência verificou-se que, quando a intensidade da luz foi aumentada de 60 para 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ os níveis de glucose aumentaram de 53,4% para 73,1%. Os mesmos autores também reportaram um aumento de 38,3% para 51,8% no conteúdo em hidratos de carbono ao fim de 3 dias de limitação de azoto amoniacal com uma intensidade luminosa de 420 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Ho et al., 2012). Um efeito semelhante foi observado por Kim e colaboradores (2014) com *C. vulgaris*, onde a limitação da concentração de azoto amoniacal levou a um aumento de 16 a 22,3% do total de hidratos de carbono presente na biomassa original (Kim et al., 2014).

Antes de se iniciar a produção de bioetanol a partir de microalgas é necessário definir a existência de duas vias principais de produção: a fermentação no escuro e a fermentação por leveduras antecedida de sacarificação. Apesar de serem microrganismos fotoautotróficos, determinadas espécies de microalgas apresentam a capacidade de crescer na ausência de luz. Ao sujeitarmos as microalgas a um ambiente escuro e anaeróbio, o processo de degradação oxidativo do amido e de outros hidratos de carbono é interrompido, começando a ocorrer acumulação destas moléculas no interior das células com posterior fermentação em vários produtos, entre os quais o bioetanol (John et al., 2011). Apesar do processo de fermentação no escuro ser mais simples e energeticamente eficiente quando comparado com o processo de fermentação convencional, demonstra baixas produtividades de bioetanol (Farias Silva and Bertucco, 2016). Segundo Hirano e colaboradores (1997) e Ueno e colaboradores (1998), que conduziram ensaios de fermentação anaeróbica no escuro, verificaram-se produções máximas de bioetanol de 1% (m/m) e 2% (m/m), respetivamente (Hirano et al., 1997; Ueno et al., 1998).

A segunda via possível para a produção de bioetanol consiste no processo de fermentação alcoólica convencional. Efetivamente, uma maior quantidade de estudos têm sido realizada, em grande parte devido a ser uma tecnologia bem conhecida e estabelecida, abrangendo uma diversidade de biomassas (John et al., 2011). Uma das principais diferenças relativamente à fermentação escura é a capacidade de fermentação não só dos açúcares presentes no meio intracelular, mas também dos que constituem as paredes celulares (Miranda et al., 2012).

Para a extração das moléculas de hidratos de carbono e a sua conversão em açúcares fermentáveis, torna-se inevitável aplicar uma etapa de hidrólise, sendo esta uma das etapas mais críticas em termos de produção de etanol (Harun and Danquah, 2011). De um modo geral, existem dois tipos de mecanismos para a obtenção de bioetanol, a hidrólise separada da fermentação (HSF) e sacarificação e fermentação simultâneas (SFS), cada um deles discutido seguidamente em maior detalhe.

No caso da HSF, esta é efetuada em duas etapas totalmente separadas (hidrólise e fermentação). A biomassa algal é sujeita a um dos vários métodos de hidrólise disponíveis (secção 2.5.1.4) antes de se proceder à etapa de fermentação do hidrolisado por meio de leveduras (e.g. *S. cerevisiae*) ou bactérias (Jambo et al., 2016).

Num estudo conduzido por Ho e colaboradores (2013) utilizando *C. vulgaris*, a realização de uma hidrólise ácida (H_2SO_4 1%, 121°C, 30 min.) separada de fermentação (30°C com *Z. mobilis*) permitiu obter um rendimento de etanol de 87,6%. Este resultado foi significativamente superior ao obtido no mesmo estudo através de HSF, mas aplicando uma hidrólise enzimática (*Pseudomonas sp.* CL3), tendo-se obtido um rendimento de 79,9% (Ho, et al. 2013a). Uma conclusão semelhante foi conseguida, desta vez com *S. obliquus* pré-enriquecida em hidratos de carbono utilizando o mesmo mecanismo de fermentação, tendo resultado num rendimento de etanol de 99,8% (Ho, et al. 2013b).

Mais tarde, num outro estudo realizado por Lee e coautores (2015) onde se aplicou uma HSF, a biomassa residual de *C. vulgaris* foi sujeita a uma hidrólise enzimática (Pectinex a pH 5,5 e a 45°C) e a uma hidrólise ácida (0,3 N HCl a 121°C durante 15 min.), resultando em rendimentos de etanol de 76,9% e 98,2%, respetivamente (Lee et al. 2015a).

Os estudos acima referidos confirmam assim a rentabilidade do processo de HSF por meio de uma hidrólise ácida comparativamente ao uso de enzimas.

O efeito de diferentes pré-tratamentos (ácido, alcalino e enzimático) sobre uma mistura de diferentes biomassas de microalga foi estudado por Shokrkar e colaboradores (2017). Verificou-se que a condição que utilizou uma mistura de H₂SO₄ 0,5 M com 2.5% (m/v) de MgSO₄ resultou em concentrações de etanol de 0,38 g/g_{glucose} correspondendo a um rendimento de 76% (Shokrkar et al., 2017). Apesar de esta ter sido a melhor condição para a hidrólise ácida, o pré-tratamento enzimático mostrou ser mais eficiente em termos de produção de etanol com rendimentos acima dos 90%. O mesmo estudo também permitiu avaliar a concentração ótima de biomassa algal de 50 g.L⁻¹, estando este valor de acordo com um outro estudo realizado por Ho e colaboradores (2013) (Ho, et al. 2013a).

Castro e co-autores (2015) estudaram o potencial de produção de ABE (acetona, butanol e etanol) a partir de uma mistura de biomassa de diferentes espécies de microalgas cultivadas em águas residuais. Os autores testaram diferentes condições de pré-tratamento ácido, verificando que a condição ótima foi a de H₂SO₄ 1 M durante 120 min. a 80–90°C. De seguida efetuaram a fermentação por via da bactéria *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4, obtendo-se uma produtividade de etanol, para a condição ótima de hidrólise, de 0,53 g.L⁻¹ (Castro et al., 2015).

Ainda num outro estudo, de Martín Juárez e colaboradores (2016), utilizando biomassa de algas também produzidas em águas residuais (setor doméstico e pecuário), testou-se o potencial de sacarificação da mesma. Os resultados mostraram rendimentos de açúcares totais entre 40 e 63% para a biomassa produzida em águas residuais domésticas sujeita a uma hidrólise enzimática (Martín Juárez et al., 2016). Choi e colaboradores (2011) já tinham proposto a possibilidade de extração de açúcares fermentáveis da biomassa de *S. obliquus* produzida num efluente de pecuária por meio de um método de ultrasonificação. Este pré-tratamento permitiu um incremento de 3,6 para 11,6 g.L⁻¹ em hidratos de carbono com posterior conversão em bioetanol por bactérias fermentativas (Choi et al., 2011).

Em suma, a HSF permite uma melhor otimização dos parâmetros de hidrólise podendo a operação ser executada em modo contínuo. Contudo, no caso da hidrólise ácida, o longo tempo de operação e a necessidade de neutralização do meio acabam por condicioná-lo em determinadas situações (Razack and Surendhiran 2016; Jönsson and Martín 2016; Lee et al. 2015b). Por outro lado, ao optar por uma hidrólise enzimática, a libertação de concentrações elevadas de glucose e celodextrina conduzem a inibições das enzimas (e.g. celulase), reduzindo a atividade destas e, conseqüentemente, diminuindo o rendimento do processo (Cheah et al., 2016).

Em alternativa, o mecanismo de SFS consiste numa única etapa, no qual as enzimas e leveduras são colocadas no mesmo reator, havendo assim uma degradação dos polissacarídeos em simultâneo com a produção de bioetanol por fermentação (Jambo et al., 2016). Uma das principais vantagens deste mecanismo é que ocorre uma conversão direta dos açúcares fermentáveis em bioetanol, resultando numa operação mais simples e rápida. Além disso, torna-se possível a ação de enzimas juntamente com as leveduras, situação impraticável no caso de uma hidrólise ácida, conduzindo a uma redução da formação de agentes inibidores (Razack and Surendhiran, 2016). No entanto, a realização de SFS apresenta determinadas desvantagens que precisam de ser ultrapassadas, nomeadamente, o custo das enzimas, desnaturação proteica durante a fermentação e a limitação das opções de hidrólise (Jambo et al., 2016; Razack and Surendhiran, 2016).

Num estudo de El-Dalatony e colaboradores (2016) realizado com a microalga *Chlamydomonas mexicana* testou-se a diferença de rendimento de etanol entre a HSF e a SFS, utilizando em ambas um processo combinado de sonificação e hidrólise enzimática. Os resultados mostraram que os melhores resultados foram alcançados com a SFS com produtividade de etanol de 10,5 g.L⁻¹ comparativamente aos 8,5 g.L⁻¹ obtidos por HSF (El-Dalatony et al., 2016). Ho e colaboradores (2013) investigaram a diferença de rendimentos de etanol entre os dois mecanismos de fermentação com sacarificação enzimática da biomassa *C. vulgaris* enriquecida com hidratos de carbono. O mecanismo SFS exibiu rendimentos superiores (≈92%) relativamente à HSF (≈80%) (Ho et al. 2013a).

Efetivamente, as microalgas exibem um grande potencial em termos de valorização energética, nomeadamente, na produção de bioetanol. A necessidade de criar estirpes com a capacidade de acumular mais hidratos de carbono, bem como melhorar as etapas de produção (hidrólise e fermentação) se conseguidas irá permitir que o setor consiga aumentar o seu peso no mercado dos biocombustíveis.

2.5.2.2 Microalgas para alimentação humana e animal

Em resultado do rápido crescimento populacional, a procura mundial de alimentos aumenta, conduzindo a novos desafios na produção e distribuição dos mesmos. Deste modo, a indústria alimentar moderna é forçada a definir uma estratégia baseada na inovação de produtos com custos de produção mais baixos, de elevado valor nutricional e mais acessíveis (Gouveia et al., 2008). Um dos vários avanços que tem vindo a ser tomado, corresponde à produção e comercialização, em larga escala, de microalgas como fonte de alimentação humana e animal.

A utilização de microalgas por parte das populações remonta a vários séculos. Contudo, só nas décadas de 50 a 60, com os avanços na biotecnologia e dos sistemas de produção, começou a haver um maior consumo mundial, numa primeira fase nos países asiáticos e, consequentemente, expandindo-se para outros mercados internacionais (Christaki et al., 2011).

A aplicação deste tipo de biomassa/cultura como fonte de alimento apresenta grandes vantagens comparativamente às culturas terrestres tradicionais, destacando-se a sua elevada produtividade e a capacidade de adaptação a diferentes condições do meio. Inclusivamente, as microalgas têm a capacidade de fixar quantidades significativas de CO₂, conferindo-lhes um papel importante na mitigação das emissões de carbono e combate às alterações climáticas (Gouveia et al., 2008).

Das diversas espécies de microalgas existentes apenas algumas destas apresentam interesse à escala industrial, como é o caso da *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Spirulina maxima*, *Odontella aurita*, *Phaedactylum tricorutum*, entre outras (Gouveia et al., 2008; Carlsson et al., 2007). De acordo com a(s) espécie(s) de microalga(s) escolhida(s) no sistema de produção é possível obter diferentes tipos de produtos finais (figura 2.8)



Figura 2.8 - Produto alimentar obtido a partir da biomassa de microalga comercializado pela empresa EnerGaia (fonte: Inhabitat, 2017).

Uma das principais razões para a produção de microalgas na indústria alimentar está relacionada com o seu elevado conteúdo em proteína, essencial na alimentação humana e animal. De acordo com Becker (2007), apesar dos custos de produção de microalgas como fonte de obtenção de proteínas ainda não serem competitivos com as fontes tradicionais, a qualidade proteica verificada em alguns casos é consideravelmente mais elevada (Becker, 2007). Espécies como *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira maxima* poderão apresentar valores de proteína que rondam os 51 a 71% do total de massa seca. Após extração dos aminoácidos, estes são comercializados como suplementos nutricionais (e.g. pó, extratos), ou incorporados em determinados produtos alimentares comuns, tais como massas e bebidas (Priyadarshani and Rath, 2012).

Os pigmentos são outros produtos obtidos a partir da produção de microalgas e com valor acrescentado. Os carotenoides, por exemplo, são pigmentos naturais bastante utilizados tanto pela indústria alimentar para a coloração de vários produtos, bem como pela indústria da

cosmética. No caso das microalgas, dos vários tipos de carotenoides existentes, o β -caroteno e a astaxantina são os que exibem maior representatividade no mercado. Relativamente ao primeiro, a sua produção é maioritariamente proveniente da utilização da espécie *Dunaliella salina*, sendo frequentemente adicionado em géneros alimentícios tais como, queijos e margarinas. Por sua vez, a astaxantina, obtida a partir da microalga *Haematococcus pluvialis*, tem uma maior representatividade na cosmética, nomeadamente, em produtos anti-envelhecimento (Gouveia et al., 2008).

Os hidratos de carbono são outro produto obtido a partir de maior parte das espécies de microalgas, sendo largamente utilizados pela indústria alimentar e farmacêutica. Um dos grupos de hidratos de carbono com interesse de se produzir em larga escala corresponde aos polissacarídeos sulfatados, podendo funcionar como antioxidantes, antivirais ou como aditivos alimentares (Vaz et al., 2016). Espécies tais como, *Spirulina maxima*, *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas mexicana* e *Porphyridium cruentum* são vulgarmente utilizadas em sistemas de produção (Gouveia et al., 2008; Vaz et al., 2016).

É de referir que a utilização das microalgas como fonte de alimento em sistemas de produção animal é atualmente um dos principais destinos desta biomassa, ocupando cerca de 30% da produção mundial de algas (Christaki et al., 2011). A incorporação nas rações de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e outros subprodutos de origem algal tem vindo a ganhar relevância, não só em termos nutricionais e de saúde animal, mas também do ponto de vista da sustentabilidade dos recursos (substituição parcial ou total das rações convencionais) (Yaakob et al., 2015). Taakob e investigadores (2015) realizaram um estudo com vacas produtoras de leite demonstrando que o consumo de um suplemento algal de 10 g.kg^{-1} de ração permitia uma redução do conteúdo lipídico do leite (Yaakob et al., 2015). Num outro estudo utilizando *Spirulina sp.*, desta vez realizado em suínos, verificou-se ser possível incorporar até 25% de biomassa algal nas rações sem qualquer tipo de manifestação de sintomas negativos nos animais testados (Gouveia et al., 2008).

2.5.2.3 Microalgas como agentes de bioremediação

A água corresponde a um dos vários recursos indispensáveis para qualquer atividade humana, sendo que se analisarmos a distribuição dos consumos de água global, verifica-se que mais de 90% é encaminhada para a agricultura e indústria (Zeraatkar et al., 2016). Consequentemente, grandes quantidades de águas residuais agroindustriais são produzidas por ano, verificando-se já em várias cidades uma incapacidade na gestão do tratamento das mesmas, levantando sérios riscos para a saúde pública (WHO, 2016).

A composição física e bioquímica de uma água residual é algo complexo, refletindo os hábitos de consumo e os processos tecnológicos utilizados pela sociedade (Abdel-Raouf et al., 2012).

Apesar dos processos de tratamento existentes permitirem que o efluente alcance valores dos parâmetros de qualidade aceitáveis à saída da estação, certos elementos e compostos químicos, tais como, azoto, fósforo, xenobióticos, metais pesados, bem como agentes patogénicos são de difícil eliminação. Por exemplo, o azoto e o fósforo são dois nutrientes presentes tanto em águas residuais urbanas como agroindustriais que, em determinadas concentrações, promovem mecanismos de eutrofização prejudiciais aos ecossistemas aquáticos. Indústrias de processamento de vegetais, suinicultura, matadouros, entre outras apresentam estes dois nutrientes em quantidades significativas (Wang et al., 2016).

Atualmente, o método convencional mais utilizado na remoção de azoto corresponde à desnitrificação, enquanto para o fósforo efetua-se a sua precipitação com cloreto férrico. Embora estes métodos físico-químicos permitam remover estes nutrientes não são suficientemente eficientes do ponto de vista técnico e económico (Pacheco et al., 2015). Problema semelhante ocorre na remoção de metais pesados, bastante comuns em águas residuais provenientes da indústria têxtil, de componentes elétricos e de tintas, a sua remoção implica a aplicação de métodos físico-químicos com custos elevados (Pacheco et al., 2015). É assim fundamental incluir no processo de tratamento de águas residuais métodos mais eficientes não só do ponto de vista técnico, mas também em termos de redução de custos energéticos e de O&M.

A bioremediação corresponde a um método de tratamento de resíduos orgânicos e inorgânicos que, por meio de agentes biológicos, é capaz de converter compostos tóxicos em formas menos agressivas, reduzindo o potencial impacte nos sistemas naturais (Dzionek et al., 2016). A utilização de microalgas como agentes de bioremediação tem vindo a ser estudada e aplicada, em grande parte devido à capacidade das microalgas em absorver nutrientes de uma forma mais económica comparativamente a outros métodos (Kwon et al., 2017). A utilização de microalgas no processo terciário de tratamento de águas residuais permite alcançar níveis de remoção de azoto, fósforo e metais pesados significativamente superiores aos obtidos através dos métodos convencionais. Além disso, promove a eliminação de determinados agentes patogénicos e aumento da quantidade de oxigénio dissolvido (Abdel-Raouf et al., 2012).

González e colaboradores (1997) avaliaram as eficiências de remoção de azoto amoniacal e fósforo pelas microalgas *C. vulgaris* e *S. dimorphus* num efluente agro-industrial tendo verificado remoções de azoto amoniacal entre os 20 e 55%. Além disso foi avaliada a diferença de remoção, por parte da *C. vulgaris*, para estes dois nutrientes em função da tipologia dos reatores. Constatou-se que as remoções de azoto amoniacal foram mais elevadas no reator cilíndrico, todavia no caso do fósforo, o reator triangular mostrou ser mais eficiente na sua remoção (González et al., 1997).

Num estudo realizado com várias espécies de microalgas, entre as quais *C. vulgaris*, analisou-se o potencial das microalgas na remediação de uma água residual doméstica. Os ensaios tiveram uma duração de 20 dias em condições controladas ($27\pm 2^\circ\text{C}$), tendo sido analisados diversos parâmetros (e.g. iões nitrato e fosfato, CBO). A experiência mostrou ser

possível alcançar eficiências de remoção com a *C. vulgaris*, ao fim de 15 dias, para os iões nitrato e fosfato na ordem de 78,1% e 62,7%, respetivamente. Também as concentrações para a CQO foram notavelmente reduzidas, com taxas de remoção na ordem dos 70-82%, ao fim de um período de 15 dias (Kshirsagar, 2013).

A redução das concentrações de determinados parâmetros físico-químicos em diferentes tipos de águas (residual doméstica, água do mar e de um poço) por meio das espécies *C. vulgaris* e *C. salina* foi avaliado por El-Sheekh e colaboradores (2016). Verificou-se uma redução máxima dos valores de CQO em 90,8% e 90,9% para a *C. vulgaris* e *C. salina*, respetivamente. Os resultados para SST e NH_4^+ também foram satisfatórios com reduções na água residual de 68,4% e 37,6% para a *C. vulgaris* e *C. salina*, respetivamente (El-Sheekh et al., 2016). Confirma-se assim a capacidade das microalgas para fitoremediarem diferentes tipos de efluentes com cargas orgânicas e inorgânicas consideráveis.

Outra vantagem da fitoremediação resulta da capacidade de certas espécies de microalgas tolerarem meios com elevadas concentrações de metais pesados (e.g. efluentes de minas, lixiviados de aterro), podendo mesmo ter a aptidão para adsorvê-los. Todavia, esta aptidão é em grande medida limitada por vários fatores externos às microalgas tais como, o pH, a temperatura e concentração dos iões metálicos (Bulgariu and Gavrilescu, 2015; Zeraatkar et al., 2016). Vários estudos têm sido realizados com o intuito de perceber a capacidade das microalgas em remediar efluentes contaminados com metais pesados (Chalivendra, 2014; Chen and Pan, 2005; Kumar and Oommen, 2012; Monteiro et al., 2009).

Foi reportada a capacidade da alga *Spirulina* adsorver 74% de chumbo (Pb) presente em baixas concentrações ($<50 \text{ mg.L}^{-1}$) numa água residual em apenas 12 min. (Chen and Pan, 2005). Mais tarde, Monteiro e co-autores (2009) avaliaram a capacidade de remoção de iões cádmio (Cd) por parte da *S. obliquus*. Um máximo de 11,4-11,5 $\text{mg}_{\text{Cd}}.\text{g}^{-1}$ foi removido da solução quando a alga foi exposta a 1 $\text{mg}_{\text{Cd}}.\text{L}^{-1}$ (Monteiro et al., 2009).

Chalivendra (2014) estudou a capacidade de duas espécies de algas, *C. vulgaris* e *Neochloris oleoabundans*, removerem os iões metálicos crómio (Cr) e Cd de uma água residual. Ambas as algas conseguiram remover quantidades significativas dos dois metais. No caso do Cr houve uma remoção de 43,7% em 128 h e 31,76% em 148 h para a *C. vulgaris* e *N. oleoabundans*, respetivamente. Já no caso do Cd, as taxas de remoção alcançaram valores próximos de 100% após 10 min. de contacto em ambas as espécies (Chalivendra, 2014).

A fitoremediação com microalgas constitui portanto, uma opção promissora para o tratamento de efluentes fortemente contaminados, como é o caso das águas residuais industriais. O lixiviado produzido em largas quantidades nos aterros sanitários apresenta características semelhantes a algumas águas residuais, tornando-o num efluente com potencial para ser remediado por microalgas.

2.6 Lixiviado de aterro

Desde o surgimento das primeiras civilizações que houve a necessidade em gerir os resíduos que uma dada população produzia. Contudo, essa necessidade prendia-se mais com uma preocupação de natureza estética do que propriamente ambiental e de saúde pública. De acordo com Williams (2005), os primeiros registos de aterros remontam a 500 a.C. na antiga Grécia. Todavia, os sistemas de gestão de resíduos e as tipologias de aterros que mais se aproximam dos atuais datam da Revolução Industrial (Williams, 2005).

Com o aparecimento de melhores oportunidades, as populações que viviam nas zonas rurais começaram a deslocar-se para os centros urbanos. Este êxodo conduziu a pressões demográficas levando a uma maior produção de resíduos e, conseqüentemente, a preocupações de ordem ambiental e de saúde pública (Williams, 2005; Worrell and Vesilind, 2012). Os sistemas de gestão de resíduos foram evoluindo ao longo do século XX, tendo havido uma preocupação crescente com o destino a dar a cada resíduo, o potencial de o reciclar, bem como a capacidade de produzir energia a partir desse mesmo resíduo (MacDonald, 2016).

Na União Europeia, a legislação comunitária relativa à gestão de resíduos deu os seus primeiros passos em 1989 com o documento intitulado “Estratégia Comunitária de Gestão de Resíduos”, no qual estavam estabelecidos vários princípios entre os quais se destaca a hierarquização da gestão dos resíduos, tecnologias para a gestão de resíduos e a importância da reciclagem (Williams, 2005). Em 1996 foi efetuada uma revisão a esta estratégia, tendo-se verificado a necessidade de definir não só o termo “resíduos” e a categorização dos mesmos, mas também normas de emissão para a incineração de resíduos. A partir desta altura começou a haver a implementação de um conjunto de legislação europeia tal como, a Diretiva 1999/31/CE relativa à deposição de resíduos em aterros, a Diretiva-Quadro 2008/98/CE e a Diretiva 2000/60/CE relativa à política da água (Brennan et al., 2016; Williams, 2005). A figura 2.9 mostra o esquema de hierarquização da gestão de resíduos.

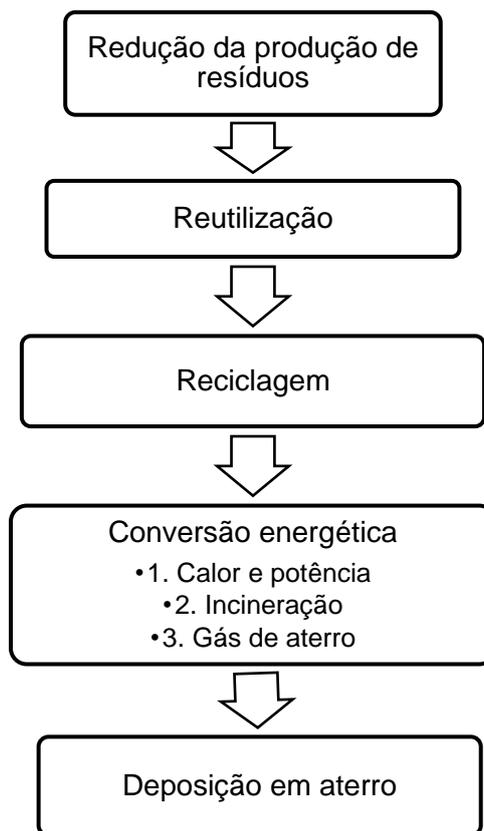


Figura 2.9 - Hierarquia da gestão de resíduos (adaptado de Williams 2005).

Apesar da prioridade em qualquer estratégia de gestão de resíduos ser a redução da geração dos mesmos, aproximadamente metade (47,4%) dos resíduos produzidos na UE-28 em 2014 foram encaminhados para aterro (EUROSTAT, 2017d), valor muito próximo do alcançado em Portugal para o mesmo ano (42%) (APA, 2017).

Desta forma, a existência de aterros conduz a externalidades negativas sobre o ambiente e populações locais, sendo uma das várias razões que justificam uma redução gradual da deposição de resíduos nestes locais. Entre os vários efeitos prejudiciais que um aterro apresenta, a produção do lixiviado de aterro é sem dúvida umas das mais perigosas.

2.6.1 Caracterização do lixiviado de aterro

O lixiviado de aterro corresponde à fase líquida formada nas zonas de aterro em resultado dos fenómenos de percolação da água precipitada e simultaneamente da ocorrência de processos de decomposição dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos resíduos e que são libertados para a água (Lema et al., 1988; Williams, 2005).

Existe uma diversidade de fatores que contribuem para a quantidade e qualidade de um determinado lixiviado, nomeadamente, a idade do aterro, a natureza dos resíduos, as condições atmosféricas locais, o nível de compactação do aterro e os regimes hidrológicos (Abbas et al.,

2009; El-Gohary and Kamel, 2016). Entre todas estas causas, a idade do aterro é provavelmente a que mais contribui para a composição de um lixiviado, particularmente, para o seu grau de estabilização (Castrillón et al., 2010; Lema et al., 1988). Em função da idade do aterro podem formar-se fundamentalmente três tipos diferentes de lixiviado, estando estes representados na tabela 2.8. De uma forma geral, um lixiviado é caracterizado por um conjunto de parâmetros dos quais se destacam o pH, a CQO, a CBO₅, a razão CBO₅/CQO, o azoto amoniacal, os SST e os metais pesados (Ağdağ, 2017; Renou et al., 2008a).

Tabela 2.8 - Características do lixiviado em função da idade do aterro (adaptado de Li et al., 2010b; Abbas et al., 2009; Renou et al., 2008a; Kjeldsen et al., 2002).

| Parâmetro | Recente | Intermédio | Antigo |
|---|----------------------------------|--|---------------------------|
| Idade (ano) | < 5 | 5 – 10 | > 10 |
| Fase do aterro | Aeróbia/Anaeróbia ácida | Metanogénica inicial | Metanogénica estabilizada |
| pH | < 6,5 | 6,5 – 7,5 | > 7,5 |
| CQO (mg.L⁻¹) | > 150000 | 3000 – 15000 | < 3000 |
| CBO₅/CQO | 0,5 – 1 | 0,1 – 0,5 | < 0,1 |
| NH₄⁺ (mg.L⁻¹) | < 400 | 400 | > 400 |
| Metais pesados | Baixa-média | Baixa | Baixa |
| Compostos orgânicos (espécies dominantes) | 80% Ácidos gordos voláteis (AGV) | 5% - 30% AGV + Ácidos húmicos/fúlvicos | Ácidos húmicos/fúlvicos |
| Biodegradabilidade | Importante | Média | Baixa |

Nos primeiros dias após a deposição dos resíduos, o oxigénio presente no meio é rapidamente consumido e convertido em dióxido de carbono, havendo a formação de um lixiviado em resultado da libertação de humidade e da água percolada. Após esta curta fase aeróbia, o aterro é sujeito a uma fase anaeróbia ácida. Nesta altura, o processo dominante é a hidrólise dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos em açúcares que, por sua vez, são degradados por microrganismos anaeróbios em dióxido de carbono, hidrogénio, azoto amoniacal e ácidos orgânicos (Kjeldsen et al., 2002). O processo de decomposição continua com a transformação destes ácidos orgânicos noutros, como é o caso do ácido acético, bem como a dissolução do dióxido de carbono na água formando ácido carbónico (Williams, 2005). Tal como é possível observar na tabela 2.8, os valores de pH do lixiviado decrescem consideravelmente (≈ 4) em resultado da formação de vários compostos ácidos, o que promove o aumento da solubilidade dos iões metálicos no lixiviado. Por outro lado, as concentrações de CQO e as razões CBO₅/CQO são elevadas, indicando a presença de uma grande quantidade de compostos orgânicos biodegradáveis no lixiviado. É também por esta altura que os níveis de azoto amoniacal começam a subir (apesar de se manterem baixos), como resultado da libertação de aminoácidos provenientes da degradação das proteínas (Kjeldsen et al., 2002; Williams, 2005).

Os processos de biodegradação persistem durante vários anos, começando a haver uma diminuição da quantidade de ácidos orgânicos que são convertidos essencialmente em metano e dióxido de carbono. O aterro começa agora a mostrar sinais da entrada na fase metanogénica, sendo esta caracterizada por um lixiviado com valores de pH mais próximos da neutralidade (6,5-7,5), em resultado da diminuição dos ácidos. O mesmo ocorre à CQO e à razão CBO_5/CQO evidenciando uma redução da fração biodegradável disponível.

Por último, com uma idade próxima dos 10 anos, o aterro entra em plena fase metanogénica. Nesta fase o lixiviado apresenta um pH neutro/alcalino ($> 7,5$), em resultado da conversão dos compostos húmicos em metano e dióxido de carbono, levando a reduções na solubilidade dos iões metálicos. A CQO já é consideravelmente mais baixa, estando associada sobretudo a compostos de elevado peso molecular (e.g. ácidos húmicos e fúlvicos) (Li, et al., 2010; Williams, 2005). O grau de estabilização é elevado, indicado pelas baixas razões de CBO_5/CQO ($< 0,1$) e os valores de azoto amoniacal tendem a ser elevados (Abbas et al., 2009). Após todo este processo, devido ao elevado grau de decomposição dos resíduos, existe a possibilidade dos níveis de oxigénio no interior no aterro começarem a aumentar podendo ocorrer um retorno do aterro a um estado aeróbio (Kjeldsen et al., 2002).

O lixiviado de aterro constitui um perigo para os compartimentos ambientais ao apresentar valores de toxicidade bastante elevados comprovados por testes laboratoriais feitos a diversos organismos (Renou et al., 2008a). Para alcançar níveis aceitáveis nos parâmetros de descarga torna-se imperativo a aplicação de métodos de tratamento eficientes (Li, et al., 2010).

2.6.2 Processos de tratamento do lixiviado de aterro

Tal como descrito na secção anterior, o lixiviado de aterro apresenta um conjunto de características físicas, químicas e biológicas bastante particulares, fazendo com que o seu tratamento seja um verdadeiro desafio. A elevada carga orgânica e inorgânica presente neste efluente poderá colocar em risco a qualidade dos recursos hídricos, solos e atmosfera. Este cenário obriga a um conjunto de medidas relativas ao tratamento destes efluentes. Os lixiviados de aterro são portanto considerados águas residuais industriais, não existindo legislação diretamente aplicada à descarga deste efluente em particular em recursos hídricos. Assim sendo, o decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto, contém normas e critérios que dizem respeito à descarga de águas residuais em meios hídricos, e abrange também a descarga de lixiviados em meios hídricos. No Anexo XVIII deste diploma encontram-se descritos os valores limite de emissão (VLE) para diversos parâmetros físico-químicos considerados nocivos (tabela 2.9).

Tabela 2.9 - Valores limite de emissão na descarga de água residuais, de acordo com o Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto.

| Parâmetros | Unidades | VLE |
|---------------------------|----------------------|--|
| pH | Escala de Sorensen | 6,0-9,0 |
| Temperatura | °C | Aumento de 3 °C |
| CBO ₅ (20 °C) | mg O ₂ /L | 40 |
| CQO | mg O ₂ /L | 150 |
| SST | mg/L | 60 |
| Alumínio | mg/L | 10 |
| Ferro total | mg/L | 2,0 |
| Manganês total | mg/L | 2,0 |
| Cheiro | mg/L | Não detetável na diluição 1:20 |
| Cor | mg/L | Não detetável na diluição 1:20 |
| Cloro residual disponível | mg/L | 0,5 |
| | | 1,0 |
| Fenóis | mg/L | 0,5 |
| Óleos e gorduras | mg/L | 15 |
| Sulfuretos | mg/L | 1,0 |
| Sulfitos | mg/L | 1,0 |
| Sulfatos | mg/L | 2000 |
| | | 10 |
| Fósforo total | mg/L | 3 (em águas que alimente lagoas ou albufeiras) |
| | | 0,5 (em lagoas ou albufeiras) |
| Azoto amoniacal | mg/L | 10 |
| Azoto total | mg/L | 15 |
| Nitratos | mg/L | 50 |
| Aldeídos | mg/L | 1,0 |
| Arsénio total | mg/L | 1,0 |
| Chumbo total | mg/L | 1,0 |
| Cádmio total | mg/L | 0,2 |
| Crómio total | mg/L | 2,0 |
| Crómio hexavalente | mg/L | 0,1 |
| Cobre total | mg/L | 1,0 |
| Mercúrio total | mg/L | 0,05 |
| Níquel total | mg/L | 2,0 |
| Cianetos totais | mg/L | 0,5 |
| Óleos minerais | mg/L | 15 |
| Detergentes | mg/L | 2,0 |

A descarga de águas residuais industriais pode também ser realizada em coletores municipais, sendo que os VLE neste caso apresentam valores mais elevados e variáveis, dado que são estabelecidos a nível municipal (figura 2.10).

Relativamente ao tratamento do lixiviado, existe uma variedade de métodos estando classificados em quatro principais categorias: *channeling*, físico/químico, biológico e filtração por membranas. Os três primeiros correspondem aos métodos convencionais, tendo sido utilizados durante largos anos, continuando a maioria a ter bastante aplicação. No caso dos métodos de filtração por membrana, estes surgiram com o intuito de complementar os anteriores. A restrição cada vez maior nos parâmetros finais de descarga por forma a reduzir os impactes nos

compartimentos ambientais conduziu à implementação de tecnologia mais eficiente (Abbas et al., 2009; Renou et al., 2008a). É importante referir que o tratamento de um dado lixiviado não depende de um só método, mas sim de um sequência combinada de diferentes métodos e operações de tratamento que, no seu conjunto, conferem um determinado grau de purificação ao efluente final (Capela, 2014).

Na tabela 2.10 estão descritos os principais métodos de tratamento do lixiviado de aterro e as suas respectivas remoções, sendo que a aplicação dos métodos irá depender das características do lixiviado.



Figura 2.10 - Lagoa de regularização para o lixiviado produzido no aterro (fonte: CITRI, S.A.).

Tabela 2.10 - Métodos de tratamento do lixiviado de aterro e respetivas eficiências de remoção consoante as características do lixiviado (adaptado de Renou et al., 2008a; Abbas et al., 2009).

| Método de tratamento | Idade do aterro | | | Remoção (%) | | | | Turvação | Observações |
|---|-----------------|------------|----------|-------------|-------|-----------------|-------|----------|--|
| | Recente | Intermédio | Antigo | CBO | CQO | Azoto total | SST | | |
| Channeling | | | | | | | | | |
| Tratamento combinado com águas residuais domésticas | Bom | Razoável | Fraco | | | Depende da ETAR | | | Excesso de biomassa |
| Recirculação | Bom | Razoável | Fraco | >90 | 60-80 | - | - | - | Baixo custo. Pouco eficiente |
| Lagunagem | Bom | Razoável | Fraco | 80 | 40-95 | >80 | 30-40 | 30-40 | Produção de lamas |
| Físico/químico | | | | | | | | | |
| Coagulação/floculação | Fraco | Razoável | Razoável | - | 40-60 | <30 | >80 | >80 | Produção de lamas |
| Precipitação química | Fraco | Razoável | Razoável | - | <30 | <30 | 30-40 | >80 | |
| Adsorção | Fraco | Razoável | Bom | >80 | 70-90 | - | - | 50-70 | Colmatação |
| Oxidação | Fraco | Razoável | Razoável | - | 30-90 | - | - | >80 | O ₃ residual |
| Stripping | Fraco | Razoável | Razoável | - | <30 | >80 | - | 30-40 | Precisa de controlo de emissões |
| Troca iónica | Bom | Bom | Bom | - | - | - | - | - | Custo elevado |
| Biológico | | | | | | | | | |
| Aeróbio | Bom | Razoável | Fraco | >80 | 60-90 | >80 | 60-80 | - | Excesso de biomassa. Limitado pelos compostos recalcitrantes |
| Anaeróbio | Bom | Razoável | Fraco | >80 | 60-90 | >80 | 60-80 | - | |
| Bioreator de membrana | Bom | Razoável | Razoável | >80 | >85 | >80 | >99 | 40-60 | |
| Filtração por membrana | | | | | | | | | |
| Microfiltração | Fraco | - | - | - | - | - | - | - | |
| Ultrafiltração | Fraco | - | - | - | 50 | 60-80 | >99 | >99 | Colmatação. Custo elevado |
| Nanofiltração | Bom | Bom | Bom | 80 | 60-80 | 60-80 | >99 | >99 | |
| Osmose inversa | Bom | Bom | Bom | >90 | >90 | >90 | >99 | >99 | Pré-tratamento. Custo elevado |

De entre todos os métodos descritos na tabela 2.10, a osmose inversa (OI) é de longe o que apresenta maiores eficiências de remoção. Genericamente, o processo de osmose inversa consiste em duas etapas. Primeiramente, o lixiviado pré-tratado passa por uma primeira unidade de OI. Em seguida, o efluente é encaminhado para uma segunda unidade de osmose, enquanto o concentrado obtido é direcionado para aterro. No final da segunda etapa, o efluente purificado é descarregado para o meio recetor ao mesmo tempo que o segundo concentrado obtido é recirculado para a primeira unidade de OI repetindo-se o processo (Renou et al., 2008b). A principal vantagem associada a este método é a capacidade de reter tanto os compostos orgânicos e inorgânicos com taxas de remoção que alcançam os 98-99% (Peters, 1998).

Contudo, apesar dos avanços que se tem feito no que diz respeito ao tratamento do lixiviado por osmose inversa, continua a haver dois principais obstáculos. O primeiro consiste na colmatação das membranas, o que obriga à aplicação de um pré-tratamento físico-químico ou à substituição das membranas, ambos os processos com um custo geralmente elevado (Renou et al., 2008a). Por outro lado, a produção de grandes quantidades de concentrado no final das unidades de OI constitui um problema de eliminação deste resíduo.

Como mencionado por Capela (2014), a utilização um sistema combinado de tratamento do lixiviado apresenta-se como uma opção promissora, sendo que os métodos utilizados dependerão da composição inicial do lixiviado (Capela, 2014). De facto, a utilização de mais do que um método de tratamento acaba por originar um efeito sinérgico possibilitando aumentar a eficiência geral do tratamento (Gao et al., 2015). Um desses casos é a utilização de métodos físico-químicos juntamente com métodos biológicos. A aplicação de um tratamento físico-químico previamente à etapa de tratamento biológico permite remover substâncias húmicas, bem como outros compostos (e.g. metais pesados, PCB) impedindo que estes condicionem a etapa biológica (Abbas et al., 2009; Gao et al., 2015; Tabrizi and Mehrvar, 2004). Por outro lado, a etapa biológica irá promover a remoção eficiente da matéria orgânica azotada, sendo usualmente aplicados em lixiviados com baixo grau de estabilização (Renou et al., 2008a).

Lin e Kiang (2003) estudaram a capacidade de remoção de compostos orgânicos de uma água residual proveniente de um processo de produção de materiais semicondutores, através da aplicação combinada de métodos físicos, químicos e biológicos. Os resultados permitiram demonstrar as vantagens de utilizar métodos combinados, possibilitando reduzir o valor de CQO de 80000 mg.L⁻¹ para valores abaixo de 100 mg.L⁻¹ e a eliminação total da cor (Lin and Kiang, 2003).

Num outro estudo, realizado por Kargi e Pamukoglu (2004), sujeitou-se um lixiviado pré-tratado a um processo de adsorção por carvão ativado previamente à etapa de tratamento biológica. Os ensaios em que utilizaram o carvão exibiram boas remoções para a CQO (≈94%) e NH₄⁺ utilizando ensaios em contínuo mais longos (3 x 30 h) em comparação com os ensaios mais curto (5 x 6 h) (Kargi and Pamukoglu, 2004).

Ainda num outro estudo, Castrillón e co-autores (2010) constataram que a aplicação de um pré-tratamento físico-químico de coagulação- floculação permitiu remover matéria orgânica não-biodegradável em mais de 62% e a turvação e cor do lixiviado superior a 90%. Além disso, a aplicação posterior de um tratamento biológico permitiu reduzir a carga orgânica até 88% no lixiviado com valores de CQO mais elevados. Após este tratamento combinado, o lixiviado ainda pode atravessar uma etapa de adsorção com carvão ativado (Castrillón et al., 2010).

2.6.2.1 Precipitação química

A precipitação química é um método amplamente aplicado no tratamento de águas residuais, sendo frequentemente utilizado como pré-tratamento para remover azoto amoniacal (NH_4^+), metais pesados e outros compostos orgânicos não-biodegradáveis (Kurniawan et al., 2006; Renou et al., 2008a). As vantagens deste método comparativamente a outros traduzem-se na simplicidade do processo e baixos investimentos, sendo que os custos estão sobretudo associados ao consumo de agente químico e à eliminação das lamas geradas (Kurniawan et al., 2006; Wang et al., 1990).

De um modo geral, o processo de precipitação consiste na conversão de catiões metálicos e alguns aniões solúveis em formas insolúveis passíveis de serem removidas da solução. A adição de contra-íões à solução conduz à diminuição da solubilidade e, conseqüentemente, à formação de precipitados estáveis, sendo estes últimos separados da solução por sedimentação ou filtração (Wang et al., 1990).

Como mencionado anteriormente, os lixiviados provenientes de aterros mais antigos exibem uma maior quantidade de substâncias húmicas, nomeadamente, ácidos húmicos e fúlvicos (Kjeldsen et al., 2002; Li, et al., 2010). Estas substâncias, constituintes fundamentais da matéria orgânica, são complexas estruturas macromoleculares de material polidisperso com uma superfície carregada negativamente em resultado da presença de vários grupos funcionais, estando a sua solubilidade dependente do pH do meio (Melo et al., 2015; Sabah and Ouki, 2017).

Quando expostos a condições neutras a alcalinas, os ácidos húmicos tornam-se solúveis levando à desprotonação dos grupos funcionais e à geração de forças de repulsão moleculares nestes locais. Isto resulta numa configuração mais alongada da molécula de ácido húmico e a uma maior disponibilidade de ligações com espécies catiónicas. Porém, em meios ácidos os grupos funcionais são protonados, levando à diminuição das forças de repulsão e à conformação da estrutura do ácido, tornando-se esta mais compacta. Nestas condições as ligações catiónicas ficam menos disponíveis (Bolea et al., 2006; Melo et al., 2015).

As substâncias húmicas são assim caracterizadas por apresentarem propriedades quelantes, possibilitando reações de complexação e precipitação (Martin et al., 2017; Melo et al., 2015; Sabah and Ouki, 2017). Deste modo, é possível perceber o potencial destas moléculas para se

agregarem a espécies catiónicas (figura 2.11), metais pesados e outros contaminantes presentes em águas residuais, modificando a sua biodisponibilidade e toxicidade (Piana and Zahir, 2000). Estes mecanismos encontram-se bem documentados em vários estudos (Piana and Zahir 2000; Tipping et al., 2002; Bolea et al., 2006; Liu et al., 2011; Yan et al., 2013; Sundman et al., 2014; Lin et al., 2015; Martin et al., 2017; Jin et al., 2017).

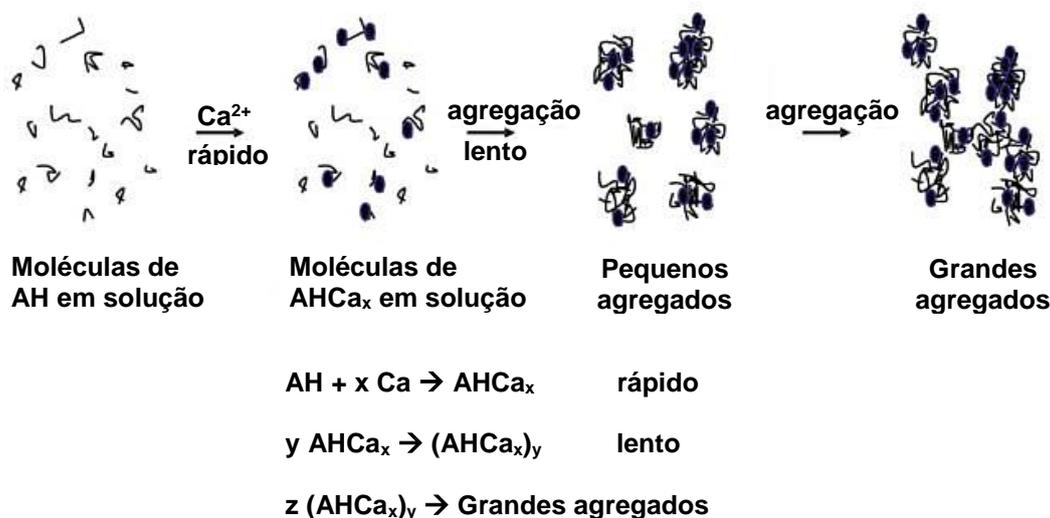


Figura 2.11 - Esquema representativo do processo de agregação dos ácidos húmicos (AH) na presença de íons Ca^{2+} (esferas) (adaptado de Kloster et al., 2013).

Piana e Zahir (2000) investigaram o potencial de ligação das substâncias húmicas a íões metálicos. De acordo com os resultados obtidos, o catião metálico Fe(III) foi o que alcançou melhor eficiência em termos de ligação às substâncias húmicas comparativamente aos outros metais. Os resultados mostraram ainda a ocorrência de um maior número de ligações nos ensaios realizados em condições alcalinas, ao contrário dos realizados em condições mais ácidas. Isto está relacionado com o facto de a pH mais elevados, os grupos funcionais são desprotonados, resultando numa maior disponibilidade de ligações com íões metálicos (Piana and Zahir, 2000). Além disso, a presença de várias espécies iónicas em solução conduz à competição destas pelas ligações disponíveis, facto comprovado por outros autores (Tipping et al., 2002).

Num outro estudo realizado por Lin e colaboradores (2015) foi investigada a influência que o íão cálcio, juntamente com os ácidos húmicos, têm na colmatação das membranas do processo de ultrafiltração. Apesar da interação entre os íões Ca^{2+} e os ácidos húmicos conduzir a fenómenos de colmatação (Lin et al., 2015), o potencial de formação de agregados metálicos com os ácidos húmicos utilizando Ca^{2+} aparenta ser promissor.

Na verdade, a afirmação anterior pode ser comprovada num estudo feito anos antes utilizando íões Ca^{2+} , onde se pretendeu avaliar as cinéticas de agregação destes íões aos ácidos húmicos.

Os resultados mostraram que a taxa de agregação aumentou com a adição de mais íons Ca^{2+} à solução, sendo que as maiores agregações registaram-se a pH próximos de 9 (Kloster et al., 2013).

Martin e co-autores (2017) estudaram a capacidade de certos cátions metálicos estabelecerem a ligação entre oxianíons e ácidos húmicos. Os ensaios demonstraram que, apesar de todos os cátions (Fe(III) , Cr(III) , Al(III) e Gr(III)) terem estabelecido complexos binários, apenas o Fe(III) e Cr(III) facilitaram a formação de complexos ternários com os oxianíons (Martin et al., 2017).

Relativamente aos processos de precipitação química existe uma diversidade de agentes químicos precipitantes que poderão ser utilizados neste processo, sendo que a cal (CaO), a cal hidratada (Ca(OH)_2) e a estruvite ($\text{Mg-NH}_3\text{-PO}_4$) encontram-se entre os mais aplicados (Kurniawan, et al. 2006).

Baig e colaboradores (1999) testaram vários métodos de tratamento de um dado lixiviado sendo a precipitação química com cal hidratada ou hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) um desses métodos. Os autores constataram que a utilização de uma dose de 1 g.L^{-1} permitiu reduzir a CQO em cerca de 25%, e a cor do efluente associada à remoção da fração de matéria orgânica de elevado peso molecular (ácidos húmicos e fúlvicos), que contribui parcialmente para a cor escura típica dos lixiviados (Baig et al., 1999).

Mais tarde, Renou e colaboradores (2008) desenvolveram e otimizaram um método de tratamento de um lixiviado estabilizado, combinando um pré-tratamento de precipitação química com Ca(OH)_2 seguida de filtração e osmose inversa. Os resultados demonstraram ser possível alcançar remoções no pré-tratamento entre 20-30% para a CQO, estando esta essencialmente associada à componente recalcitrante. Também foi possível remover 25-56% da componente amoniacal, bem como eliminar a cor do lixiviado (Renou et al., 2008b). Num outro estudo feito pelos mesmos autores, foi investigado o potencial da precipitação química com Ca(OH)_2 como pré-tratamento para o método de ultrafiltração na redução dos custos à escala industrial. Com isto, os autores verificaram a possibilidade de redução em 50% dos custos de investimento na unidade de ultrafiltração e entre 5-30% nos custos de operação (Renou et al., 2009).

Num outro estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2009) foi investigado o potencial de remoção de azoto amoniacal usando estruvite como agente de precipitação variando diferentes parâmetros tais como, o pH e a razão molar. Verificou-se que a precipitação de estruvite depende do pH, sendo que a máxima remoção de azoto amoniacal ($\approx 80\%$) obteve-se a um pH de 9,5. Por outro lado, um aumento da razão molar de 1:1:1 para 1,15:1:1 permitiu um aumento da remoção de azoto amoniacal de 79% para 86% (Zhang et al., 2009).

Huang e co-autores (2014) estudaram o potencial de remoção de azoto amoniacal por meio de precipitação com estruvite utilizando ácido fosfórico (resíduo) como substituto da fonte de

fosfato. Os resultados foram satisfatórios, exibindo remoções na ordem dos 83% de azoto amoniacal. Além disso, apesar da necessidade de adicionar uma grande quantidade de óxido de magnésio (MgO) de baixo custo para neutralizar o ácido fosfórico, o uso destes dois materiais em substituição de químicos puros permitiu reduzir os custos em 68% (Huang et al., 2014).

2.6.2.2 Uso de cinzas de biomassa no tratamento de efluentes contaminados

A intensificação global dos processos de combustão de biomassa para a produção de energia elétrica e térmica conduz à geração de grandes quantidades de cinzas com tendência para aumentar no futuro (Reimann et al., 2008; Umamaheswaran and Batra, 2008). A necessidade de eliminação deste resíduo sólido cria profundos impactes ambientais e económicos, visto que apenas 16% de toda a cinza produzida no mundo é reutilizada, por exemplo, como agente de correção de solo ou como aditivo de materiais de construção. Isto faz com que grandes quantidades de cinza sejam encaminhadas todos os anos para aterros e lagoas (Ahmaruzzaman, 2010; Nunes et al., 2016).

A partir da análise da composição de uma cinza de biomassa é possível identificar uma diversidade de elementos: uns em maior abundância como é o caso dos óxidos de silício (SiO_2) e cálcio (CaO) entre outros óxidos (Mg, K, Al, P), enquanto outros apenas como vestigiais (e.g. Cd, Mo, Ni, Pb). Todavia, a composição de uma cinza irá depender, principalmente, do tipo de combustível e processo de combustão (Lind and Nordh, 2004; Nunes et al., 2016).

Tal como mencionado na seção anterior, o uso de determinados iões (e.g. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+}) na precipitação química de compostos orgânicos e inorgânicos encontra-se extensamente documentado. A existência destes elementos na composição química das cinzas pressupõem a potencialidade das cinzas como agentes de precipitação, podendo vir a ser uma alternativa viável e sustentável a outros agentes químicos usualmente utilizados. Além disso permite dar um novo uso a um resíduo que tem como principal destino final a deposição em aterros.

Em oposição à quantidade considerável de estudos que utilizam cinzas como método de adsorção de poluentes, pouco estudos existem sobre o uso de cinzas como agentes de precipitação química.

Num estudo realizado por Xirokostas e coautores (2003), investigou-se a capacidade de retenção de metais (Cu, Ni, Zn, Cd, Cr e Fe) por parte de cal, cinzas volantes e cinzas proveniente de resíduos agrícolas. De acordo com as análises químicas realizadas, ambas as cinzas apresentaram proporções consideráveis de CaO, levando a que a precipitação química fosse o principal mecanismo a atuar aquando da remoção de metais. De entre todos os metais presentes, os que apresentaram maiores taxas de remoção com cinzas volantes foram o Fe (98%) seguido do Zn (96%) e Cu (94%). Todavia, é necessário realçar que o processo de precipitação foi

também acompanhado por mecanismos de adsorção assegurados sobretudo pelo Al_2O_3 (Xirokostas et al., 2003).

Num outro estudo, feito por Chen e colaboradores (2009), foi efetuada um tratamento para remoção de metais por meio de uma precipitação química, utilizando para isso uma mistura de cinza volante com cal, seguida de um processo de carbonação com CO_2 . Os resultados demonstraram que apenas utilizando cinzas volantes obtiveram-se taxas de remoção abaixo dos 10%. No entanto, ao aumentar a dosagem de cal até 900 mg.L^{-1} permitiu melhorar dramaticamente a taxa de remoção. Com isto foi possível remover 99% de Cu, 97% de Zn e 98% de Pb (Chen et al., 2009).

Outros estudos foram realizados com cinzas devendo os mesmo ser referidos. Contudo a grande maioria consiste na remoção de contaminantes por meio de mecanismos de adsorção (Ahmaruzzaman, 2009; Ayala and Fernández, 2016; Lind and Nordh, 2004; Otal et al., 2005). A aplicação final das cinzas está diretamente relacionada com a sua composição e com a eficiência da combustão que lhes deu origem. Assim sendo, cinzas que ainda apresentam um resíduo carbonoso significativo serão mais adequadas para metodologias de adsorção, ao passo que um elevado grau de oxidação das cinzas, isto é, cinzas provenientes de caldeiras operadas a temperaturas extremamente elevadas (cimenteiras, indústria cerâmica), serão promotoras de fenómenos de precipitação química (Misra et al., 1993; Yao et al., 2017).

2.6.2.2 Bioremediação de lixiviado de aterro através de microalgas

A aplicação de microalgas na remediação de lixiviado de aterro não se encontra bem estabelecida na literatura. Além da elevada carga orgânica e inorgânica este efluente apresenta uma coloração muito escura que impede a entrada da luz necessária ao crescimento destes microrganismos fotossintéticos, e portanto alguns trabalhos são realizados recorrendo a diluições significativas do efluente.

Cheng e Tian (2013) efetuaram uma avaliação preliminar da capacidade de *Scenedesmus sp.* em remediar um lixiviado proveniente de uma localidade chinesa. Os autores verificaram que a estirpe isolada obteve as maiores taxas de crescimento nos ensaios com as diluições mais elevadas, tendo sido possível obter remoções de 70%, 72%, 95% e 16% para azoto total, NH_4^+ , fósforo total e CQO, ao fim de 20 dias de cultivo. Além disso, as diluições foram bastante elevadas variando entre 1:5 e 1:50 (Cheng and Tian, 2013).

Richars e Mullins (2013) avaliaram a remoção de metais em lixiviado de aterro e a produção simultânea de lípidos em 4 espécies de microalgas marinhas. Os autores verificaram que após um período de ensaio de 10 dias, a população de microalgas remediou mais de 95% dos metais presentes em solução (Richards and Mullins, 2013).

Lin e colaboradores (2007) isolaram *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlamydomonas snowiae* a partir de uma lagoa de estabilização contendo lixiviado muito rico em azoto amoniacal. As taxas

de crescimento e remoção de nutrientes foram determinadas recorrendo a diluição em série do lixiviado de aterro em condições laboratoriais, e as taxas de crescimento das microalgas foram comparadas com *C. pyrenoidosa* isolada de um rio limpo. Os autores verificaram que o crescimento das três algas foi inibido pelas elevadas concentrações dos constituintes do lixiviado, relatando que a inibição estará diretamente relacionada com o elevado teor de azoto amoniacal. Os autores relatam também que a fitotoxicidade do lixiviado foi reduzida, após ensaios com sementes de *Brassica chinensis*. As taxas de germinação em concentrações de 10%, 30% e 50% de lixiviado tratado com algas foram significativamente maiores do que aquelas na mesma concentração, mas em lixiviado sem algas. (Lin and Chan, 2007).

Outra abordagem na utilização de microalgas para a remediação de lixiviado de aterro, corresponde à aplicação de culturas sinérgicas entre microalgas e bactérias. Kumari e co-autores (2016) utilizaram uma cultura mista de microalgas e bactérias na avaliação da redução de toxicidade de lixiviado de aterro. A eficiência dos métodos de tratamento foi avaliada usando ensaios de toxicidade química e *in vitro*. Os autores observaram uma redução significativa na citotoxicidade e genotoxicidade, juntamente com a remoção de contaminantes orgânicos tóxicos e metais pesados em amostras tratadas com a co-cultura. Estes resultados podem ser justificados dado que as microalgas foram capazes de melhorar a remoção de nutrientes, metais pesados e também fornecer oxigénio às bactérias aeróbicas heterotróficas, para que estas conseguissem mineralizar os poluentes orgânicos, usando o dióxido de carbono libertado na respiração bacteriana (Kumari et al., 2016).

Num estudo recente, Paskuliakova e colaboradores (2016) investigaram a hipótese de remediação do lixiviado de aterro em climas com baixas temperaturas e intensidades de luz para várias espécies de microalgas. Os autores verificaram que a espécie *Chlamydomonas sp.* atingiu os valores mais elevados de remoção de NH_4^+ , cerca de 52%, utilizando uma concentração de 10% de lixiviado bruto durante 24 dias de ensaio (Paskuliakova et al., 2016).

As características de cultivo do consórcio de microalgas e bactérias em lixiviado de aterro foram estudadas por Zhao e colaboradores (2014). A concentração máxima de biomassa de 1,58 g.L^{-1} e nível de clorofila a 22 mg.L^{-1} foram obtidas para uma concentração de lixiviado de 10%. Para esta mesma concentração de lixiviado, o consórcio removeu cerca de 90% do azoto total presente no meio. Os autores relatam também que a presença de ácidos húmicos diminuiu significativamente. Além da remediação, o consórcio foi também responsável por uma produção máxima de lípidos de 24,1% e por uma fixação de carbono de 65,8 $\text{mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$ (Zhao et al., 2014).

A remediação de lixiviados de aterro é possível alcançar recorrendo às microalgas. Todavia, a variabilidade deste efluente em resultado de vários fatores dificulta a otimização do seu tratamento. Por outro lado, a reduzida informação sobre o comportamento de culturas de microalgas em lixiviados, acaba por dificultar o avanço nesta área. A integração dos sistemas de produção de microalgas com o intuito de produzir biocombustíveis juntamente com a utilização

de efluentes contaminados mostra ser uma alternativa sustentável na geração de energia e redução dos impactes ambientais.

3. METODOLOGIA

3.1 Matérias-primas

3.1.1 Lixiviado de aterro

O lixiviado de aterro utilizado no presente estudo teve origem numa lagoa de estabilização de um aterro industrial de resíduos não-perigosos (Citri, S.A.) localizado na região de Setúbal. As amostras foram recolhidas em outubro de 2016 para dois depósitos de plástico de 20L cada, transportadas para o laboratório e armazenadas à temperatura de 4°C (figura 3.1a).

3.1.2 Microalga

A espécie de microalga utilizada neste estudo foi a *Scenedesmus obliquus* proveniente da Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI 204/07, Universidade de Coimbra - Algoteca, Portugal). Antes de se proceder à inoculação, as microalgas foram cultivadas em reatores de 1 L, a 25°C em meio Bristol (figura 3.1b).

3.1.3 Resíduo de pecuária

O resíduo utilizado corresponde a um estrume proveniente de uma indústria de produção bovina localizada no norte de Portugal. A recolha de amostras foi realizada no mês de março de 2017, sendo estas refrigeradas e transportadas para o laboratório, onde foram armazenadas a 4°C. Nos ensaios efetuou-se uma diluição do resíduo devido à sua consistência pastosa numa proporção 1:10 (figura 3.1c).

3.1.4 Agentes de precipitação

Para o pré-tratamento por precipitação química realizado foram utilizados dois agentes de precipitação: hidróxido de cálcio e cinzas de biomassa. As cinzas de biomassa (cinzas de fundo) foram disponibilizadas pela Prélis, S.A. empresa pertencente à indústria cerâmica (figura 3.1d)

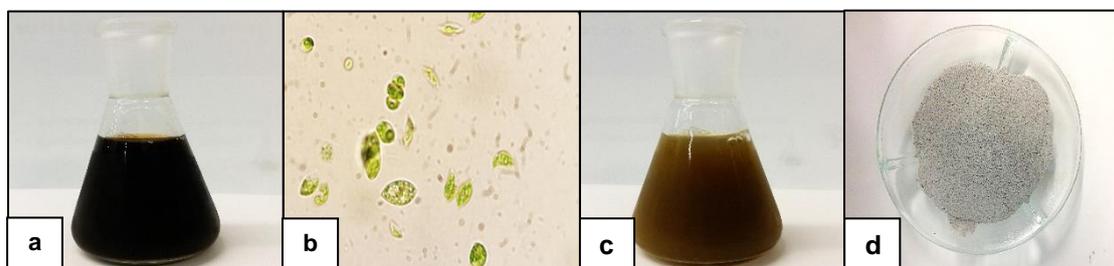


Figura 3.1 - a: lixiviado bruto, b: *S. obliquus*, c: efluente de vacaria e d: cinza de biomassa.

3.2 Caracterização do lixiviado de aterro

Com o intuito de efetuar a caracterização físico-química do lixiviado de aterro, procedeu-se a um conjunto de métodos para a determinação dos seguintes parâmetros estudados: densidade ótica (540 e 600 nm), condutividade, pH, teor de sólidos, carência química de oxigénio, carência bioquímica de oxigénio em 5 dias, azoto total, fósforo total, nitritos, nitratos, sulfatos, cloretos e metais. Todas as determinações foram realizadas com réplicas.

3.2.1 Determinação da densidade ótica a 540 e a 600 nm (DO_{600} e DO_{540})

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur recolheu-se aproximadamente 4 mL amostra de lixiviado bruto para uma *cuvette* de vidro procedendo-se à leitura da mesma no espectrofotómetro (Pharmacia Novaspec® Rapid) a 600 nm (Ricordel and Djelal, 2014) e a 540 nm (absorção da clorofila), utilizando diluições apropriadas. As amostras foram homogeneizadas antes de cada leitura, tendo estas sido realizadas em duplicado.

3.2.2 Determinação da condutividade

A condutividade foi determinada com o auxílio de um condutivímetro (Mettler Toledo MC226). Em primeiro lugar, recolheu-se para um gobelé um volume de amostra adequado para que o eléctrodo estivesse completamente mergulhado. Em seguida, introduziu-se o eléctrodo na amostra sob agitação contínua procedendo-se à leitura. As leituras foram realizadas em duplicado, tendo-se lavado previamente o eléctrodo com água ultrapura, secando-o suavemente com um papel.

3.2.3 Determinação do pH

Para a determinação do pH foi utilizado um medidor de pH (PHscan 30), sendo necessário efetuar uma calibração com duas soluções-tampão (pH 4 e 7). Após calibração, mergulhou-se completamente o eléctrodo na amostra colocada num gobelé com um agitador magnético, realizando-se a leitura. As leituras foram efetuadas em duplicado.

3.2.4 Determinação do teor em sólidos

A determinação do teor em sólidos totais (método 2540B), voláteis e fixos (método 2540E) e suspensos (método 2540D) foi adaptada a partir do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1985). Todos os ensaios descritos foram realizados em triplicado.

3.2.4.1 Sólidos totais (ST)

O teor em sólidos totais foi determinado utilizando uma placa de aquecimento e uma estufa (Memmert). Em primeiro lugar efetuou-se o acondicionamento dos cadinhos de porcelana numa

mufla (Nabertherm) a 550°C durante 20 min. Posteriormente, retiraram-se os cadinhos para um exsicador até temperatura ambiente, efetuando-se em seguida a sua pesagem na balança analítica (Mettler Toledo AB204-S). A cada cadinho foi adicionado um volume de 10 mL de amostra previamente homogeneizada e em seguida colocaram-se os cadinhos na placa de aquecimento até evaporação da amostra. Logo após a evaporação, colocaram-se os cadinhos na estufa à temperatura de 105 ± 2°C durante 1 h. Após secagem, os cadinhos foram colocados no exsicador até temperatura ambiente, efetuando-se em seguida a sua pesagem.

A equação 1 permite calcular o teor de sólidos totais presentes na amostra, ST (mg.L⁻¹):

$$ST \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{m_2 - m_1}{v} \right) \times 1000 \text{ (Eq.1)}$$

Onde,

m₁ – peso do cadinho (mg)

m₂ – peso do cadinho + amostra após estufa (mg)

v – volume de amostra (mL)

3.2.4.2 Sólidos voláteis (SV)

Após determinação dos sólidos totais (secção 3.2.4.1), os cadinhos foram colocados na mufla a 550°C durante 20 min. Após este tempo, retiraram-se os cadinhos para um exsicador aguardando o seu arrefecimento até à temperatura ambiente, realizando-se posteriormente a sua pesagem.

A equação 2 permite calcular o teor em sólidos voláteis presentes na amostra, SV (mg.L⁻¹):

$$SV \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{m_2 - m_3}{v} \right) \times 1000 \text{ (Eq.2)}$$

Onde,

m₂ – peso do cadinho + amostra após estufa (mg)

m₃ – peso do cadinho + amostra após mufla (mg)

v – volume de amostra (mL)

3.2.4.3 Sólidos fixos (SF)

Os sólidos fixos, SF (mg.L⁻¹), foram determinados por diferença, de acordo com a equação 3:

$$SF \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{m_3 - m_1}{v} \right) \times 1000 \text{ (Eq.3)}$$

Onde,

m_1 – peso do cadinho (mg)

m_3 – peso do cadinho + amostra após mufla (mg)

v – volume de amostra (mL)

3.2.4.4 Sólidos suspensos totais (SST)

Para a determinação do teor em sólidos suspensos totais foi efetuada uma filtração sob vácuo utilizando filtros de fibra de vidro de 47 mm (Prat Dumas). Previamente, todos filtros foram colocados em caixas de petri e sujeitos a secagem na estufa durante 1 h, efetuando-se a pesagem dos mesmos após alcançarem a temperatura ambiente. Posteriormente, filtrou-se um volume adequado de amostra através de um sistema de filtração a vácuo. Após filtração, os filtros foram colocados em estufa à temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 1 h, sendo em seguida colocados num exsicador até à temperatura ambiente e posteriormente pesados.

A equação 4 permite calcular o teor em sólidos suspensos totais presentes na amostra, SST (mg.L^{-1}):

$$\text{SST (mg.L}^{-1}\text{)} = \left(\frac{m_2 - m_1}{v} \right) \times 1000 \text{ (Eq. 4)}$$

Onde,

m_1 – peso do filtro (mg)

m_2 – peso do filtro + amostra após estufa (mg)

v – volume de amostra (mL)

3.2.5 Determinação da carência química de oxigénio (CQO)

Para a quantificação da carência química de oxigénio foi aplicada uma adaptação do método 5220B do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1985). Todos os ensaios descritos foram realizados em duplicado.

Primeiramente pipetou-se um volume adequado de amostra para um tubo de digestão perfazendo com água destilada até um volume final de 20 mL. Em seguida adicionaram-se 10 mL de solução de dicromato de potássio 0,25 M (Panreac) e $\frac{1}{4}$ de espátula de sulfato de mercúrio (Panreac). Posteriormente, levou-se o tubo para um banho frio e adicionaram-se 30 mL de ácido sulfúrico (Fisher Chemical >95%). Paralelamente, preparou-se um ensaio em branco, no qual a amostra é substituída por água destilada.

Seguidamente, acoplou-se um condensador ao tubo, sendo este último colocado no digestor à temperatura de $160 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 110 min. Após digestão e arrefecimento, as amostras foram

vertidas para erlenmeyers adicionando-se água destilado até um volume final de 150 mL. As amostras foram tituladas com sulfato ferroso amoniacal (0,25 M, Panreac), adicionando previamente 3 gotas de ferroína. O valor de CQO foi determinado de acordo com a equação 5:

$$\text{CQO (mg O}_2\text{.L}^{-1}\text{)} = \frac{8000 \times (v_0 - v_1) \times M}{v} \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde,

v – volume de amostra (mL)

v_0 – volume de solução titulante gasta na titulação do branco (mL)

v_1 – volume de solução titulante gasta na titulação da amostra (mL)

M – molaridade da solução titulante (M)

8000 – peso miliequivalente de oxigênio x 1000 mL.L⁻¹

3.2.6 Determinação da carência bioquímica de oxigênio em 5 dias (CBO₅)

Para a determinação da carência bioquímica de oxigênio utilizada a metodologia descrita no manual dos respirômetros Oxitop.

Esta metodologia descreve um método manométrico, no qual os ensaios da CBO com um período 5 dias ocorrem num sistema incubado a 20°C em frascos escuros contendo agitadores magnéticos e onde são acoplados sensores eletrônicos Oxitop. Todos os ensaios descritos foram realizados em duplicado.

Em frascos apropriados colocaram-se volumes de amostra determinados de acordo com os valores obtidos de CQO (secção 3.2.5), como descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Valores utilizados para a determinação da CBO₅ na metodologia utilizada neste trabalho.

| Intervalo de medição CQO (mgO ₂ .L ⁻¹) | Volume de amostra a utilizar para CBO ₅ (mL) | Fator |
|--|--|-------|
| 0 – 40 | 432 | 1 |
| 0 – 80 | 365 | 2 |
| 0 – 200 | 250 | 5 |
| 0 – 400 | 164 | 10 |
| 0 – 800 | 97 | 20 |
| 0 – 2000 | 43,5 | 50 |
| 0 – 4000 | 27,5 | 100 |

Seguidamente, pipetou-se para cada frasco, solução tampão de fosfatos (A), solução de sulfato de magnésio heptahidratado (B), solução de cloreto de cálcio (C) e solução de cloreto de ferro III (D). Por fim, colocaram-se tubos de borracha no colo do frasco, adicionando 0,21 g de

hidróxido de sódio (JMS, Ltd. 98,5%) e colocando os sensores OxiTop. Posteriormente, os frascos foram colocados num agitador magnético, em câmara escura, a 20°C durante 5 dias. Ao fim deste tempo efetuou-se a leitura dos sensores e calculou-se o valor de CBO₅, multiplicando o valor mais elevado obtido no sensor pelo fator correspondente da tabela 3.1.

3.2.7 Determinação do teor de azoto total

3.2.7.1 Digestão da amostra

Num tubo de digestão adicionou-se 25 mL de amostra, 10 mL de ácido sulfúrico (Fisher Chemical >95%) e uma espátula de mistura catalisadora (Se + K₂SO₄). O tubo foi colocado no digestor à temperatura de 360°C. A digestão considerou-se terminada quando a solução ficou incolor. Posteriormente, o digerido foi vertido para um balão de 100 mL, lavando o tubo de digestão com água ultra pura e perfazendo o volume do balão. Seguidamente o digerido foi filtrado para um frasco de plástico e conservado a 4°C.

3.2.7.2 Destilação da amostra

Estando a etapa da digestão concluída, é possível iniciar o procedimento de determinação do azoto total. Primeiramente, pipetou-se para um tubo de destilação Kjeldahl um volume apropriado do digerido, perfazendo-se a 100 mL com água ultra pura. De seguida, adicionou-se fenolftaleína e hidróxido de sódio 6 N até a cor permanecer rosa (pH > 8). Paralelamente, pipetou-se 50 mL de solução de ácido bórico (20g.L⁻¹, Panreac) para um erlenmeyer de 250 mL e juntou-se 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico.

Logo após esta preparação, colocou-se o tubo de destilação e o erlenmeyer no destilador (Kjeltec System 1002), de forma a proceder à destilação da amostra contida no tubo. A amostra é destilada e recondensa no erlenmeyer, sendo que os iões amónio reagem com o ácido bórico alterando a cor da solução no erlenmeyer de roxo para verde. Seguidamente, o destilado contido no erlenmeyer foi titulado com ácido sulfúrico 0,02 N. O teor de azoto total (azoto Kjeldahl + azoto orgânico) é determinado através da equação 6:

$$\text{Azoto total (mg N.L}^{-1}\text{)} = v_1 \times c \times m \times 1000 \times \left(\frac{v_b}{v_a \times v_e} \right) \text{ (Eq. 6)}$$

Onde,

v_1 – volume de ácido sulfúrico gasto na titulação do destilado (mL)

c – título da solução titulante de ácido sulfúrico

m – massa atómica relativa do azoto (≈ 14)

v_a – volume de amostra usada na destilação (mL)

v_b – volume do balão volumétrico utilizado na digestão (mL)

v_e – volume de amostra usada na digestão (mL)

3.2.8 Determinação do teor em nitritos, nitratos, sulfatos e cloretos através de cromatografia iónica

O teor de nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}) e cloretos (Cl^-) foi analisado por cromatografia iónica (DIONEX ICS3000), tendo sido realizadas injeções de 10 μL de cada amostra a 25°C numa coluna Thermo Ionpac AS9-HC com 250 mm de comprimento e 4 mm de largura. As amostras foram injetadas com diluições 10x, 100x, 200x e 500x, em água ultrapura. Por sua vez, os padrões foram preparados em água ultrapura a partir de soluções concentradas de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Sigma Aldrich).

3.2.9 Determinação de metais pesados e fósforo por ICP- AES

Em primeiro lugar, foi efetuada a digestão das amostras de cinzas (sólidos fixos) resultantes do procedimento para a determinação do teor de sólidos (secção 3.2.4). Deste modo, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico numa diluição 1:2 (PanReac, 65%) a cada cadinho contendo cinzas. Em seguida, colocaram-se os cadinhos num banho pré-aquecido a 95°C durante 20 min. Os digeridos foram posteriormente transferidos para balões volumétricos de 100 mL, aferindo-se com água ultrapura. As amostras digeridas foram finalmente filtradas para frascos de plástico e conservadas a 4°C.

A determinação dos metais e fósforo foi efetuada por espectrometria de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Equipamento utilizado foi Horiba Jobin-Yvon Ultima, monocromador Czerny-Turner com 1,00 m (sequencial) e amostrador automático AS500. As amostras foram injetadas com um caudal de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.3 Pré-tratamento físico-químico do lixiviado de aterro

3.3.1 Preparação dos ensaios para as diferentes condições de pré-tratamento

O método de pré-tratamento selecionado foi a precipitação química com agitação por ar, tendo sido utilizados como agentes de precipitação o hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) e cinzas de biomassa. Os ensaios foram realizados em duas fases, nos quais foram estudados os efeitos da variação do agente de precipitação químico, do tempo de contacto e da razão massa/volume

3.3.1.1 Variação da razão massa/volume de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (primeira fase)

Numa primeira fase efetuou-se o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, tendo sido utilizadas razões massa/volume que variam entre os 2 g $\text{Ca}(\text{OH})_2\cdot\text{L}^{-1}$ e os 120 g $\text{Ca}(\text{OH})_2\cdot\text{L}^{-1}$. Através do

auxílio de uma balança analítica, adicionou-se aproximadamente 0,5 g de hidróxido de cálcio para um erlenmeyer de 250 mL. Com uma proveta mediu-se 250 mL de lixiviado de aterro previamente homogeneizado, vertendo-se este volume para o erlenmeyer contendo o hidróxido de cálcio. De seguida, colocou-se uma pipeta ligada por um tubo de silicone a uma bomba, deixando sob borbulhamento contínuo (agitação) durante um período de 24 h.

Após este tempo, parou-se a agitação deixando a mistura decantar durante 15 min. Em seguida, filtrou-se o lixiviado e registou-se o volume obtido de lixiviado pré-tratado, sendo este armazenado em frasco de plástico e reservado a 4 °C.

O procedimento acima descrito foi efetuado para as sete condições estudadas nesta primeira fase, estando estas representadas na tabela 3.2. Todos os ensaios para as diferentes condições de pré-tratamento foram realizados em duplicado.

Tabela 3.2 - Identificação das diferentes condições de pré-tratamento em estudo na primeira fase de pré-tratamento.

| Condição | Razão massa/volume (g.L ⁻¹) | Massa de Ca(OH) ₂ (g) |
|----------|---|----------------------------------|
| C1 | 2 | 0,5 |
| C2 | 16 | 4 |
| C3 | 32 | 8 |
| C4 | 40 | 10 |
| C5 | 48 | 12 |
| C6 | 80 | 20 |
| C7 | 120 | 30 |

3.3.1.2 Variação do tempo de contacto e do agente de precipitação (segunda fase)

Na segunda fase dos ensaios de pré-tratamento as variantes estudadas foram o tempo de contacto (48 h) e o agente de precipitação (cinza de biomassa). Todos os ensaios nesta fase utilizaram a mesma razão massa/volume, isto é, 120 g.L⁻¹.

Relativamente à condição onde se utilizou como agente de precipitação o hidróxido de cálcio, a única alteração consiste no prolongamento do tempo de contacto de 24 h para 48 h, tendo sido efetuado o mesmo procedimento descrito na secção 3.3.1.1.

No caso do ensaio onde se adicionou cinzas de biomassa foi efetuada, previamente, uma crivagem com um crivo de 500 µm (Éndecotts, Ltd.). Após esta etapa, procedeu-se da mesma forma como descrito na secção 3.3.1.1. Na tabela 3.3 estão representadas as condições ensaiadas nesta fase, tendo sido realizados duplicados para cada condição.

Tabela 3.3 - Identificação das diferentes condições de pré-tratamento em estudo na segunda fase de pré-tratamento.

| Condição | A.P. | Δt (h) | Razão massa/volume (g.L ⁻¹) |
|----------|---------------------|----------------|---|
| C8 | Ca(OH) ₂ | 48 | 120 |
| C9 | cinza | 24 | |

A.P – Agente de precipitação

 Δt – tempo de contacto

3.3.2 Caracterização do lixiviado de aterro após pré-tratamentos

Após aplicações das diferentes condições de pré-tratamento foram efetuadas análises para a determinação da densidade ótica (540 e 600 nm), da condutividade, do pH, do teor de sólidos, da CQO, da CBO₅, do azoto total e fósforo total, dos nitritos, nitratos, sulfatos e cloretos e metais, da mesma forma que descrito nas secções 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8 e 3.2.9, respetivamente.

3.4 Bioremediação do lixiviado pré-tratado com a microalga *S. obliquus*

3.4.1 Instalação dos reatores para os ensaios de crescimento das microalgas

Após efetuada a etapa de pré-tratamento, iniciou-se a etapa de bioremediação do lixiviado de aterro. Previamente à instalação do ensaio, todo o material de vidro utilizado foi esterilizado em autoclave (Darlab K-400) à temperatura de 120°C durante 30 min. A zona de montagem dos reatores foi desinfetada antes, durante e após os ensaios, de forma a evitar contaminações.

Para a montagem dos reatores foram utilizados erlenmeyers de 1 L de capacidade aos quais se aplicou uma pipeta ligada por um tubo de silicone a bombas permitindo assim a agitação do meio de crescimento das microalgas por borbulhamento de ar. De modo a evitar contaminações externas no meio e ao mesmo tempo fixar a pipeta, fecharam-se as aberturas dos erlenmeyers com algodão enrolado em gaze. Os reatores foram colocados numa sala à temperatura ambiente de 22 ± 2°C sob luz artificial provenientes de lâmpadas fluorescentes de ± 5000 lux de intensidade luminosa, estando estas programadas para funcionar em ciclos de 12 h luz/12 h escuro. Na figura 3.2 está representada o esquema de instalação e a instalação real.

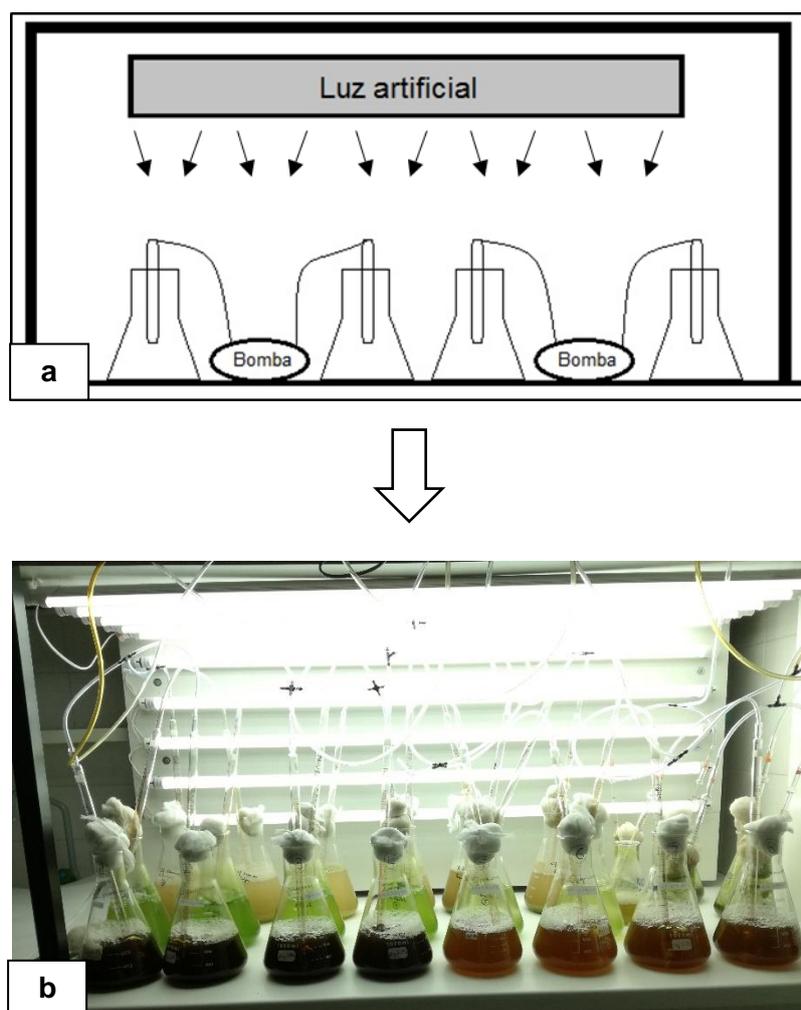


Figura 3.2 - Instalação dos ensaios de bioremediação: a) esquema; b) instalação real.

Tal como apresentado na tabela 3.4 foram selecionadas 7 condições de bioremediação, tendo sido em todas elas utilizado lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio e cinzas de biomassa, ambos com uma razão massa-volume de 120 g.L^{-1} . Todas as condições foram realizadas em duplicado.

Tabela 3.4 - Condições selecionadas para os ensaios de bioremediação com *S. obliquus*.

| Condição | Efluente | Volume de efluente (mL) |
|-----------------|---|-------------------------|
| R1 | Lixiviado pré-tratado com Ca(OH) ₂ | 650 |
| R2 | Lixiviado pré-tratado com Ca(OH) ₂ e diluído com H ₂ O destilada numa proporção 1:2 | 750 |
| R3 | Lixiviado pré-tratado com cinzas de biomassa | 750 |
| R4 | Lixiviado pré-tratado com cinzas de biomassa e diluído com H ₂ O destilada numa proporção 1:2 | 750 |
| R5 | Lixiviado pré-tratado com Ca(OH) ₂ e diluído com efluente de vacaria numa proporção 1:2 | 750 |
| R6 | Lixiviado pré-tratado com cinzas de biomassa e diluído com efluente de vacaria numa proporção 1:2 | 750 |
| R7 ¹ | Meio Bristol | 750 |

¹Condição de controlo

As primeiras condições a serem produzidas foram com o lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio e cinzas sem diluição (R1 e R3). Foram também realizadas diluições numa proporção de 1:2 com água destilada nos reatores com lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio e cinzas (R2 e R4).

Adicionalmente, foram produzidas duas outras condições, nas quais se fez uma diluição 1:2 com efluente de vacaria do lixiviado pré-tratado com hidróxido de cálcio e cinzas (R5 e R6).

No caso dos controlos (R7), estes foram realizados com meio Bristol indicado para a espécie de microalga utilizada. Após terem sido colocados os efluentes nos reatores, estes foram inoculados com *S. obliquus*, tendo sido estabelecida uma percentagem de inóculo na ordem dos 5,5% relativamente ao volume de efluente a remediar. Todos os ensaios foram realizados em duplicado, tendo sido terminados quando a cultura atingiu uma fase estacionária em termos do crescimento.

3.4.2 Monitorização e produção da biomassa algal

Durante os ensaios foi monitorizado o crescimento das microalgas a cada 2 dias, tendo sido recolhidas amostras por forma a analisar a densidade ótica (540 nm) e o pH (secções 3.2.1 e 3.2.3). Além disto, foram feitas colheitas semanais para realizar determinações da CQO (secção 3.2.5). No final dos ensaios, antes de se proceder à colheita da biomassa, foi recolhido um volume adequado de amostra de cada um dos reatores de modo a proceder-se à determinação dos SST ou “pesos secos” (secção 3.2.4.4).

Relativamente à colheita da biomassa algal, os reatores foram deixados em repouso com o intuito de promover a deposição da cultura. De seguida, foi efetuada uma centrifugação (Sigma 4K15) a 11000 rpm, à temperatura de 15°C durante 5 min. A biomassa algal, já separada do efluente tratado (sobrenadante), foi seca em estufa a $40 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 12 h (figura 3.3). O efluente tratado foi armazenado em frascos de plástico e colocado em câmara fria a 4°C até posterior análise.

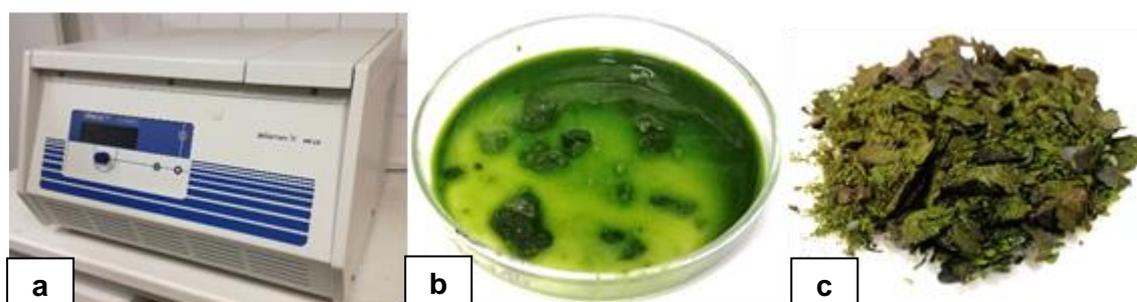


Figura 3.3 - Colheita e secagem das microalgas. a) centrífuga, b) recolha da biomassa após centrifugação e c) biomassa após secagem em estufa.

3.4.3 Caracterização do lixiviado de aterro pré-tratado após bioremediação

Concluída a etapa de bioremediação, foram efetuadas análises para a determinação da densidade ótica (540 nm e 600 nm), da condutividade, do pH, do teor de sólidos, da CQO, da CBO_5 , do azoto total, fósforo total, dos nitritos, nitratos, sulfatos e cloretos e metais da mesma forma que descrito nas secções 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6, 3.2.7, 3.2.8 e 3.2.9, respetivamente.

3.5 Determinação do teor em açúcares presentes na biomassa algal

3.5.1 Hidrólise ácida

Por forma a extrair os hidratos de carbono presentes na biomassa algal e, por sua vez, convertê-los em açúcares simples capazes de serem fermentáveis, foi efetuada uma hidrólise

ácida. A metodologia de hidrólise foi adaptada de Shokrkar e colaboradores (2017), tendo sido reproduzida a melhor condição (0,5M H₂SO₄ + 2,5% (m/v) MgSO₄) determinada no estudo (Shokrkar et al., 2017).

Para um frasco de shot de 250 mL pesou-se, 8 g de biomassa algal, 5 g de MgSO₄ e de seguida adicionou-se cerca de 200 mL de H₂SO₄ 0,5M. Posteriormente, colocou-se o frasco na autoclave a 121°C durante 40 min. Após este tempo, o hidrolisado foi arrefecido até temperatura ambiente, tendo sido anotado o seu volume, procedendo-se à sua neutralização com NaOH 6M. O procedimento terminou com a filtração do hidrolisado, tendo este sido armazenado em frasco de plástico a 4°C.

3.5.2 Determinação de açúcares totais

A determinação do teor em açúcares totais foi efetuada de acordo com o método colorimétrico do reagente fenol-sulfúrico (DuBois et al., 1956), tendo cada ensaio sido realizado em triplicado.

Em tubos de ensaio, previamente passados por ácido e lavados com água destilada, foi adicionado 0,5 mL de amostra anteriormente filtrada e diluída numa razão adequada. De seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução de fenol (Panreac) 5% (m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (> 95%, Panreac). Posteriormente, as misturas foram homogeneizadas em agitador vórtice e colocadas em repouso durante 10 min. Passado este tempo, os tubos contendo as amostras foram mergulhados em banho de água fria durante 15 min. No final procedeu-se à leitura das amostras no espectrofotómetro a 490 nm.

A concentração dos açúcares totais foi obtida a partir da reta de calibração feita com base em padrões de glucose (Sigma), preparados por diluição a partir de uma solução-mãe de glucose (1 g.L⁻¹), com gamas de concentração que variaram entre os 10 e os 100 mg.L⁻¹, sujeitos ao método previamente descrito (figura 3.4).

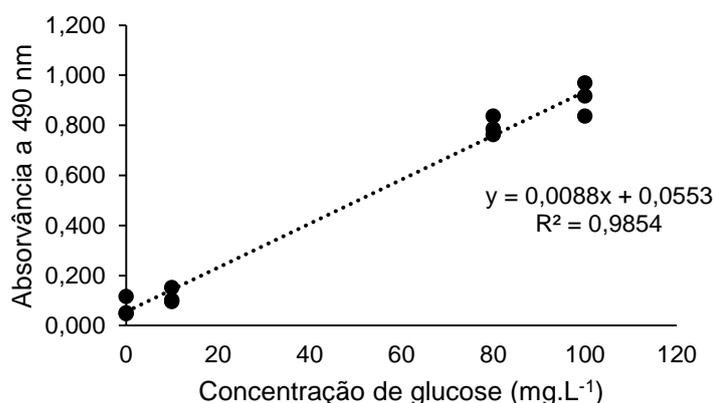


Figura 3.4 - Reta de calibração utilizada na determinação dos açúcares totais.

3.5.3 Determinação de açúcares redutores

A determinação do teor de açúcares redutores foi realizada segundo o método do reagente 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), sendo que cada ensaio foi realizado em triplicado.

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de amostra, previamente diluída, e igual volume de reagente DNS. As misturas foram homogeneizadas em agitador vórtice e colocadas num banho a 100°C durante 5 min. Após este tempo, deixaram-se as amostras a repousar até temperatura ambiente e em seguida adicionou-se a cada tubo 5 mL de água destilada. Seguidamente, efetuaram-se as leituras das amostras no espectrofotómetro a 540 nm.

A concentração dos açúcares redutores foi obtida a partir da reta de calibração feita com base em padrões de glucose (Sigma) preparados por diluição a partir de uma solução-mãe de glucose (2 g.L⁻¹) com gamas de concentração que variaram entre os 50 e os 1500 mg.L⁻¹, sujeitos ao método anteriormente descrito (figura 3.5).

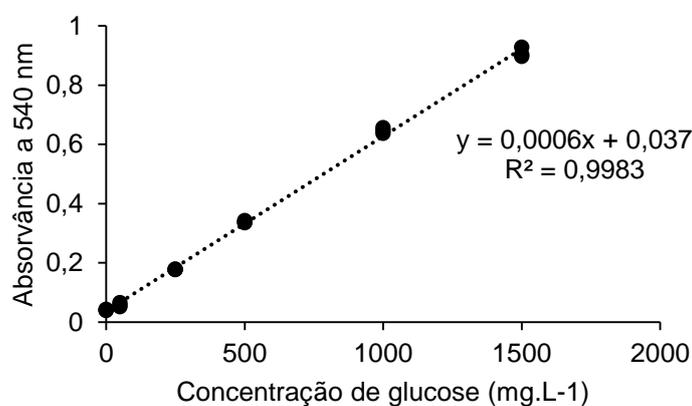


Figura 3.5 - Reta de calibração utilizada na determinação dos açúcares redutores.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

4.1 Caracterização do lixiviado de aterro

O lixiviado de aterro utilizado neste estudo teve origem num aterro industrial de resíduos não perigosos localizado na zona de Setúbal. Na tabela 4.1 estão presentes os valores dos vários parâmetros físico-químicos selecionados para a caracterização do lixiviado bruto.

Tabela 4.1 - Caracterização do lixiviado de aterro utilizado no estudo.

| Parâmetro | | Lixiviado bruto |
|--|---------------------|----------------------|
| D.O. (nm) | D.O. ₆₀₀ | 2,640 ($\pm 0,1$) |
| | D.O. ₅₄₀ | 3,630 ($\pm 0,1$) |
| pH | | 8,1 ($\pm 0,3$) |
| Condutividade (mS.cm ⁻¹) | | 41,6 ($\pm 0,9$) |
| Sólidos (mg.L ⁻¹) | ST | 31953 (± 85) |
| | SV | 6113 (± 75) |
| | SF | 25840 (± 76) |
| | SST | 12133 (± 1477) |
| CQO (mg.L ⁻¹) | | 11717 (± 571) |
| CBO ₅ (mg.L ⁻¹) | | 1100 (± 141) |
| NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) | | 3356 |
| P _{Total} (mg.L ⁻¹) | | 3,9 |

Tal como representado na tabela 2.8, os lixiviados de aterro apresentam uma grande variabilidade composicional em resultado de vários fatores, sendo de destacar a idade do aterro que influencia decisivamente o tipo de equilíbrios químicos entre os componentes do lixiviado (Slack et al. 2005; Abbas et al. 2009; Naveen et al. 2017). De acordo com Renou e colaboradores (2008) e Ağdağ (2017), os parâmetros mais importantes na caracterização de um lixiviado e que permitem, por sua vez, definir o tipo de tratamento a ser aplicado correspondem ao pH, CQO, CBO₅, SST, azoto amoniacal e metais pesados (Ağdağ, 2017; Renou et al., 2008a).

No caso do lixiviado utilizado, este proveio de um aterro com 11 anos, encontrando-se atualmente numa fase metanogénica, apresentando um valor de pH de 8,1 (tabela 4.1),

característico dos lixiviados metanogénicos estabilizados, e de acordo com valores encontrados na literatura (Kjeldsen et al., 2002; Renou et al., 2008b). Este valor de pH é explicado pelo processo de transformação dos ácidos orgânicos (e.g. húmicos e fúlvicos), presentes em maiores quantidades nas fases iniciais do aterro, em metano e dióxido de carbono contribuindo para o aumento deste parâmetro ao longo do tempo (Naveen et al., 2017; Williams, 2005).

Relativamente à CQO e CBO₅ os valores obtidos foram, respetivamente, 11717 mg.L⁻¹ e 1100 mg.L⁻¹ apresentando um razão CBO₅/CQO de 0,09. De acordo com Williams (2005) e Gao e colaboradores (2015), o valor para a CQO e CBO tendencialmente diminui com a idade do aterro em resultado dos processos de biodegradação que ocorrem nas várias fases de evolução, em especial na fase de metanogénese (Williams, 2005). Num outro estudo feito por Castrillón e colaboradores (2010) sobre a evolução das características físico-químicas de um aterro em Espanha, verificou-se a diminuição em 82% para a CQO entre os anos de 1988 e 1999, alcançando nesse último um valor de 2838 mg.L⁻¹. Contudo, o valor obtido neste trabalho para a CQO (tabela 4.1) encontra-se, substancialmente, acima dos valores normalmente encontrados para aterros metanogénicos, e em conformidade com os valores para a CQO obtidos noutros estudos relativos a aterros industriais (Palma et al., 2002). Esta variabilidade é comum pois os aterros são entidades dinâmicas com modificações diárias que têm impacto na composição dos respetivos lixiviados. Para além do valor de CQO ser elevado, sendo indicador de uma carga orgânica refratária elevada (Li et al., 1999), a presença de resíduos de origem industrial conduz a uma menor fração de material orgânico biodegradável no lixiviado e, conseqüentemente, a baixas razões de CBO₅/CQO (Renou et al., 2009). Além disso, ao ter um grau de estabilização elevado, o lixiviado em estudo acaba por limitar as opções de tratamento, em especial, os métodos biológicos convencionais os quais requerem frações consideráveis de material orgânico biodegradável (Naveen et al., 2017; Oloibiri et al., 2015).

Outro parâmetro analisado foi o teor de SST para o qual se obteve um valor de 12133 mg.L⁻¹ no lixiviado bruto. Apesar do valor obtido ser mais elevado comparativamente a outros lixiviados (Capela, 2014; El-Gohary and Kamel, 2016), este resultado é explicado pelas condições climáticas presentes na altura de recolha do lixiviado, Outubro de 2016. Para além de ser um período posterior ao Verão, ou seja, depois de alguns meses caracterizados por temperaturas altas e precipitação baixa, de acordo com o boletim climatológico de Outubro de 2016 publicado pelo IPMA, esse mês foi considerado quente e seco com base nas temperaturas médias do ar e precipitação total (IPMA, 2016). Estas condições meteorológicas conduziram a taxas de evaporação elevadas e, conseqüentemente, a maiores concentrações de sólidos suspensos. O efeito das condições meteorológicas sobre as características do lixiviado de aterro, nomeadamente, os sólidos suspensos já foi observado noutros estudos (Ağdağ, 2017).

Em relação ao azoto amoniacal e fósforo total os valores obtidos foram de 3356 mg.L⁻¹ e 3,9 mg.L⁻¹, respetivamente, estando de acordo com os valores encontrados na literatura (Castrillón

et al., 2010; Kjeldsen et al., 2002; Li et al., 2010a; Naveen et al., 2017; Williams, 2005). Ao contrário dos parâmetros CQO e CBO_5/CQO , no caso do azoto amoniacal existe uma tendência para os valores se manterem elevados à medida que a idade do aterro aumenta (Lema et al., 1988).

4.2 Caracterização do pré-tratamento físico – químico

A realização do pré-tratamento físico-químico do lixiviado teve como objetivo principal a redução das concentrações de compostos não biodegradáveis, como é o caso dos ácidos húmicos e fúlvicos, bem como outros compostos tóxicos (e.g. metais pesados) que podem comprometer a etapa de bioremediação, nomeadamente, o crescimento das microalgas (Abbas et al., 2009; Gao et al., 2015). Por outro lado, ao garantir um pré-tratamento do lixiviado promove-se a redução das concentrações de outros parâmetros de descarga do efluente, como é o caso da carência química de oxigénio e do azoto amoniacal (Abbas et al., 2009; Lema et al., 1988).

De acordo com o descrito na metodologia, a etapa de pré-tratamento decorreu em duas fases, tendo sido testado em cada uma destas diferentes variáveis. Na primeira fase foi observado o efeito da variação da razão massa/volume de hidróxido de cálcio, enquanto na segunda fase foram estudados os efeitos tanto da variação do agente de precipitação (hidróxido de cálcio vs. cinzas) como da duração do respetivo tratamento (24h vs. 48h).

4.2.1 Variação da razão massa/volume de hidróxido de cálcio (primeira fase)

Com o intuito de determinar a razão ótima de hidróxido de cálcio foram realizados sete ensaios, utilizando razões de massa de hidróxido de cálcio / volume lixiviado que variaram entre 2 e 120 g.L^{-1} . Após decantação e filtração do lixiviado pré-tratado, determinaram-se os efeitos das diferentes condições testadas nos vários parâmetros selecionados: densidade ótica (600 nm e 540 nm), pH, condutividade, teor de sólidos, CQO, azoto e fósforo total. Os resultados para estes parâmetros estão representados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Caracterização das condições testadas na 1.^a fase do pré-tratamento físico-químico do lixiviado.

| Condição | Razão massa/volume (g.L ⁻¹) | DO (nm) | | pH | Condutividade (mS.cm ⁻¹) | Sólidos (mg.L ⁻¹) | | | | CQO (mg.L ⁻¹) | N _{Total} (mg.L ⁻¹) | P _{Total} (mg.L ⁻¹) |
|-----------|---|----------------------------|-------------------|-------------|---|-------------------------------|--------------|---------------|-------------|------------------------------|---|---|
| | | DO ₆₀₀ | DO ₅₄₀ | | | ST | SV | SF | SST | | | |
| | | Lixiviado bruto | n/a | | | 2,640 (±0,1) | 3,630 (±0,1) | 8,1 (±0,3) | 41,6 (±0,9) | | | |
| C1 | 2 | 2,178 (±0,01) | 3,293 (±0,01) | 8,9 (±0,1) | 40,8 (±0,2) | 31863 (±524) | 5797 (±482) | 26067 (±310) | 2453 (±84) | 8788 (±202) | 2875 (±349) | 5 |
| C2 | 16 | 1,780 (±0) | 2,700 (±0) | 10,3 (±0,1) | 33,6 (±0,4) | 29983 (±420) | 4485 (±672) | 25730 (±849) | 2123 (±278) | 8300 (±383) | 2482 (±91) | 1,4 |
| C3 | 32 | 0,408 (±0,01) | 0,677 (±0,03) | 12,7 (±0,1) | 44,8 (±0,6) | 27910 (±439) | 2780 (±191) | 25130 (±622) | 1690 (±50) | 6616 (±509) | 2607 (±76) | 0,8 |
| C4 | 40 | 0,470 (±0,05) | 0,737 (±0,08) | 12,8 (±0,1) | 44,3 (±0,4) | 31585 (±445) | 4960 (±198) | 26625 (±643) | 2350 (±167) | 5960 (±690) | 2435 (±171) | 0,6 |
| C5 | 48 | 0,316 (±0) | 0,495 (±0) | 12,9 (±0,1) | 46,2 (±0,2) | 27243 (±74) | 1780 (±104) | 25463 (±150) | 1577 (±169) | 5300 (±200) | 2590 (±234) | 0,7 |
| C6 | 80 | 0,335 (±0,05) | 0,529 (±0,08) | 13,7 (±0,1) | 39,5 (±1,1) | 27147 (±370) | 1460 (±127) | 26173 (±535) | 1727 (±59) | 5657 (±738) | 2170 (±54) | 1,2 |
| C7 | 120 | 0,147 (±0) | 0,248 (±0) | 13,7 (±0,1) | 42,5 (±0) | 27663 (±131) | 2295 (±49) | 26133 (±1446) | 1557 (±55) | 5000 (±231) | 2339 (±49) | 1,3 |

Numa primeira análise, tal como demonstrado na figura 4.1 verificou-se uma redução na densidade ótica a 600 nm entre 17,5% (C1) e 94,4% (C7), comprovada pela descoloração gradual do lixiviado. Esta redução está relacionada com a precipitação dos compostos recalcitrantes (e.g. ácidos húmicos e fúlvicos) que conferem uma coloração escura aos lixiviados (Castrillón et al., 2010; Renou et al., 2009; Renou et al., 2008b). Na figura 4.2 estão representados os diferentes lixiviados pré-tratados nas várias condições testadas. Como é possível observar, ocorre uma mudança evidente na coloração do lixiviado, passando de castanho-escuro (lixiviado bruto) para amarelo (C7) em resultado da precipitação dos compostos recalcitrantes.

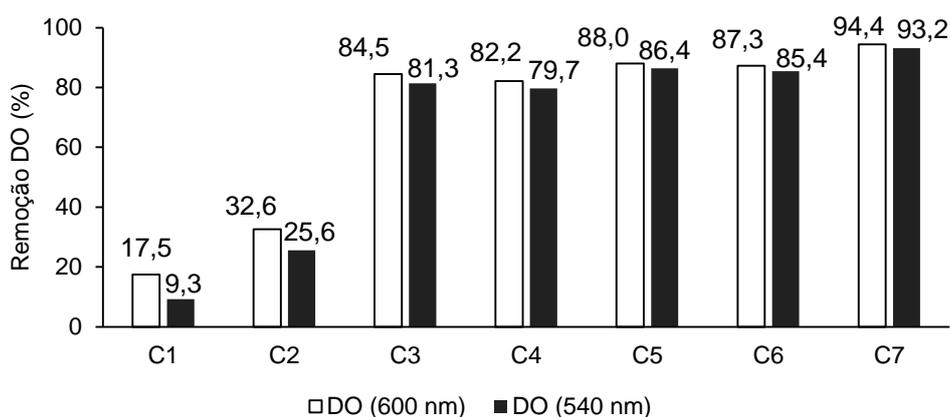


Figura 4.1 - Percentagem de remoção para densidade ótica (600 e 540 nm) nas várias condições de pré-tratamento. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.



Figura 4.2 - Evolução da cor do lixiviado nas várias condições de pré-tratamento.

Paralelamente, foi também avaliada a densidade ótica a 540 nm com o intuito de verificar se o pré-tratamento realizado permitiu reduzi-la para valores aceitáveis para a etapa de bioremediação. Isto deve-se ao facto das microalgas serem organismos, maioritariamente, fotoautotróficos, estando a produtividade de biomassa dependente da quantidade de luz

presente no meio (Blair et al., 2013). Também para este c.d.o. foi possível verificar uma diminuição significativa que variou entre os 9,3% (C1) e 93,2% (C7), tal como representado na figura 4.1.

É bastante evidente tanto na figura 4.1 como na figura 4.2 que a partir da concentração C3 (32 g/L), ocorrem de forma muito mais intensa processos que conduzem à precipitação de componentes que contribuem para a cor, turvação e CQO do lixiviado.

Relativamente aos valores de pH e condutividade presentes na tabela 4.2, a adição de hidróxido de cálcio ao lixiviado resultou num aumento destes dois parâmetros, estando este efeito relacionado com a dissolução dos iões OH^- e Ca^{2+} no meio (Renou et al., 2009). Para adições de hidróxido de cálcio entre 2g.L^{-1} e 32g.L^{-1} observa-se uma sensível elevação do pH do meio entre 8 e 12; no entanto para adições entre 32g.L^{-1} e 120g.L^{-1} o pH aumenta até 13,7, não atingindo o valor de 14 e observa-se alguma precipitação pois atinge-se o limite de solubilidade do hidróxido de cálcio no lixiviado. Como se pode observar na figura 4.3, para valores elevados de pH (13,7), a condutividade diminuiu para valores próximos do lixiviado bruto, o que indicou que o processo contribuiu para a remoção de iões em solução. Uma possível explicação para este efeito poderá estar relacionada com a desprotonação de compostos ácidos pelos iões OH^- e a complexação/agregação dos ácidos húmicos e fúlvicos por meio dos iões Ca^{2+} (Bolea et al., 2006; Kloster et al., 2013; Melo et al., 2015).

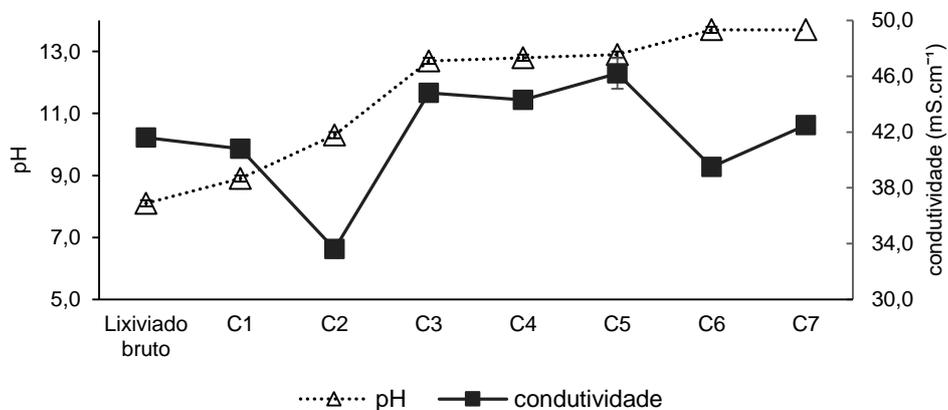


Figura 4.3 - Valores de pH e condutividade medidos para as várias condições e bruto. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.

De acordo com os dados presentes na tabela 4.2 foi possível constatar que o pré-tratamento não resultou em significativas reduções das concentrações de ST, SV e SF havendo uma distribuição bastante uniforme destes nas várias condições testadas relativamente ao lixiviado bruto. Estes valores são uma consequência do equilíbrio entre a dissolução de hidróxido de cálcio e a remoção de alguns dos componentes do lixiviado por precipitação. Contudo, no caso dos

SST observaram-se diminuições significativas, tendo-se alcançado uma redução máxima de 87,2% (C7), tal como representado na figura 4.4. Num estudo sobre remediação de efluentes de aquacultura, o uso de hidróxido de cálcio como agente coagulante permitiu alcançar valores de remoção para SST na mesma ordem de grandeza (Sharrer et al., 2009). Na verdade, a redução deste parâmetro já tinha sido indiretamente deduzida através da redução da DO_{600} , visto que a presença de materiais em suspensão afeta a passagem da luz pela solução e, conseqüentemente contribuem para o aumento da turvação da mesma (Holliday et al., 2003; Hui et al., 2011)

Torna-se importante referir que a diminuição da fração de SST por meio de um pré-tratamento contribui para a redução dos custos de tratamento nas estações, na medida em que limita a colmatação das membranas utilizadas e a frequência com que estas são substituídas, tal como ocorre no processo de osmose inversa (Gao et al., 2015; Kurniawan et al., 2006; Renou et al., 2008b). Além disso, ao reduzir quantidade de partículas em suspensão promove-se passagem de um maior quantidade de luz no efluente contribuindo para o processo fotossintético essencial para o crescimento das microalgas na etapa seguinte de bioremediação (Blair et al., 2013; Holliday et al., 2003; Markou et al., 2012).

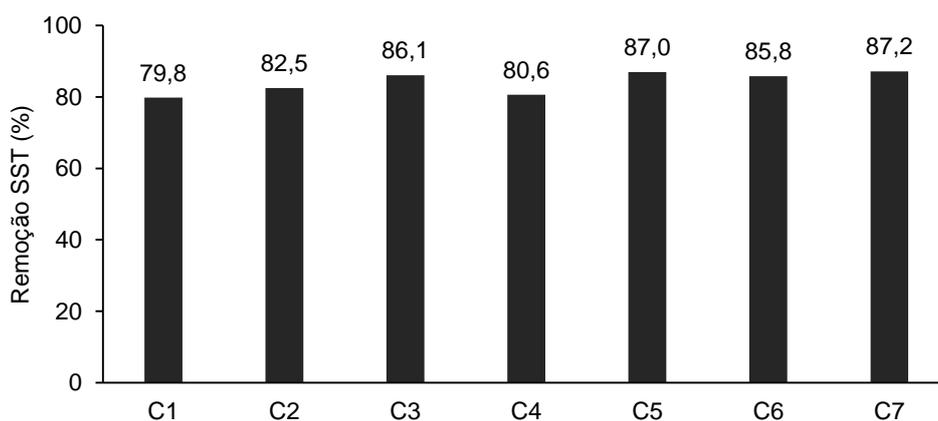


Figura 4.4 - Percentagem de remoção de SST nas várias condições de pré-tratamento. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.

Tal como mencionado, a CQO é um indicador da quantidade de matéria orgânica presente num dado efluente, sendo um dos parâmetros exigidos aquando da descarga de efluentes para o ambiente (Renou et al., 2008a). Relativamente à CQO obtida nas várias condições realizadas, houve uma redução gradual mas significativa deste parâmetro, variando entre os 8788 mg.L⁻¹ e os 5000 mg.L⁻¹, tal como presente na tabela 4.2. Apesar do método de precipitação químico não ser considerado o mais eficiente em termos de remoção da CQO (Abbas et al., 2009; Amokrane et al., 1997; Gao et al., 2015), as percentagens de remoção alcançaram um valor máximo de 57,3% o que está acima dos valores observados por outros autores (Li et al., 1999; Quan et al., 2010). De acordo com estudos feitos por Renou e colaboradores (2008 e 2009), a redução dos

valores da CQO está relacionada com a capacidade do hidróxido de cálcio em precipitar os compostos recalcitrantes (e.g. ácidos húmicos), bem como outros compostos presentes no lixiviado (Kloster et al., 2013; Renou et al., 2009; Renou et al., 2008b). Na figura 4.5 estão indicadas as percentagens de remoção da CQO para o pré-tratamento efetuado.

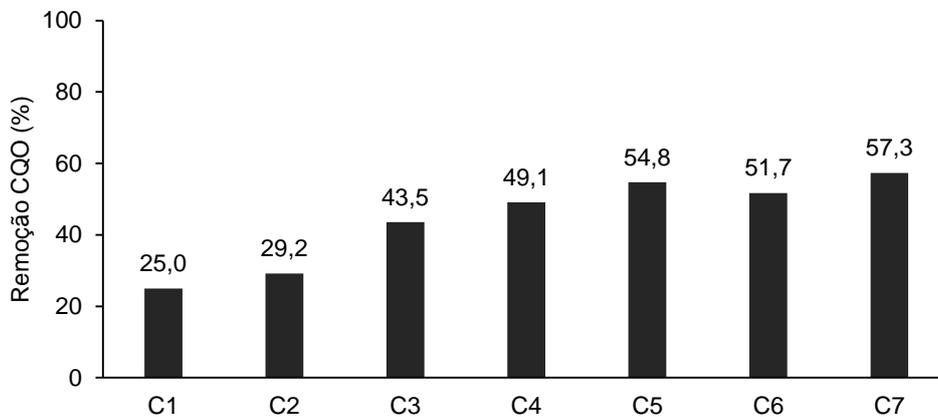


Figura 4.5 - Percentagem de remoção para a CQO nas várias condições de pré-tratamento. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.

A utilização do método de precipitação química apresenta consideráveis eficiências de remoção de azoto total, nomeadamente de NH₄⁺ (Abbas et al., 2009; Gao et al., 2015). De facto, através da tabela 4.2 é possível notar a redução das concentrações à medida que a razão mássica de hidróxido de cálcio aumenta, apresentando reduções de 35,7% (2170 mg.L⁻¹) e 30,7% (2339 mg.L⁻¹) para C6 e C7, respetivamente. Além do efeito do agente precipitante sobre a concentração de azoto, a agitação contínua por borbulhamento de ar conduz à libertação de azoto amoniacal na forma gasosa (NH₄⁺) sentida pela presença de um odor moderado. A libertação de amónia está relacionada com a adição de hidróxido de cálcio que promove a subida do pH da solução para valores acima de 7, deslocando o equilíbrio químico no sentido dos produtos (Ferraz et al., 2017; Metcalf and Eddy, 2003). A quantidade de azoto que se volatilizou não foi monitorizada neste estudo. No entanto, assume-se que será a razão pela qual a condição C7 tenha apresentado um valor ligeiramente inferior à condição C6. Na figura 4.6 estão representadas as percentagens de remoção para as várias condições, verificando-se que a condição C6 é a que apresenta a maior eliminação.

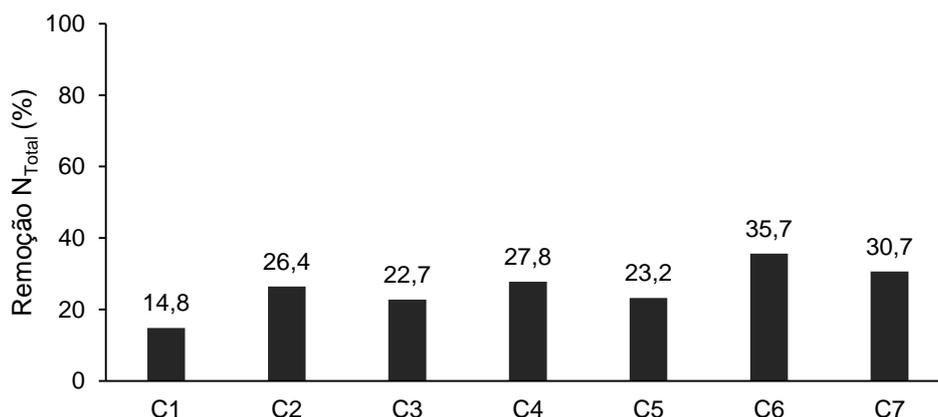


Figura 4.6 - Percentagem de remoção para o azoto total nas várias condições de pré-tratamento. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.

Relativamente ao fósforo total, as suas concentrações no lixiviado bruto já são relativamente baixas e durante a precipitação, foram ainda reduzidas: C2 (64,9%), C3 (80,4%), C4 (84,2%), C5 (81,4%), C6 (69,7%) e C7 (67,6%). Houve apenas uma exceção na condição C1 (2 g.L⁻¹), na qual a concentração aumentou relativamente ao bruto (figura 4.7). Todavia este resultado poderá ter sido afetado por um erro experimental, pelo que foi considerado que não houve remoção. A figura 4.7 ilustra os valores de fósforo total para as várias condições.

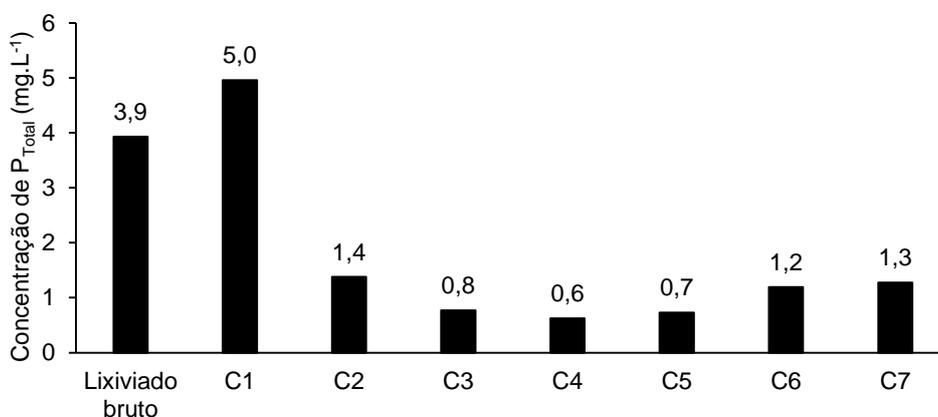


Figura 4.7 - Valores de fósforo total medidos para as várias condições e bruto. Legenda: C1 - 2 g.L⁻¹; C2 - 16 g.L⁻¹; C3 - 32 g.L⁻¹; C4 - 40 g.L⁻¹; C5 - 48 g.L⁻¹; C6 - 80 g.L⁻¹; C7 - 120 g.L⁻¹.

As baixas concentrações de fósforo total no lixiviado bruto e, conseqüentemente, a sua redução na etapa de precipitação acaba por ser uma desvantagem, visto que este elemento é um dos nutrientes principais no crescimento das microalgas, pelo que mantê-lo no efluente seria benéfico (Paskuliakova et al., 2016; Sandoval et al., 2015).

Tal como inicialmente proposto, a primeira fase de pré-tratamento tinha o objetivo de determinar a razão ótima de Ca(OH)₂ capaz de melhorar as características quantitativas e

qualitativas do lixiviado, permitindo que este pudesse ser sujeito à inoculação por microalgas na etapa de bioremediação. Deste modo, através dos resultados obtidos foi possível concluir que a razão massa/volume de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ótima foi de 120 g.L^{-1} . Esta seleção é sustentada principalmente por dois aspetos principais, designadamente, a redução substancial da cor do lixiviado e a diminuição do teor de SST, ambas com taxas de remoção acima dos 85% para a condição C7.

Embora considerando o alto grau de contaminação do lixiviado estudado e as taxas de remoção bastantes satisfatórias obtidas nas condições C6 e C7, o consumo de agente químico precipitante foi elevado podendo levantar questões de ordem económica à escala industrial. Tendo em conta a redução de CQO, SST e azoto total todas as condições superiores a C3 (32 g.L^{-1}) já produziram valores satisfatórios de remoção mas ainda assim será vantajoso identificar um agente de pré-tratamento de baixo custo, para que possa ser utilizado em concentrações elevadas sem ter um efeito muito negativo no balanço económico do processo. Neste sentido foi proposto na segunda fase de pré-tratamento o uso de um resíduo sólido (cinzas) como potencial substituto ao hidróxido de cálcio.

4.2.2 Variação do tempo de contacto e do agente de precipitação (segunda fase)

Na segunda fase do pré-tratamento, a razão massa/volume de agente de precipitação considerada foi a razão ótima definida na primeira fase (120 g.L^{-1}), tendo sido testados os efeitos da variação da duração do tratamento (Δt) e do agente de precipitação (A.P.). Na tabela 4.3 apresentam-se os resultados obtidos para DO_{600} e DO_{540} , pH, condutividade, teor de sólidos, CQO, CBO_5 , azoto e fósforo total, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- e metais

No que respeita à densidade ótica, verificou-se um aumento da taxa de remoção utilizando cinzas (C9) comparativamente aos ensaios com hidróxido de cálcio (C7), alcançando valores de 98,9% para C9, em ambos os c.d.o. (figura 4.8).

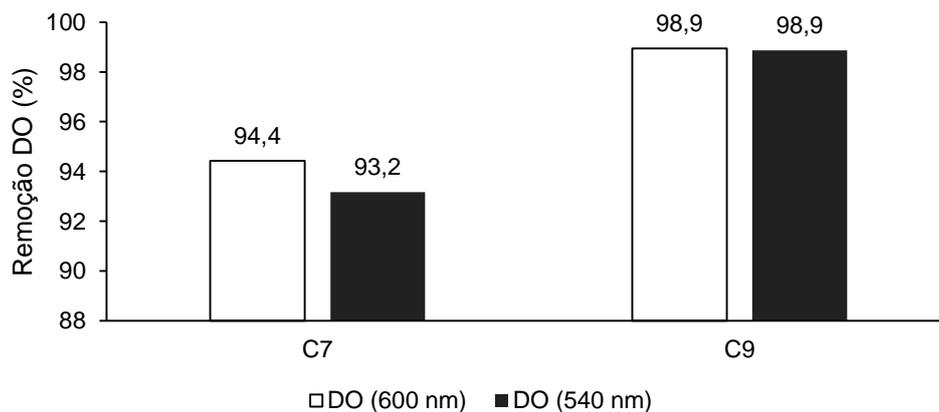


Figura 4.8 - Percentagem de remoção para densidade ótica (600 e 540 nm) para C7 e C9. Legenda: C7 - $120 \text{ g Ca}(\text{OH})_2.\text{L}^{-1}$; C9 - $120 \text{ g cinza.L}^{-1}$.

Tabela 4.3 - Caracterização das condições testadas na 2.^a fase do pré-tratamento físico-químico do lixiviado.

| Condição | A.P. | Δt (h) | DO (nm) | | pH | Condutividade (mS.cm ⁻¹) | Sólidos (mg.L ⁻¹) | | | | CQO (mg.L ⁻¹) | CBO ₅ (mg.L ⁻¹) | N _{Total} (mg.L ⁻¹) | P _{Total} (mg.L ⁻¹) | NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) | NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹) | NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹) | SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹) | Cl ⁻ (mg.L ⁻¹) |
|-----------|---------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------|---|-------------------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------------------|---|---|---|--|--|---|--|--|
| | | | DO ₆₀₀ | DO ₅₄₀ | | | ST | SV | SF | SST | | | | | | | | | |
| | | | Lixiviado bruto | - | | | - | 2,640 (±0,1) | 3,630 (±0,1) | 8,1 (±0,3) | | | | | | | | | |
| C7 | Ca(OH) ₂ | 24 | 0,147 (±0) | 0,248 (±0) | 13,7 (±0,1) | 42,5 (±0) | 27663 (±131) | 2295 (±49) | 26133 (±1446) | 1557 (±55) | 5000 (±231) | 600 (±0) | 2339 (±49) | 1,3 | 2320 | n/a | 19 | 281 | 11700 |
| C8 | Ca(OH) ₂ | 48 | 0,254 (±0,2) | 0,347 (±0,1) | 12,7 (±0,1) | 46,1 (±2,5) | 40863 (±1724) | 11985 (±290) | 29430 (±1739) | 2557 (±81) | 5743 (±229) | n/a | 869 (±72) | 1,0 | n/a | n/a | n/a | n/a | n/a |
| C9 | cinza | 24 | 0,028 (±0,1) | 0,041 (±0,1) | 11,0 (±0,1) | 46,4 (±1,7) | 37927 (±97) | 3880 (±70) | 34047 (±101) | 5150 (±477) | 4600 (±283) | 400 (±0) | 775 (±44) | 15,1 | 775 | n/a | n/a | 143 | 22749 |

Legenda: **C7** - 120 g Ca(OH)₂.L⁻¹ ; **C8** - 120 g Ca(OH)₂.L⁻¹; **C9** - 120 g cinza.L⁻¹

Δt – duração do tratamento.

A.P. – agente de precipitação.

Este efeito está relacionado com a composição mineral das cinzas de biomassa florestal, ricas em óxidos de cálcio (CaO) e silício (SiO₂), bem como outros elementos (magnésio, potássio, o alumínio, o sódio) (Lind and Nordh, 2004; Nunes et al., 2016; Olanders and Steenari, 1995). De facto, este efeito é bastante semelhante ao que ocorre para o hidróxido de cálcio observado na primeira fase do pré-tratamento. Todavia, no caso da cinza, esta tem a vantagem de apresentar uma maior variedade de elementos que contribuem para a precipitação dos compostos húmicos, conduzindo a aumentos na remoção destes. O incremento na eficiência de remoção é comprovado qualitativamente pela cor amarelo-claro obtida após decantação e filtração da condição C9, tal como demonstrado na figura 4.9.

Também na condição C8 há uma diminuição da DO₅₄₀ relativamente ao lixiviado bruto (90,4%). Contudo se compararmos com a condição C7 verifica-se que maiores tempos de tratamento conduzem a aumentos na DO em ambos os c.d.o. analisados.



Figura 4.9 - Diferença na cor do lixiviado bruto e pré-tratado com Ca(OH)₂ (C7) e cinza (C9).

Quanto aos valores de pH e condutividade, ambas as condições testadas tiveram aumentos significativos relativamente ao bruto (figura 4.10).

Porém, no caso dos ensaios com cinza, o pH para a condição C9 fixou-se nos 11, valor ligeiramente inferior ao determinado para a condição C7 (13,7). Isto é explicado pela diversidade composicional característica das cinzas, bem como das concentrações relativas de cada elemento. Assim, ao contrário do pré-tratamento realizado na primeira fase, no qual apenas os iões hidróxido (OH⁻) contribuem para o aumento do pH aquando da dissolução do Ca(OH)₂, no caso das cinzas estão presentes outros aniões cuja basicidade difere dos iões OH⁻.

Por outro lado, a adição de cinza apresentou um resultado para a condutividade (≈46 mS.cm⁻¹) superior ao dos ensaios com hidróxido de cálcio. Este efeito prende-se, mais uma

vez, com a composição química da cinza, constituída por uma diversidade de cátions (e.g. Ca^{2+}) e aniões havendo uma maior quantidade de iões a dissolverem-se na solução, ao contrário dos ensaios com hidróxido de cálcio onde apenas foram adicionados os iões Ca^{2+} e OH^- , e, portanto, podem atingir-se os limites de solubilidade relativos a cada um deles.

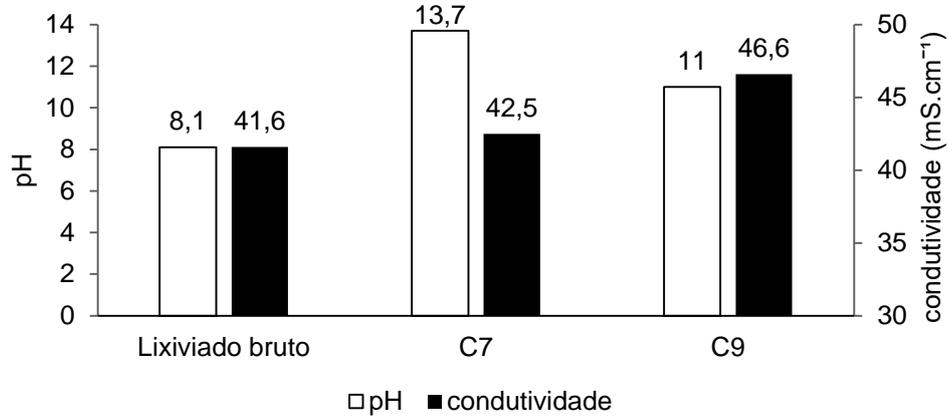


Figura 4.10 - Valores de pH e condutividade para as condições C7, C9 e bruto. Legenda: C7 - 120 g $\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot \text{L}^{-1}$; C9 - 120 g cinza. L^{-1} .

O efeito da adição de cinza sobre o teor de sólidos foi também analisado verificando-se um aumento considerável nos ST de, aproximadamente, 16% e 27% em relação ao lixiviado bruto e a C7, respetivamente. Além disso, verifica-se que a maioria dos sólidos presentes encontra-se associada à fração inorgânica (SF), com as cinzas a apresentarem o valor máximo de 34047 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tal como pode ser observado na figura 4.11. Este resultado é expectável, visto que as próprias cinzas são essencialmente a fração inorgânica que resulta dos processos de combustão da biomassa.

Não obstante, houve uma redução de 57,6% no teor de SST para a condição C9, indicando a capacidade da cinza em precipitar sólidos em suspensão. Contudo este valor foi inferior ao que se obteve nos ensaios com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (87,2%).

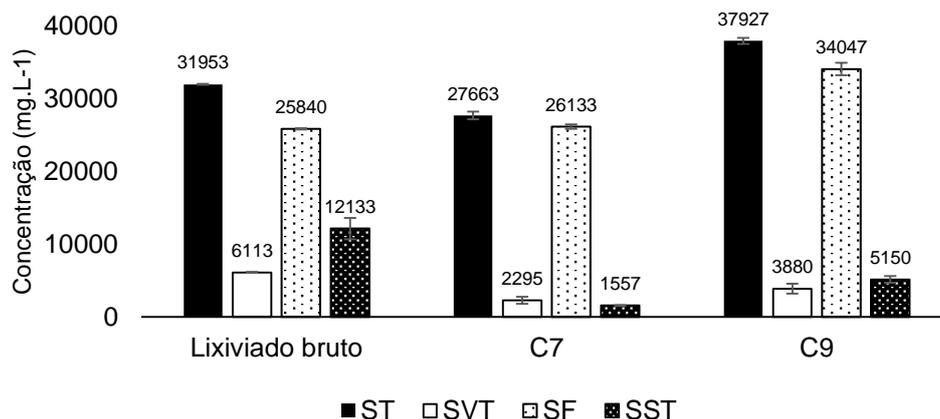


Figura 4.11 - Valores de ST, SV, SF e SST para as condições C7, C9 e bruto. **Legenda:** C7 - 120 g Ca(OH)₂.L⁻¹ ; C9 - 120 g cinza.L⁻¹.

Tal como observado na tabela 4.1, o lixiviado de aterro estudado apresentava valores para a CQO substancialmente elevados ($\approx 12000 \text{ mg.L}^{-1}$) tendo em conta a idade do aterro. A utilização do hidróxido de cálcio na dose ótima (C7) mostrou ser eficiente na remoção de mais de 50% da CQO, no entanto o uso de cinza verificou ser ainda mais, alcançando um valor final de 4600 mg.L^{-1} , correspondendo a 60,7% de remoção (figura 4.12).

Uma grande parte da CQO está ligada à fração orgânica húmica que, em condições alcalinas, sofre um processo de desprotonação dos grupos funcionais tornando a sua estrutura mais disponível para estabelecer ligações catiónicas (Bolea et al., 2006; Martin et al., 2017; Melo et al., 2015). As variedades de catiões polivalentes presentes na cinza, bem como a sua natureza alcalina, favorecem a ocorrência de fenómenos de complexação das substâncias húmicas numa extensão superior ao que ocorre com Ca(OH)₂. Deste modo, mais compostos húmicos são removidos por precipitação e, conseqüentemente, o valor da CQO diminui.

A condição C8 mostrou ter o valor mais elevado para a CQO (5743 mg.L^{-1}) comparado com C7 e C9, o que mostra mais uma vez que o aumento do tempo de contacto não resulta numa maior eficiência de remoção. De facto, ao prologarmos o tempo do tratamento em agitação contínua, promovemos uma maior dissolução do hidróxido de cálcio no efluente. Como descrito por Kjeldsen e colaboradores (2002), o valor da CQO não é só influenciado pela fração orgânica, mas também a presença de determinados constituintes inorgânicos cooperam para este aumento (Kjeldsen et al. 2002).

Um outro parâmetro relacionado diretamente com a CQO corresponde à carência bioquímica de oxigénio (CBO₅), sendo um indicador da matéria orgânica que se encontra disponível para ser degradada pelos microrganismos. Em comparação com a CBO₅ observada para o lixiviado bruto (1100 mg.L^{-1}), houve uma considerável diminuição para a 600 e 400 mg.L^{-1} nas condições C7 e C9, respetivamente.

A figura 4.12 mostra os resultados para a CQO e CBO₅ para as várias condições analisadas.

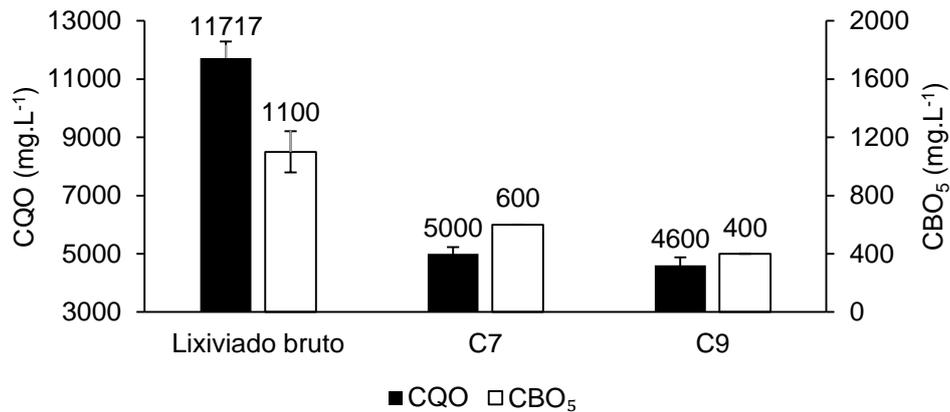


Figura 4.12 - Valores para a CQO e CBO₅ nas condições C7, C9 e bruto. **Legenda:** C7 - 120 g Ca(OH)₂. L⁻¹; C9 - 120 g cinza.L⁻¹.

Numa primeira análise, a elevada CQO em comparação com a CBO₅ permite deduzir que grande parte da carga orgânica não se encontra biodisponível, isto é, não está acessível para os microrganismos a degradarem. Isto pode ser comprovado através das razões CBO₅/CQO que indicam o estado de biodegradação de um dado efluente, sendo que no caso das condições C7 e C9 foi de 0,12 e 0,08, respetivamente. Apesar de baixos, estes são valores típicos de um lixiviado estabilizado sujeito a um processo de decomposição biológico intenso (Abbas et al., 2009; Kjeldsen et al., 2002).

Por outro lado, os resultados obtidos por cromatografia iónica indicaram a presença de cloretos (Cl⁻) e sulfatos (SO₄²⁻) no lixiviado. Este ião é interferente do método de determinação da CQO e CBO₅, inibindo a atividade microbiana no caso da CBO₅. Os resultados obtidos para os cloretos e sulfatos do bruto, C7 e C9 estão presentes na figura 4.13.

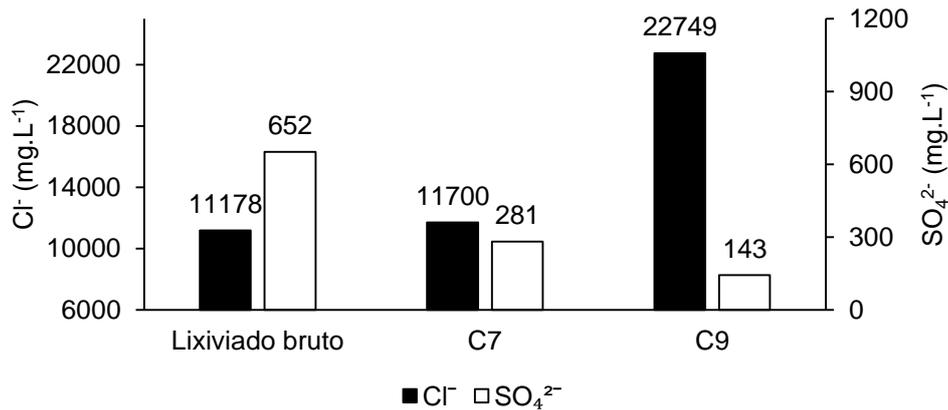


Figura 4.13 - Valores para cloretos e sulfatos nas condições C7, C9 e bruto. Legenda: C7 - 120 g Ca(OH)₂.L⁻¹; C9 - 120 g cinza.L⁻¹.

Verifica-se que o íon cloreto tem uma concentração muito superior aos valores tipicamente encontrados para lixiviados metanogénicos (≈ 2000 mg.L⁻¹), enquanto o íon sulfato está ligeiramente acima da gama normal de concentrações (10-420 mg.L⁻¹) (Kjeldsen et al., 2002; Williams, 2005). A justificação para os valores elevados de cloretos encontrados no lixiviado bruto e condição C7 estão relacionada com o facto do lixiviado ter origem num aterro de resíduos industriais, havendo um variedade de materiais depositados que contêm cloretos (Mor et al., 2006; Panno et al., 2002; Venkatesan and Swaminathan, 2009). Evidentemente que a natureza dos resíduos, a quantidade depositada e outros fatores podem potenciar uma maior concentração entre diferentes aterros. Além disso, os cloretos apresentam alguma dificuldade em precipitar, sendo vulgarmente lixiviados com as águas de escorrência (Kjeldsen et al., 2002), razão pela qual os valores se mantiveram praticamente contantes entre o bruto e C7.

Todavia, observando a figura 4.13 constata-se que houve um incremento bastante significativo na concentração de cloretos para a condição C9. A razão para tal aumento está relacionada com a adição da cinza ao lixiviado. Na composição das cinzas, além da presença maioritária de CaO e SiO₂, existem ainda outros elementos como o K e o Na. Estes metais alcalinos, além de poderem encontrar-se na forma de óxidos, também tem a capacidade de se associarem ao íon cloreto, formando KCl e NaCl (Fedje et al., 2010). Ao entrarem na solução, estes sais dissociam-se acabando por contribuir para o aumento dos cloretos no lixiviado, razão pela qual o valor aumenta na condição C9. Além disso, a presença de elevadas concentrações de cloretos pode justificar o valor máximo encontrado para a condutividade (46,4 mS.cm⁻¹) nesta condição.

A componente azotada de um lixiviado é um dos aspetos mais importantes a ter em conta aquando da sua caracterização. Nas condições estudadas verificou-se uma forte componente amoniacal ($\approx 3300 \text{ mg.L}^{-1}$), o que é típico para aterros metanogénicos (Kjeldsen et al., 2002).

Para a condição C7 obteve-se uma concentração final de NH_4^+ de 2320 mg.L^{-1} , o que corresponde a uma remoção de 31,2%. Porém, uma remoção de 77% foi alcançada para C9, obtendo-se uma concentração de 775 mg.L^{-1} , comprovando a viabilidade da cinza como agente de precipitação de NH_4^+ (figura 4.14). A presença na cinza de óxidos como CaO , MgO , Fe_2O_3 e fosfatos (PO_4^{3-}) conduz a uma maior precipitação das moléculas de NH_4^+ . Efeito semelhante tem sido estudado, não com cinzas mas com agentes precipitantes que apresentam elementos comuns, como é o caso do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e a estruvite ($\text{Mg-NH}_3\text{-PO}_4$) (Li et al., 1999; Renou et al., 2008b; Zhang et al., 2009).

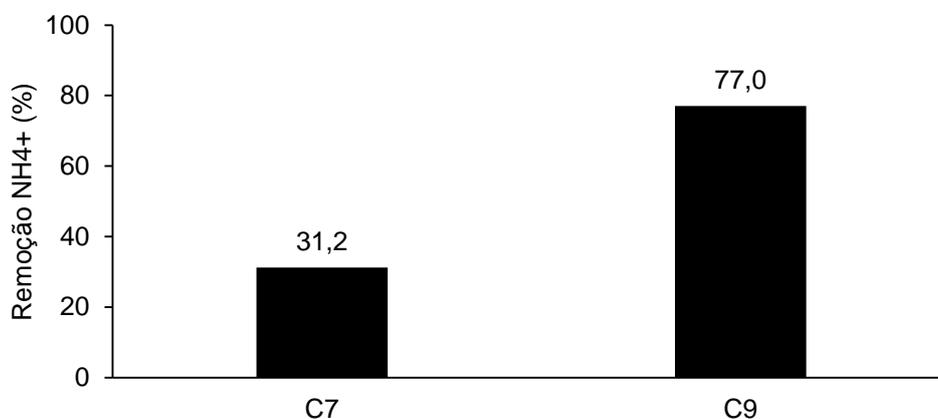


Figura 4.14 - Percentagem de remoção de azoto amoniacal para as condições C7 e C9. Legenda: C7 - $120 \text{ g Ca(OH)}_2\text{.L}^{-1}$; C9 - $120 \text{ g cinza.L}^{-1}$.

É importante referir que parte do NH_4^+ é eliminada por volatilização durante o pré-tratamento, favorecida pelo borbulhamento contínuo e pelas condições alcalinas que conduzem a uma conversão parcial do NH_4^+ (aq.) em NH_3 (g). No entanto, a fração volátil não foi alvo de monitorização no presente estudo, pelo que podemos apenas indicar que a remoção de N é o resultado de processos de volatilização e de precipitação química.

Por outro lado, a partir da tabela 4.3, é possível observar baixas concentrações de nitratos (NO_3^-), não tendo sido possível identificar a presença nitritos (NO_2^-), visto estes estarem em concentrações abaixo do nível de deteção do método cromatográfico. As baixas concentrações de nitratos e nitritos estão de acordo com os valores encontrados na bibliografia para aterros metanogénicos (Kjeldsen et al., 2002; Williams, 2005).

A remoção de azoto amoniacal nesta fase de pré-tratamento torna-se importante no sentido que grandes concentrações ($>1000 \text{ mg.L}^{-1}$) tendem a inibir o tratamento biológico (Ferraz et al., 2013; Li et al., 1999).

Importa também referir que é a primeira vez que a condição C8 apresentou uma redução superior num dos parâmetros testados, relativamente à condição C7 (tabela 4.3). Verifica-se assim que um aumento do tempo de contacto de 24 h para 48 h poderá potenciar a diminuição da concentração de azoto amoniacal.

Outro parâmetro analisado foi o fósforo total, verificando-se que a adição de cinza (C9) aumentou a concentração de fósforo total presente no efluente pré-tratado em 74,8% (figura 4.15). Este resultado era esperado visto que uma das características da cinza de biomassa é a presença de fósforo na sua composição na forma de PO_4^{3-} (Lind and Nordh, 2004; Nunes et al., 2016). Isto é bastante relevante e acaba por ser vantajoso para a etapa de bioremediação, visto haver uma maior disponibilidade deste nutriente para as microalgas.

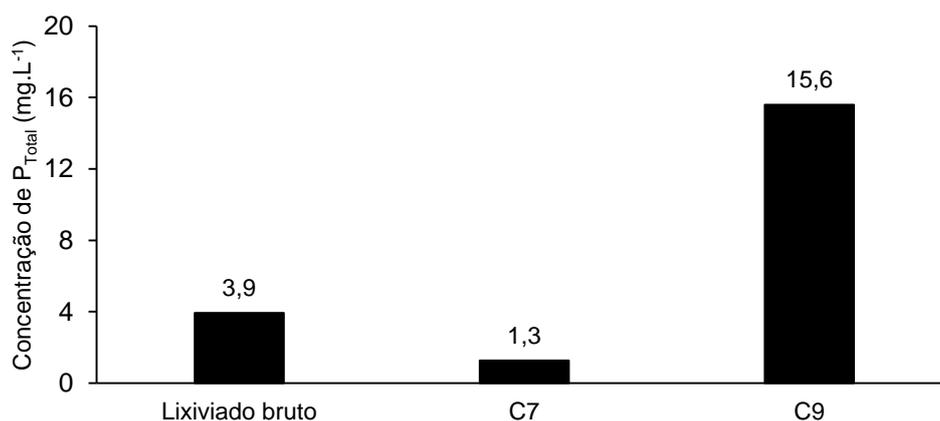


Figura 4.15 - Valores para o fósforo total nas condições C7, C9 e bruto. Legenda: C7 - $120 \text{ g Ca(OH)}_2.\text{L}^{-1}$; C9 - $120 \text{ g cinza.L}^{-1}$.

Por fim, foi analisada a presença de metais no efluente bruto e nas condições de pré-tratamento C7 e C9.

Como se pode observar na figura 4.16, estão presentes os elementos alumínio (Al), cálcio (Ca), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg) e sódio (Na) usualmente detetados nos lixiviados, em concentrações relativamente superiores a outros elementos. No lixiviado em estudo os componentes que mais se destacam são o K (1403 mg.L^{-1}) e o Na (725 mg.L^{-1}), estando dentro da gama de concentrações típicas encontradas noutros lixiviados. Por outro lado, os elementos como o Al ($6,4 \text{ mg.L}^{-1}$), o Ca (29 mg.L^{-1}), o Fe ($7,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e Mg ($41,9 \text{ mg.L}^{-1}$) encontram-se em menor quantidade, estando também de acordo com a bibliografia (Kjeldsen et al., 2002; Williams, 2005).

Durante o pré-tratamento, comparando as condições C7 e C9 e o lixiviado bruto verifica-se que as concentrações de K e Na mantiveram praticamente constantes. No caso do Ca, este manteve-se aproximadamente constante entre o bruto e a condição C7 onde se utilizou Ca(OH)_2 , o que se poderá assumir que este último precipitou praticamente todo na forma de carbonato de cálcio (CaCO_3) (Renou et al., 2008b).

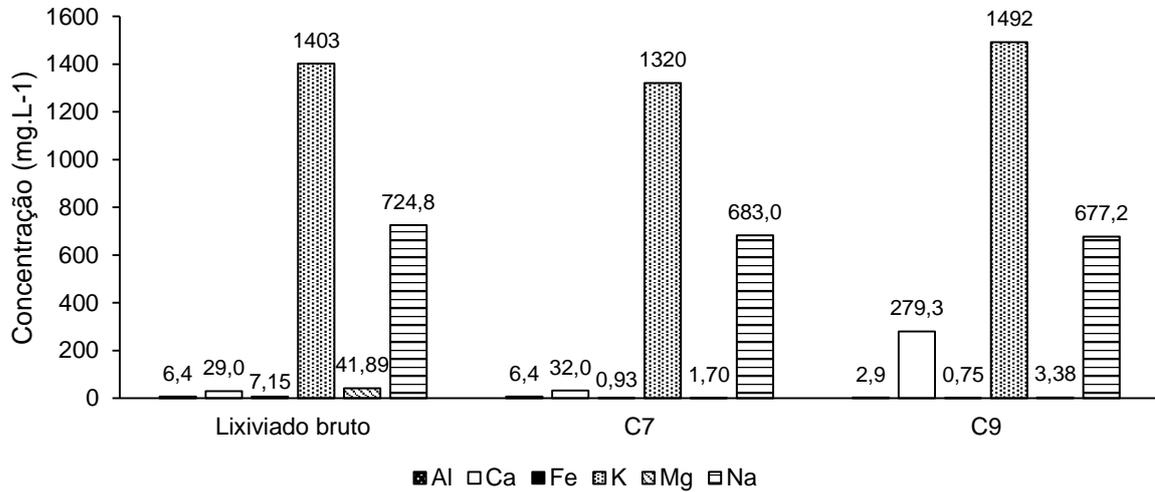


Figura 4.16 - Valores para o Al, Ca, Fe, K, Mg e Na nas condições C7 e C9 e bruto. Legenda: (C7 - 120 g Ca(OH)_2 .L⁻¹ ; C9 - 120 g cinza.L⁻¹).

Porém, na condição C9, onde se utilizou cinzas de biomassa, como estas apresentam percentagens elevadas de CaO é expectável que este elemento acabe por se dissolver no lixiviado. Este aumento da concentração de Ca (8,6%) tem efeito sobre a condutividade que aumentou consideravelmente nesta condição (tabela 4.3). No caso do Al, Fe e Mg estes elementos apresentaram uma redução ao longo do pré-tratamento.

Na figura 4.17 estão representados outros elementos metálicos, incluindo alguns metais pesados (As, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn), detetados no lixiviado bruto e nas condições C7 e C9. Tipicamente estes metais são detetados com concentrações bastante baixas em lixiviados metanogénicos, na medida em que o aumento do pH do efluente reduz a solubilidade destes iões acabando a maioria por precipitar (Williams, 2005).

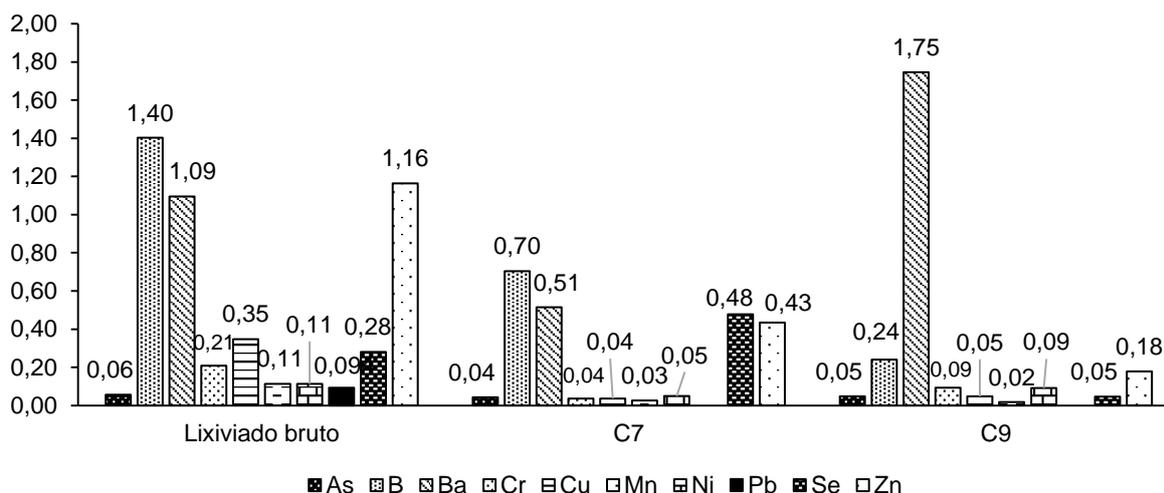


Figura 4.17 - Valores para os metais pesados nas condições C7, C9 e bruto. Legenda: (C7 - 120 g $\text{Ca(OH)}_2 \cdot \text{L}^{-1}$; C9 - 120 g cinza $\cdot \text{L}^{-1}$).

Pela análise da figura 4.17 é possível destacar no lixiviado bruto os elementos como o boro (B), bário (Ba) e zinco (Zn) com concentrações acima de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, sendo que o B e o Ba diminuem as suas concentrações na condição C7, enquanto na condição C9 (cinza) o Ba aumentou, possivelmente como resultado da sua presença na cinza, acabando por se dissolver no lixiviado.

Os outros elementos apresentavam-se em concentrações abaixo dos $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, tendo a maioria diminuído a sua concentração. É o caso do Cu, Mn e As cujas taxas de remoção para C7 foram de 88,6%, 72,7% e 54,5%, e para C9 foram de 85,7%, 81,8% e 18,2%. Estes resultados estão de acordo com os estudos feitos que provam o potencial dos processos físico-químicos (de precipitação química) apresentarem remoções satisfatórias para metais pesados (Abbas et al., 2009; Gao et al., 2015). Foi ainda observada a presença de chumbo (Pb) mas apenas no lixiviado bruto, não tendo sido detetado qualquer concentração de cádmio (Cd) e mercúrio (Hg).

Nesta segunda fase da etapa de pré-tratamento do lixiviado, foi possível concluir que as cinzas de biomassa têm a capacidade de atuar como agentes de precipitação química. A remoção da cor e dos SST foi alcançada com resultados bastante promissores. Também foi possível remover uma grande parte do azoto amoniacal, bem como reduzir a concentração de metais pesados presentes. Assim, a cinza pode ser uma alternativa eficiente, sustentável e económica ao hidróxido de cálcio no pré-tratamento de um lixiviado. Todavia, os poucos estudos que existem sobre a utilização de cinzas como forma de remediar lixiviados continua a ser escasso, havendo assim a necessidade de prosseguir a investigação.

4.3 Bioremediação do lixiviado pré-tratado

Com o intuito de facilitar a interpretação dos resultados obtidos, a etapa de bioremediação será dividida em duas fases.

Na primeira serão discutidos os resultados relativos ao crescimento das microalgas ao longo do tempo de ensaio, estando esta secção relacionada com a produção da biomassa algal. Por sua vez, na segunda fase, serão discutidos os resultados da caracterização do efluente tratado, isto é, dos vários parâmetros analisados.

4.3.1 Crescimento de microalgas e produção de biomassa

O crescimento de microalgas no lixiviado de aterro estudado constituiu um desafio, tendo em consideração as características físico-químicas do mesmo. Após o pré-tratamento por precipitação química que permitiu remover não só cor escura mas também a concentração dos compostos orgânicos recalcitrantes e de metais pesados, o crescimento das microalgas continua a não ser uma operação linear, devido a possíveis carências de nutrientes ou presença de compostos tóxicos.

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi inoculada em reatores numa concentração de 5% (v/v), contendo as várias condições testadas (tabela 4.4). O crescimento foi acompanhado através da medição da densidade ótica a 540 nm até a estabilização da cultura, sendo que as curvas de crescimento estão descritas na figura 4.18. À exceção das figuras 4.18e e 4.18f é possível observar quatro fases diferentes no crescimento: lag (adaptação), exponencial (crescimento), estabilização (manutenção) e morte (lise celular) (Moazami et al., 2012). Em alguns casos não foi possível associar a variação da densidade ótica ao crescimento das microalgas (ensaios R5 e R6, com adição de efluente de vacaria), pois o lixiviado apresentou uma densidade ótica a 540 nm máxima no início do ensaio.

É importante referir que o presente estudo não tinha o objetivo de otimizar a produção de biomassa, mas sim entender se seria possível crescer uma cultura de microalgas no lixiviado em estudo, e dessa forma contribuir para a remediação desse lixiviado, em particular a sua componente inorgânica e finalmente avaliar o potencial de valorização energética da biomassa obtida. Assim, o fim dos ensaios nunca irá coincidir com o pico máximo de produção algal, visto que muitas vezes este ponto não corresponde ao nível de remediação aceitável do efluente.

De salientar que nas condições R1 e R3, correspondentes aos reatores com lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 e cinza, a duração do ensaio foi superior às restantes condições (figura 4.18). Isto deve-se ao facto de estas condições corresponderem a efluentes não diluídos, o que implica que as microalgas necessitem de um período de adaptação maior do que nas condições R2 e R4 nas quais se realizou uma diluição 1:2 dos lixiviados pré-tratados.

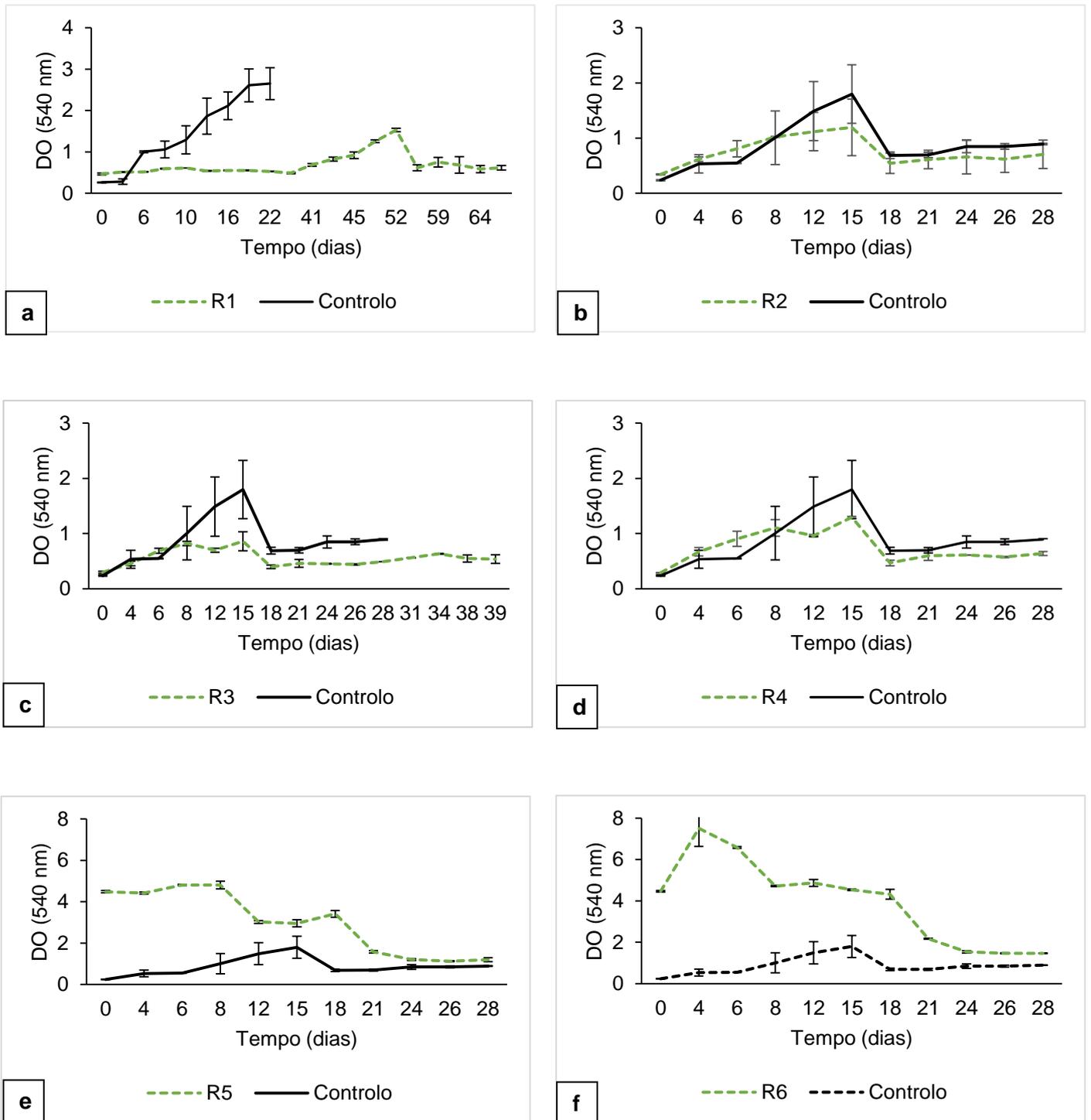


Figura 4.18 - Curvas de variação da densidade ótica a 540 nm para as várias condições de bioremediação. a) Lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$; b) Lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diluído 1:2; c) Lixiviado pré-tratado com cinza; d) Lixiviado pré-tratado com cinza diluído 1:2; e) Lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diluído em efluente de vacaria 1:2; f) Lixiviado pré-tratado com cinza diluído em efluente de vacaria 1:2

Por outro lado, verifica-se que entre as condições onde se utilizou lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 (R1 e R2) e com cinza (R3 e R4), o crescimento em média foi ligeiramente superior nas condições com cinza. Coloca-se assim a hipótese de que as cinzas de algum modo (e.g. fornecimento de nutrientes, remoção de algum contaminante durante a precipitação) potenciam um melhor crescimento da *S. obliquus* no lixiviado.

Nas condições R5 e R6 a diminuição da densidade ótica ao longo do tempo corresponde à remoção de nutrientes e material em suspensão do lixiviado, quer por consumo pela população de microalgas, que por coagulação e precipitação resultando numa aproximação entre a densidade ótica do lixiviado e do meio de controlo no final do período de 28 dias.

Na tabela 4.4 estão presentes os valores para a produtividade média ao longo dos ensaios. Se verificarmos, as condições R3 e R4 apresentaram produtividades médias ligeiramente superiores ($0,019$ e $0,027 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) às condições R1 e R2 ($0,009$ e $0,012 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), o que pode indicar que a presença de compostos tóxicos pode exercer uma influência negativa no crescimento das microalgas. Todavia, por observação do efluente nos reatores, verificou-se uma mudança de cor verde para amarelo-esverdeado nas condições R3 e R4 durante a fase final dos ensaios. Esta mudança na cor é muitas vezes indicadora da mortalidade da cultura, tendo afetado a capacidade de remediação do efluente, assunto que será discutido mais à frente.

Nas condições R5 e R6, onde foi adicionado efluente de vacaria, não é possível observar a fase de lag bem como as restantes fases do crescimento devido à presença de um elevado teor de sólidos em suspensão. O ensaio R6 apresentou a maior produtividade média o que pode ser uma consequência da conjugação da menor toxicidade do Ca(OH)_2 relativamente às cinzas e da maior disponibilidade de nutrientes provenientes do efluente de vacarias.

Tabela 4.4 - Concentrações de biomassa no final dos ensaios e produtividades médias para cada condição testada.

| Condição | Duração do ensaio (dias) | Concentração de biomassa (g.L^{-1}) ¹ | Produtividade média ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) |
|----------|--------------------------|---|---|
| R1 | 66 | 0,57 ($\pm 0,06$) | 0,009 |
| R2 | 28 | 0,33 ($\pm 0,02$) | 0,012 |
| R3 | 39 | 0,76 ($\pm 0,14$) | 0,019 |
| R4 | 28 | 0,42 ($\pm 0,06$) | 0,027 |
| R5 | 28 | 0,75 ($\pm 0,06$) | 0,015 |
| R6 | 28 | 1,75 ($\pm 0,25$) | 0,062 |
| R7 | 28 | 0,51 ($\pm 0,07$) | 0,018 |

¹concentração de biomassa obtida a partir dos “pesos secos” efetuados no final dos ensaios.

A disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultura influencia fortemente o crescimento e desenvolvimento da cultura de microalgas. Apesar da quantidade de azoto amoniacal presente se encontrar em concentrações aceitáveis para a nutrição das microalgas (Fenton and hUallacháin, 2012), as concentrações de fósforo são muito baixas, particularmente nas condições R1 e R2. Isto pode ser comprovado pelas razões N:P em que no caso de R1 e R2 estão próximas de 1800, enquanto em R3 e R4 são na ordem dos 51, esta última menor em resultado da adição de cinza. Este facto pode servir de justificação para os maiores crescimentos encontrados nos reatores com lixiviado pré-tratado com cinza. Num estudo efetuado por Sandoval e colaboradores (2015) que testou a hipótese de cinzas de biomassa serem uma fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas. Os resultados mostraram que as cinzas foram capazes de fornecer as condições nutricionais necessárias. Porém, os mesmos autores alertam para o facto de as cinzas poderem contribuir para introdução de certos metais que possam eventualmente causar inibições nas algas (Sandoval et al., 2015).

Após terminar os ensaios, o efluente foi centrifugado de forma a separar este da biomassa. Por sua vez, a biomassa foi seca, triturada e misturada para depois ser utilizada na fase de hidrólise. Uma vez que a quantidade obtida de biomassa algal era reduzida, foi feito ainda mais um ensaio utilizando a condição R4, mas desta vez apenas para a produção de mais biomassa. No final a biomassa obtida foi misturada com a anterior e prosseguiu-se para a hidrólise ácida.

Na figura 4.19 estão ilustrados alguns exemplos de reatores e a sua evolução ao longo dos ensaios.

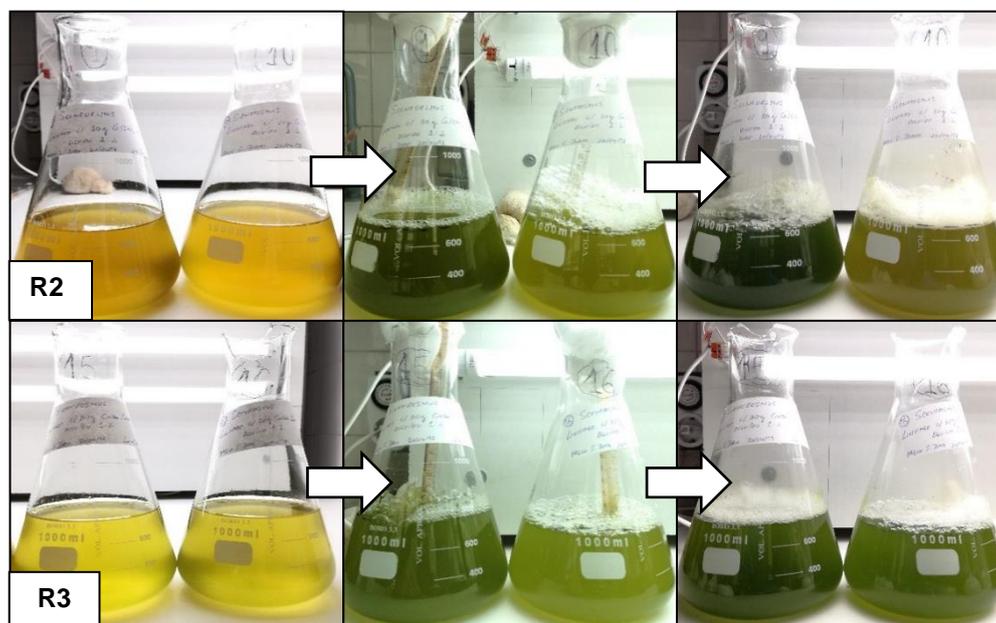


Figura 4.19 - Evolução das condições R2 (lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diluído 1:2) e R3 (lixiviado pré-tratado com cinza).

Tal como mencionado na metodologia, durante os ensaios de bioremediação foram recolhidas amostras do efluente com o objetivo de acompanhar a remoção da CQO. As figuras 4.20 e 4.21 mostram essa remoção ao longo do tempo para as várias condições. Por motivos práticos foi separada a condição R1 das restantes, visto ter uma duração de ensaio superior.

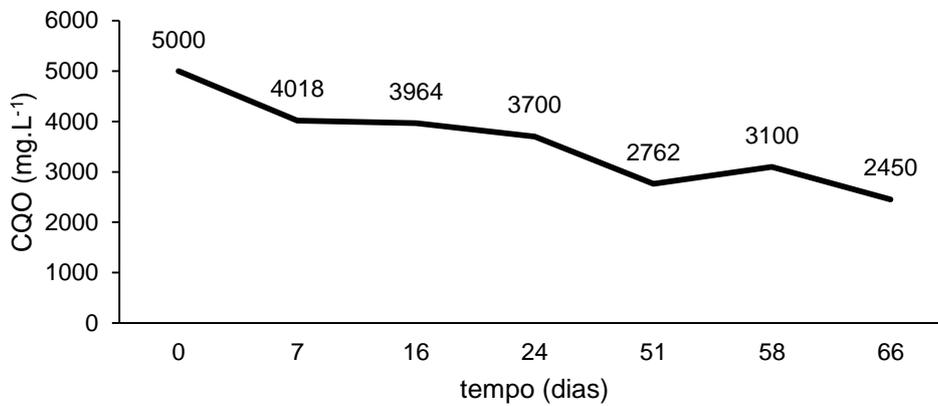


Figura 4.20 - Evolução da remoção da CQO ao longo do ensaio para a condição R1 (lixiviado pré-tratado com Ca(OH)₂).

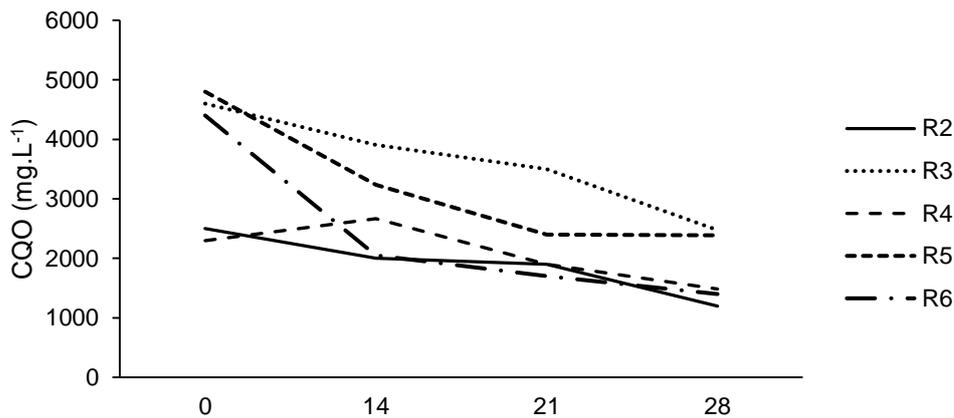


Figura 4.21 - Evolução da remoção da CQO ao longo do ensaio para as restantes condições. **Legenda:** R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Esta monitorização permitiu comprovar que o crescimento das microalgas é acompanhado de uma redução da carga orgânica e inorgânica associada ao parâmetro CQO.

4.3.2 Caracterização do efluente final bioremediado

A etapa de bioremediação teve como objetivo a remoção sobretudo da componente biodegradável presente no efluente pré-tratado. Além disso, pretendeu-se minimizar alguns dos efeitos secundários associados à precipitação química, nomeadamente, a subida na condutividade e nos sólidos totais.

Tal como descrito na metodologia foram testadas diferentes condições de bioremediação, tendo sido caracterizado o efluente antes de ser inoculado com as microalgas (tabela 4.5) e após o tratamento biológico (tabela 4.6).

Apesar da etapa de pré-tratamento ter permitido uma remoção muito significativa da cor do lixiviado, associada aos compostos húmicos e sólidos em suspensão, bem como a redução de outros parâmetros (e.g. CQO, azoto amoniacal e metais pesados), houve subidas algo importantes noutros. É o caso da condutividade, cloretos e ST, sendo que os dois primeiros parâmetros são frequentemente monitorizados em aterros e estações de tratamento devido à perigosidade que representam para os meios recetores naturais (Kjeldsen, et al. 2002). A introdução de uma etapa biológica seguida de tratamentos físico-químico encontra-se bem documentada, todavia estudos sobre a bioremediação de lixiviados pré-tratados com microalgas ainda é algo pouco investigado. Além disso, os poucos estudos que existem utilizam diluições muito elevadas do lixiviado, o que pode ser questionável do ponto de vista prático.

Com base nos valores das tabelas 4.5 e 4.6, relativamente à densidade ótica a 600 nm, verificou-se uma diminuição nas condições R1 e R2 de 0,147 e 0,074 para 0,081 e 0,051, respetivamente. Por outro lado, em R3 e R4, onde se utilizou o lixiviado pré-tratado com cinza, a DO aumentou de 0,028 e 0,014 para 0,073 e 0,034, respetivamente. Este incremento é desprezável, sendo causado por vários fatores, particularmente, a presença de material algal em suspensão que não foi possível de extrair na etapa de centrifugação. Além disso, a grande maioria dos compostos que atribuem cor ao lixiviado já tinham sido removidos por precipitação na etapa de pré-tratamento, sendo expectável que não houvesse remoções significativas. A mesma interpretação é feita nos resultados obtidos para a DO a 540 nm.

A figura 4.22 mostra os efluentes finais das várias condições, sendo que se compararmos com lixiviado bruto é notável a diferença.

Tabela 4.5 - Caracterização das condições testadas antes da bioremediação do lixiviado pré-tratado.

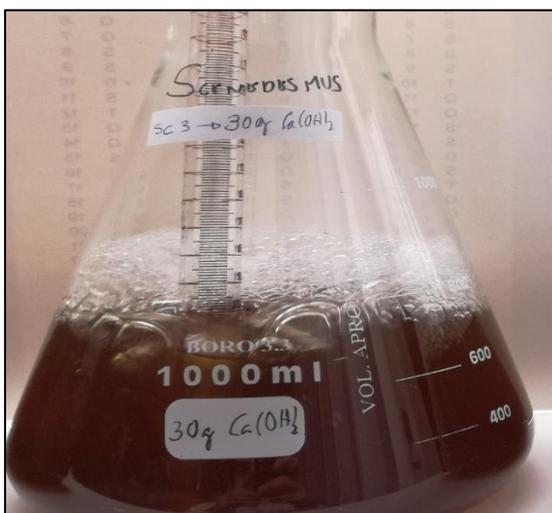
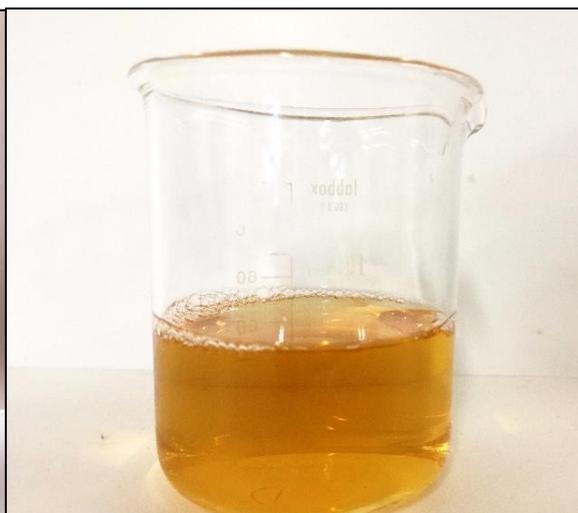
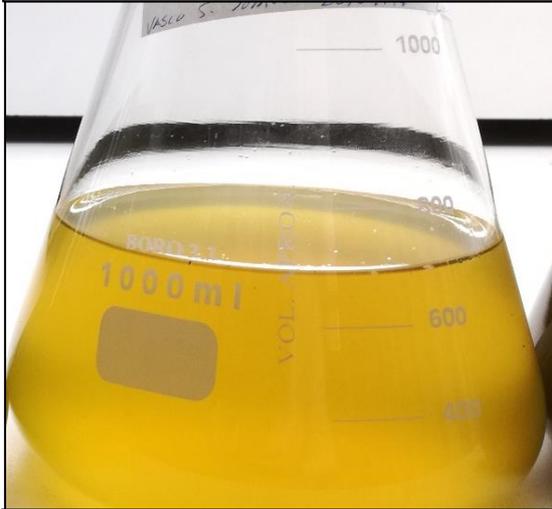
| Condição | DO (nm) | | pH | Condutividade (mS.cm ⁻¹) | Sólidos (mg.L ⁻¹) | | | | CQO (mg.L ⁻¹) | CBO ₅ (mg.L ⁻¹) | N _{Total} (mg.L ⁻¹) | P _{Total} (mg.L ⁻¹) | NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) | NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹) | SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹) | Cl ⁻ (mg.L ⁻¹) |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------|---------------|---|-------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------------------|---|---|---|---|---|--|---------------------------------------|
| | DO ₆₀₀ | DO ₅₄₀ | | | ST | SV | SF | SST | | | | | | | | |
| | Lixiviado bruto | 2,640 (±0,1) | | | 3,630 (±0,1) | 8,1 (±0,3) | 41,6 (±0,9) | 31953 (±85) | | | | | | | | |
| Efluente vacaria | 2,262 (±0) | 2,478 (±0) | 7,5 (±0,1) | 2,2 (±0,2) | 4703 (±302) | 3213 (±50) | 1660 (±57) | 2787 (±276) | 5600 (±566) | 3450 (±71) | 806 (±0) | 7,4 | 786 | 20 | 118 | 210 |
| R1 | 0,147 (±0) | 0,248 (±0) | 7,6 (±0,2) | 42,5 (±0) | 27663 (±131) | 2295 (±49) | 26133 (±1446) | 1557 (±55) | 5000 (±231) | 600 (±0) | 2339 (±49) | 1,3 | 2320 | 19 | 281 | 11700 |
| R2 | 0,074 (±0) | 0,124 (±0) | 7,3 (±0,3) | 21,3 (±0) | 13832 (±66) | 1148 (±25) | 13067 (±723) | 778 (±28) | 2500 (±116) | 300 (±0) | 1170 (±25) | 0,6 | 1160 | 10 | 141 | 5850 |
| R3 | 0,028 (±0,1) | 0,041 (±0,1) | 7,1 (±0,1) | 46,4 (±1,7) | 37927 (±97) | 3880 (±70) | 34047 (±101) | 5150 (±477) | 4600 (±283) | 400 (±0) | 775 (±44) | 15,6 | 775 | n/a | 143 | 22749 |
| R4 | 0,014 (±0,1) | 0,021 (±0,1) | 7,3 (±0,5) | 23,2 (±0,9) | 18963 (±49) | 1940 (±35) | 17024 (±51) | 2575 (±239) | 2300 (±142) | 200 (±0) | 388 (±22) | 7,8 | 388 | n/a | 72 | 11375 |
| R5 | 1,301 (±0) | 1,451 (±0) | 7,1 (±0,1) | 22,7 (±0,4) | 18237 (±847) | 5990 (±79) | 12247 (±805) | 2917 (±231) | 4800 (±0) | 2250 (±71) | 775 (±44) | 3,5 | 758 | 17 | 310 | 13340 |
| R6 | 1,566 (±0) | 1,736 (±0) | 7,1 (±0,2) | 24,1 (±0,6) | 22115 (±2256) | 6815 (±346) | 15300 (±1909) | 3083 (±257) | 4400 (±0) | 1800 (±141) | 352 (±17) | 3,1 | 352 | n/a | 126 | 22140 |

Legenda: **R1** – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; **R2** - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); **R3** - Lixiviado pré-tratado cinza; **R4** - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); **R5** - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); **R6** - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Tabela 4.6 - Caracterização das condições testadas após a bioremediação do lixiviado pré-tratado.

| Condição | DO (nm) | | pH | Condutividade (mS.cm ⁻¹) | Sólidos (mg.L ⁻¹) | | | | CQO (mg.L ⁻¹) | CBO ₅ (mg.L ⁻¹) | N _{Total} (mg.L ⁻¹) | P _{Total} (mg.L ⁻¹) | NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹) | NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹) | SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹) | Cl ⁻ (mg.L ⁻¹) |
|-------------------------|------------------------|-------------------|------------|---|-------------------------------|-----------------|------------------|----------------|------------------------------|---|---|---|---|---|--|---------------------------------------|
| | DO ₆₀₀ | DO ₅₄₀ | | | ST | SV | SF | SST | | | | | | | | |
| | Lixiviado bruto | 2,640 (±0,1) | | | 3,630 (±0,1) | 8,1 (±0,3) | 41,6 (±0,9) | 31953 (±85) | | | | | | | | |
| Efluente vacaria | 2,262 (±0) | 2,478 (±0) | 7,5 (±0,1) | 2,2 (±0,2) | 4703 (±302) | 3213 (±50) | 1660 (±57) | 2787 (±276) | 5600 (±566) | 3450 (±71) | 806 (±0) | 7,4 | 786 | 20 | 118 | 210 |
| R1 | 0,081 (±0) | 0,126 (±0) | 6,1 (±0,1) | 21,9 (±0,8) | 21873 (±1402) | 3785 (±654) | 19975 (±2715) | 610 (±74) | 2450 (±342) | 225 (±50) | 1383 (±68) | 0,8 (±0,4) | 1383 (±68) | n/a | 10180 (±428) | 6058 (±306) |
| R2 | 0,051 (±0) | 0,073 (±0) | 6,0 (±0,1) | 15,7 (±0,5) | 14252 (±1051) | 1790 (±181) | 12462 (±924) | 473 (±60) | 1197 (±327) | 113 (±25) | 267 (±12) | 0,6 (±0,3) | 267 (±12) | n/a | 4532 (±96) | 4290 (±67) |
| R3 | 0,073 (±0) | 0,103 (±0) | 6,1 (±0,2) | 31,3 (±4,2) | 31167 (±4369) | 5330 (±1574) | 26725 (±2644) | 987 (±58) | 2475 (±198) | 150 (±122) | 1135 (±79) | 0,4 (±0) | 1135 (±79) | n/a | 5509 (±823) | 15673 (±1651) |
| R4 | 0,034 (±0) | 0,048 (±0) | 6,3 (±0,1) | 19,7 (±0,4) | 16148 (±464) | 2883 (±177) | 13265 (±392) | 570 (±203) | 1485 (±198) | 38 (±25) | 540 (±24) | 1,3 (±0,4) | 540 (±24) | n/a | 3120 (±125) | 7902 (±100) |
| R5 | 0,138 (±0) | 0,206 (±0) | 6,2 (±0,4) | 16,6 (±0,4) | 14872 (±577) | 2945 (±206) | 12398 (±893) | 558 (±110) | 2387 (±315) | 200 (±41) | 521 (±57) | 7,9 (±4,8) | 521 (±57) | n/a | 5886 (±321) | 4052 (±167) |
| R6 | 0,063 (±0) | 0,095 (±0) | 7,2 (±0,2) | 19,0 (±1,3) | 14755 (±658) | 1400 (±222) | 13355 (±759) | 655 (±80) | 1400 (±231) | 38 (±25) | 242 (±24) | 0,9 (±0,4) | 242 (±24) | n/a | 2187 (±163) | 7853 (±604) |
| R7 | 0,024 (±0) | 0,027 (±0) | 7,2 (±0,1) | 0,8 (±0,5) | 712 (±283) | n/a | 712 (±283) | 125 (±5) | 200 (±231) | 0 (±0) | 0 (±0) | 3,8 (±1,8) | 0 (±0) | n/a | 310 (±301) | 34 (±5) |

Legenda: **R1** – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; **R2** - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); **R3** - Lixiviado pré-tratado cinza; **R4** - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); **R5** - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); **R6** - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2); **R7** - Controlo.

| | |
|---|--|
|  |  |
| <p>R1 – Lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2</p> | <p>R1 – Lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2</p> |
|  |  |
| <p>R2 – Lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 1:2</p> | <p>R2 – Lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 1:2</p> |
|  |  |
| <p>R3 – Lixiviado pré-tratado com cinza</p> | <p>R3 – Lixiviado pré-tratado com cinza</p> |

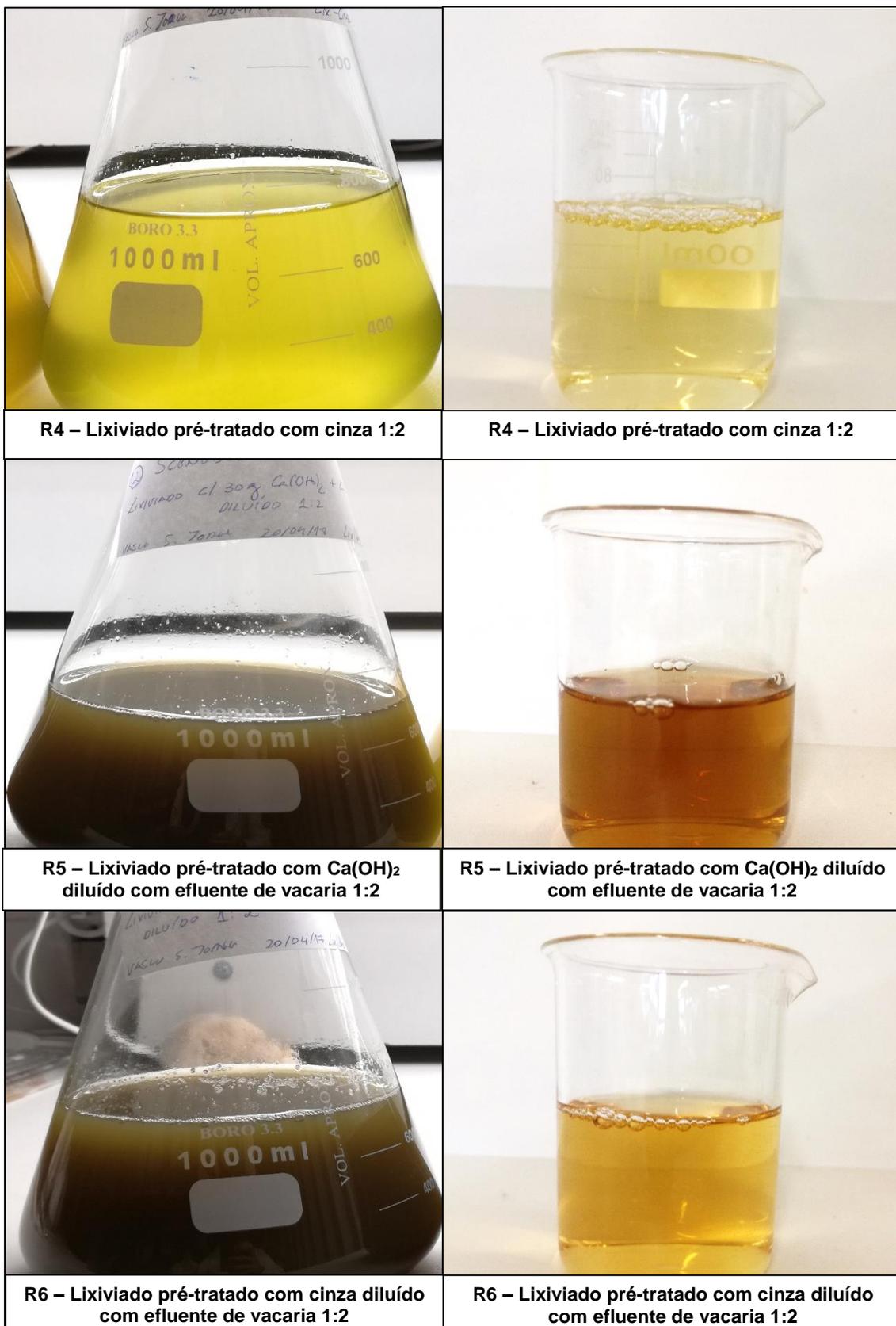


Figura 4.22 - Comparação entre efluentes antes (esquerda) e após (direita) bioremediação.

Tal como discutido, os valores de pH foram ajustados ao longo dos ensaios de bioremediação com o objetivo de manter o meio de cultura próximo da neutralidade. No entanto, se não tivesse havido controlo do pH seria expectável a obtenção de valores no efluente final na ordem dos 8 a 10, tal como observado noutros estudos com *S. obliquus* (Marchin et al., 2015; Thiansathit et al., 2015).

No que respeita à condutividade, esta diminuiu em todas as condições testadas relativamente ao pré-tratamento, tendo R1 e R2 apresentado remoções de 48,6% e 26%, respetivamente. As condições R3 e R4 referentes ao lixiviado pré-tratado com cinza apresentaram reduções também significativas. De facto R3, correspondente à condição C9 do pré-tratamento tinha apresentado o valor mais elevado, 46,4 mS.cm⁻¹, em resultado da adição da cinza. Após a bioremediação, a mesma condição apresentou um valor final de 31,3 mS.cm⁻¹, o que equivale a 32,9% de remoção por parte das microalgas (figura 4.23). Todavia, de entre todas as condições, R3 continua a ser a que exhibe maior condutividade, sendo que um dos fatores que contribui para isto é a elevada concentração de iões Cl⁻ no meio (15673 mg.L⁻¹) (Uduman et al., 2011).

No caso de R5 e R6 apresentaram remoções de 26,9% e 21,1% respetivamente, sendo que o lixiviado terá certamente contribuído mais para este parâmetro.

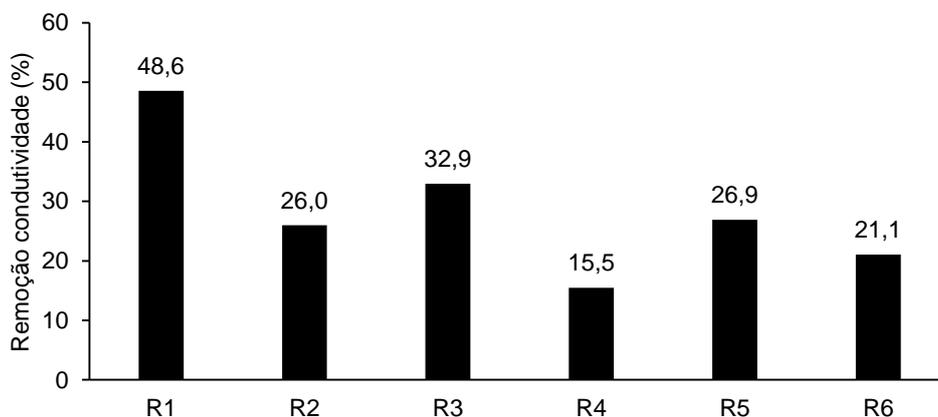


Figura 4.23 - Percentagens de remoção para a condutividade nas diferentes condições de bioremediação relativamente ao pré-tratamento. **Legenda:** R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Quanto ao teor de ST, de um modo geral, continua a ser consideravelmente elevado apesar de ter reduzido com o tratamento biológico. Tal como verificado, o pré-tratamento com Ca(OH)₂ mostrou ser capaz de reduzir um pouco a concentração de ST ao contrário das cinzas, cuja solubilização compensa a remoção de componentes orgânicos ou inorgânicos precipitados. Após

a bioremediação, o teor de ST continua a ser elevado para as condições R1 e R2 fixando-se nos 21873 mg.L⁻¹ e 14252 mg.L⁻¹, com esta última condição a registar um aumento de 3%.

Para as condições R3 e R4, não obstante o facto de as taxas de remoção não serem satisfatórias (17,8% e 14,8%), foi possível alcançar valores abaixo do efluente bruto. Este resultado acaba por ser positivo, visto que a adição de cinza no pré-tratamento tinha originado uma subida significativa neste parâmetro.

No caso de R5 e R6 onde se efetuou a diluição do lixiviado pré-tratado (Ca(OH)₂ e cinza) com efluente de vacaria, estas apresentaram uma menor quantidade de ST antes da bioremediação, sendo que grande parte dos sólidos advém do lixiviado. No final do tratamento com as algas, as condições R5 e R6 exibiram taxas de remoção de 18,5% e 33,3%, respetivamente. Além disso, as mesmas condições registam os valores mais elevados de SVT entre todas as condições. Isto deve-se à composição do efluente de vacaria, na qual mais de 60% do teor de ST encontra-se sob a forma de sólidos voláteis totais (SVT), o que está de acordo com o encontrado por outros autores (Gómez et al., 2011; Wang et al., 2011).

Entre todos os sólidos analisados, a concentração de SST foi a que apresentou resultados mais positivos tendo-se observado uma diminuição em todas as condições testadas (tabela 4.6). As condições R1 e R2 apresentaram as remoções mais baixas de 60,8% e 39,3%, enquanto as restantes condições revelaram eficiências de remoção acima dos 75% (figura 4.24). Evidencia-se assim a capacidade das microalgas para absorverem quantidades significativas de matéria orgânica suspensa no meio.

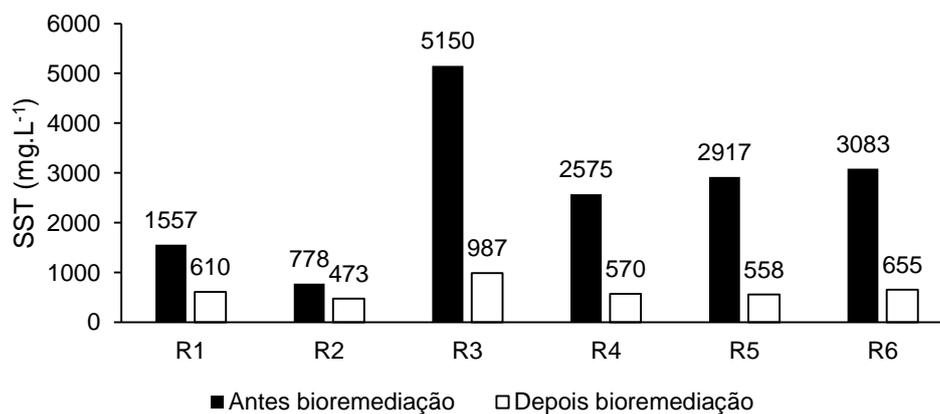


Figura 4.24 - Valores de SST antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Respetivamente aos valores de CQO, a etapa de pré-tratamento já tinha permitido alcançar uma remoção de mais de 50% utilizando tanto Ca(OH)₂ como a cinza. Também se tinha

verificado que grande parte da matéria orgânica estava associada à CQO, situação confirmada pelas baixas razões de CBO_5/CQO ($\leq 0,12$). Isto significava que pouca matéria orgânica biodegradável estaria disponível para as microalgas utilizarem, em metabolismo heterotrófico. De modo, a verificar a capacidade de as microalgas remediarem o lixiviado de aterro, foi adicionado efluente de vacaria às condições R5 e R6. Este efluente é rico em matéria orgânica biodegradável, bem como em azoto e fósforo, constituindo assim um reforço nutricional para o crescimento das microalgas e podendo potenciar a sua eficiência na remediação. Esta hipótese é comprovada na tabela 4.4 onde se mostra a produtividade média alcançada na condição R6 de $0,062 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, a máxima obtida entre todas as condições.

Para as condições R1 e R2, os valores de CQO obtidos foram de 2450 e 1197 mg.L^{-1} , estando associados a taxas de remoção na ordem dos 50% em ambos os casos. Já no caso de R3 e R4 os valores obtidos foram de 2475 e 1485 mg.L^{-1} equivalentes a 46,2% e 35,4% de remoção, respetivamente (figura 4.25)

Cheng e Tian (2013) utilizaram *S. obliquus* para remediar um lixiviado bruto ($CQO \approx 14000 \text{ mg.L}^{-1}$), tendo atingido remoções de 16% para a CQO. Nos ensaios foram aplicadas diluições de 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50 (Cheng and Tian, 2013). Apesar dos resultados obtidos pelos autores não poderem servir de comparação direta com os obtidos pelo presente estudo, permitem comprovar a influência de um pré-tratamento na capacidade de bioremediar um lixiviado com microalgas. Por outro lado, outros estudos sobre a capacidade de *S. obliquus* na remediação de efluentes contaminados, não são diretamente comparáveis com este trabalho pois referem-se a águas residuais urbanas com valores de CQO bastante inferiores aos encontrados no lixiviado em estudo (Ferreira et al., 2017; Gupta et al., 2016; Zhang et al., 2015).

Verifica-se ainda que a remediação foi mais eficiente nas condições com lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 (R1 e R2) do que com cinzas (R3 e R4). Levanta-se assim a hipótese das cinzas de algum modo, constituírem uma fonte de toxicidade, prejudicando a aptidão das microalgas em remediarem o efluente.

No caso das condições R5 e R6 os valores também reduziram, tendo R6 a remoção máxima alcançada de 68,2% entre todas as condições estudadas (figura 4.25).

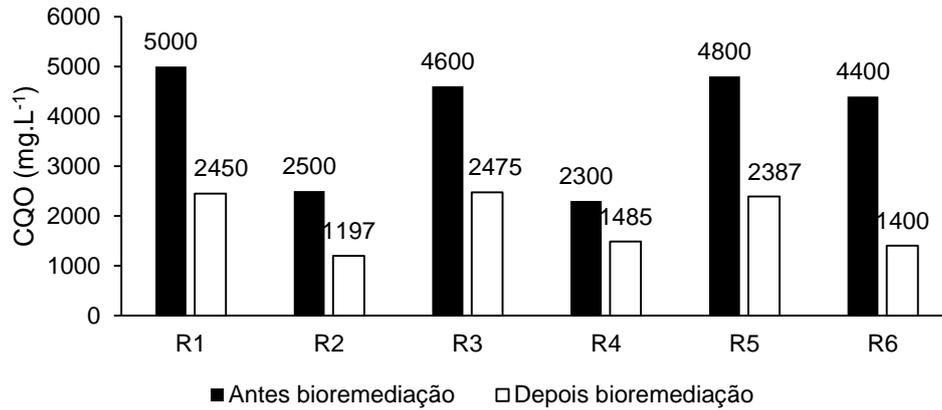


Figura 4.25 - Valores da CQO antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas. **Legenda:** R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Para a CBO₅ os resultados obtidos foram satisfatórios com as condições R1, R2, R3 apresentarem remoções de 62,5% e razões de biodegradabilidade de 0,09, 0,09 e 0,06 e com R4 a alcançar os 81,3% e 0,03. Verifica-se assim que o efluente final encontra-se num elevado estado de biodegradação/estabilização.

Por outro lado, como se pode observar na tabela 4.5 as condições R5 e R6 apresentavam ao início CBO₅ mais elevados (2250 e 1800 mg.L⁻¹) devido à diluição com o efluente de vacaria, o que se reflete numa razão CBO₅/CQO de 0,47 e 0,41. Isto permitiu um melhor crescimento e adaptação das microalgas ao lixiviado, bem como potenciou a remediação. A figura 4.26 mostra bem estas variações na CBO₅.

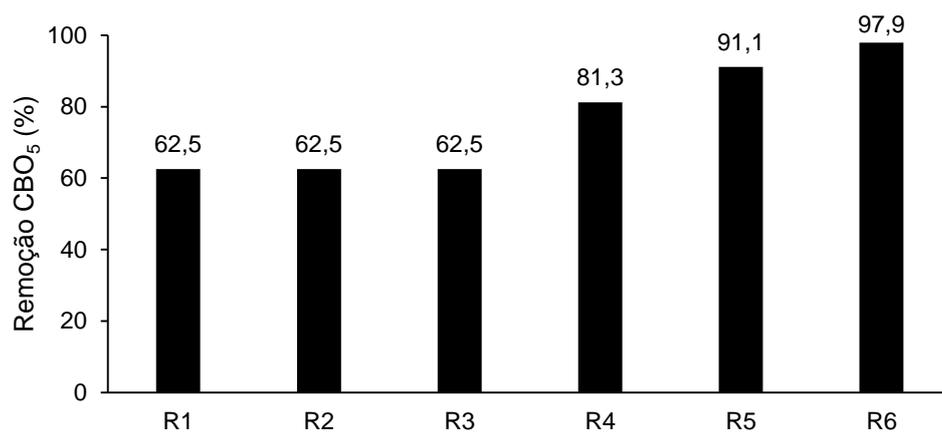


Figura 4.26 - Percentagem de remoção para a CBO₅ nas diferentes condições de bioremediação relativamente ao pré-tratamento. **Legenda:** R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

No que respeita às concentrações de cloretos antes e depois da remediação, todas as condições apresentaram remoções acima de 25% (figura 4.27). Na condição R3 onde se tinha verificado um incremento de Cl^- em resultado da adição da cinza, foi possível obter após a bioremediação remoções de 31,1%. As condições nas quais houve uma maior diminuição de Cl^- correspondem a R5 e R6 com remoções de 69,6% e 64,5%, respetivamente. A remoção deste ião poderá estar relacionada com o facto do mesmo ser um dos micronutrientes necessários no crescimento das algas (Mutanda et al., 2011). Poderá também ocorrer a co-precipitação de Cl^- com componentes do efluente de vacaria uma vez que a presença deste efluente é a característica distintiva destes ensaios.

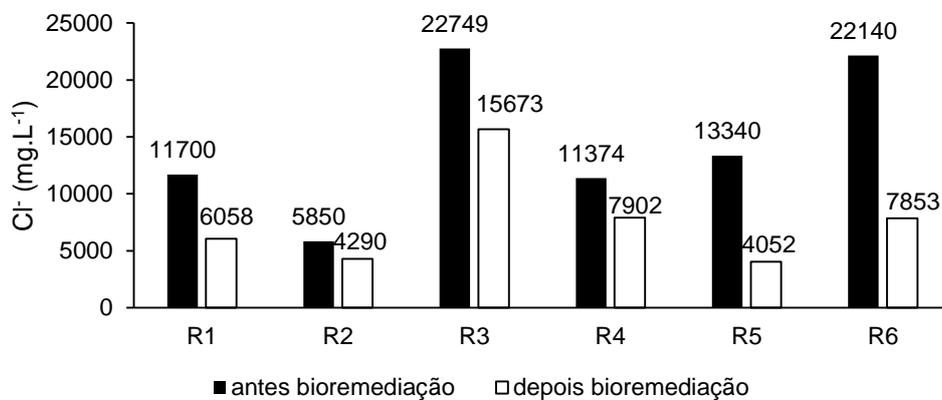


Figura 4.27 - Valores de cloretos antes e depois da bioremediação para as diferentes condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$; R2 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

No caso dos sulfatos houve um aumento bastante significativo relativamente aos resultados após o pré-tratamento (figura 4.28). Este resultado é devido à adição de ácido sulfúrico ($\text{H}_2\text{SO}_4^{2-}$) para a manutenção do pH do meio de crescimento na gama neutra, ou seja, é um fator que poderá ser eliminado se se deixar o pH do meio de cultura evoluir de acordo com as alterações do meio.

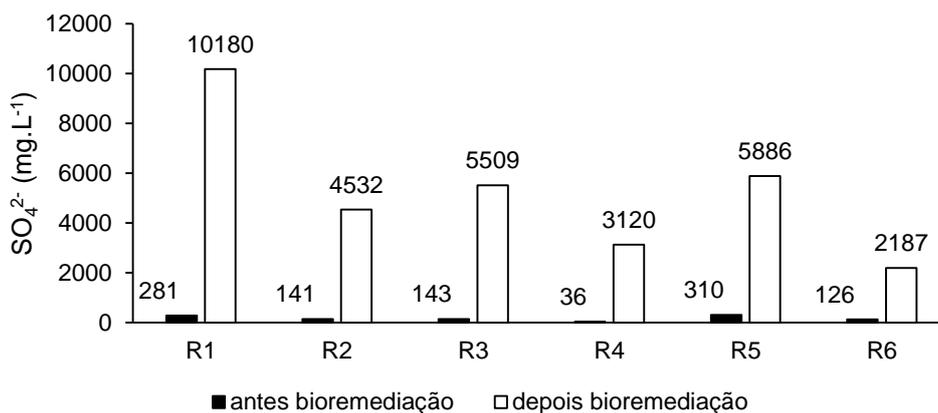


Figura 4.28 - Valores de sulfatos antes e depois da bioremediação para as diferentes condições.
 Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 ; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Relativamente ao azoto amoniacal (figura 4.29), praticamente todas as condições apresentaram reduções, o que seria expectável visto ser um dos nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas (Paskuliakova et al., 2016; Sandoval et al., 2015).

No caso de R1 e R2 os valores finais de azoto amoniacal obtidos foram de 1383 e 267 mg.L^{-1} , o que equivale a 40,4% e 77% de remoção, respetivamente. A concentração elevada de NH_4^+ para R1 ($>2000 \text{ mg.L}^{-1}$) poderá ser apontada como uma das razões da remoção não ter sido mais eficiente (Ferraz et al., 2013; Li et al., 1999).

Porém, quando analisados o resultado das condições R3 e R4 constatou-se que houve um incremento de NH_4^+ no meio, o que não seria expectável. Este resultado poderá estar relacionado com uma mortalidade elevada da cultura, indicada pela mudança de cor verde para amarelo-esverdeado. Com isto, as microalgas terão libertado o azoto que tinham remediado até à fase de morte para o meio, acabado pelo efluente não ser remediado na sua totalidade. A primeira hipótese para isto acontecer poderá estar relacionada com a presença de algum metal pesado presente no lixiviado e que não foi possível remover por precipitação na etapa de pré-tratamento. Outra hipótese, podendo ter um efeito sinérgico com a hipótese anterior, é a libertação de alguma espécie metálica presente já na composição da cinza e que ao ser adicionado ao meio, por dissolução, acabou por afetar a etapa de bioremediação.

Por fim, nas condições R5 e R6 verificaram-se remoções de cerca de 31% em ambas as condições, o que corresponde a valores finais no lixiviado de 521 e 242 mg.L^{-1} de azoto amoniacal.

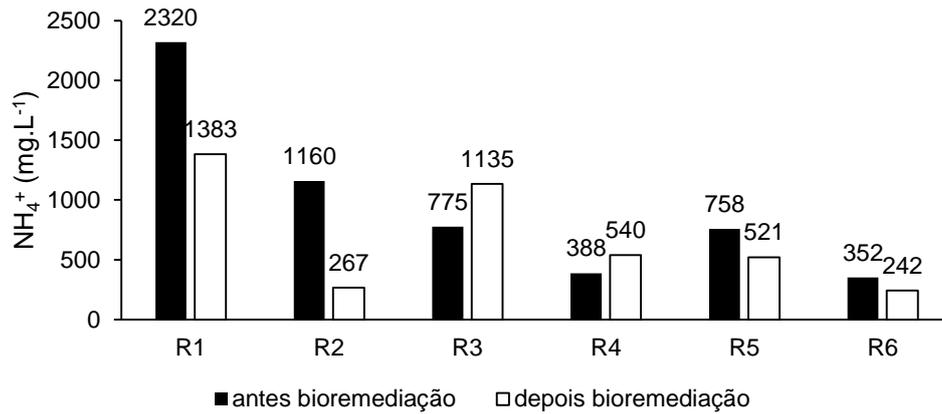


Figura 4.29 - Valores de NH_4^+ antes e depois da bioremediação para as diferentes condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$; R2 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Quanto ao fósforo a sua concentração já era muito reduzida, no entanto como se trata de um nutriente essencial houve ainda remoções por parte das algas. A máxima remoção verificou-se em R3 (cinza) com 97,4%, seguida de R4 com 83,3%. Na condição R5 houve um aumento de fósforo no efluente, o que está associado a um início da fase de morte da cultura e redissolução de alguns nutrientes (figura 4.30). Na condição R6 seria expectável um teor inicial de cinzas comparável ao ensaio R4 mas tal não se observou.

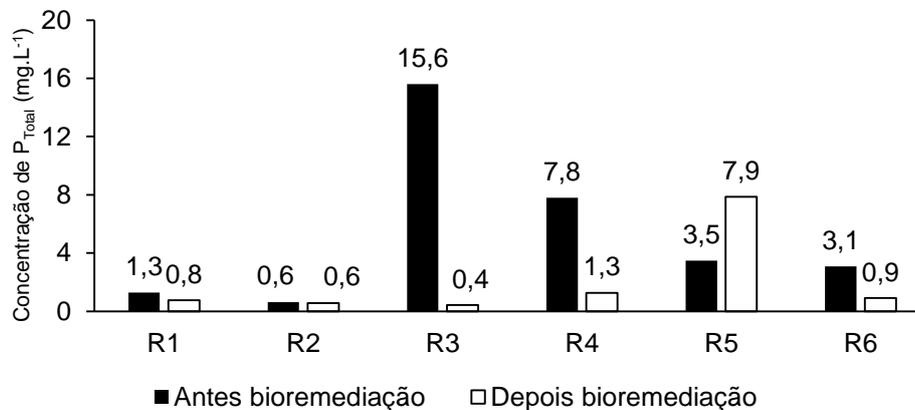


Figura 4.30 - Valores de fósforo total antes e depois da bioremediação para as várias condições testadas. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$; R2 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado $\text{Ca}(\text{OH})_2$ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

Os teores dos principais elementos metálicos presentes antes e após a bioremediação são apresentados nas figuras 4.31, 4.32, 4.33 e 4.34.

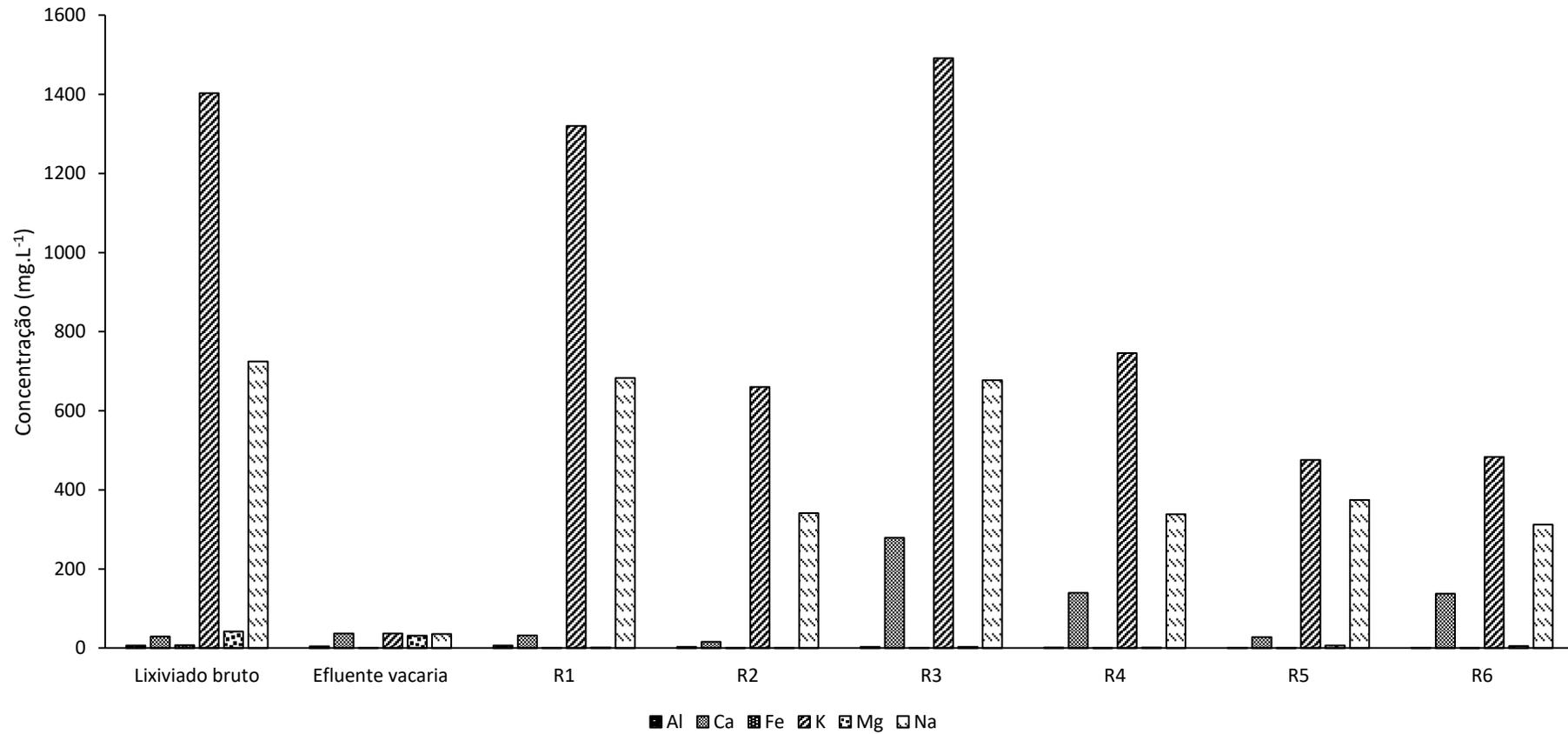


Figura 4.31 - Valores de Al, Ca, Fe, K, Mg e Na antes da bioremediação para as várias condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)₂ c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

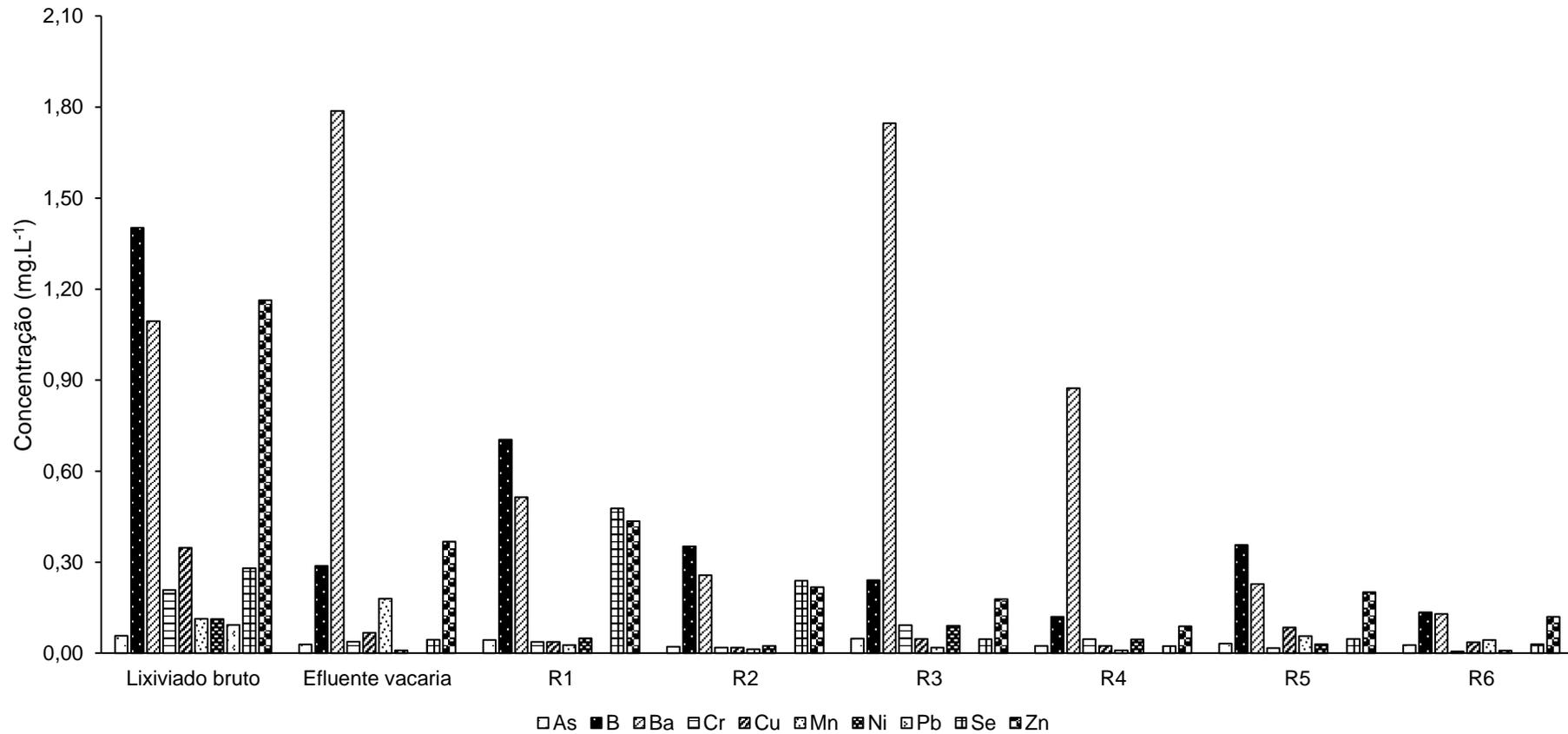


Figura 4.32 - Valores de metais minoritários antes da bioremediação para as várias condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 ; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

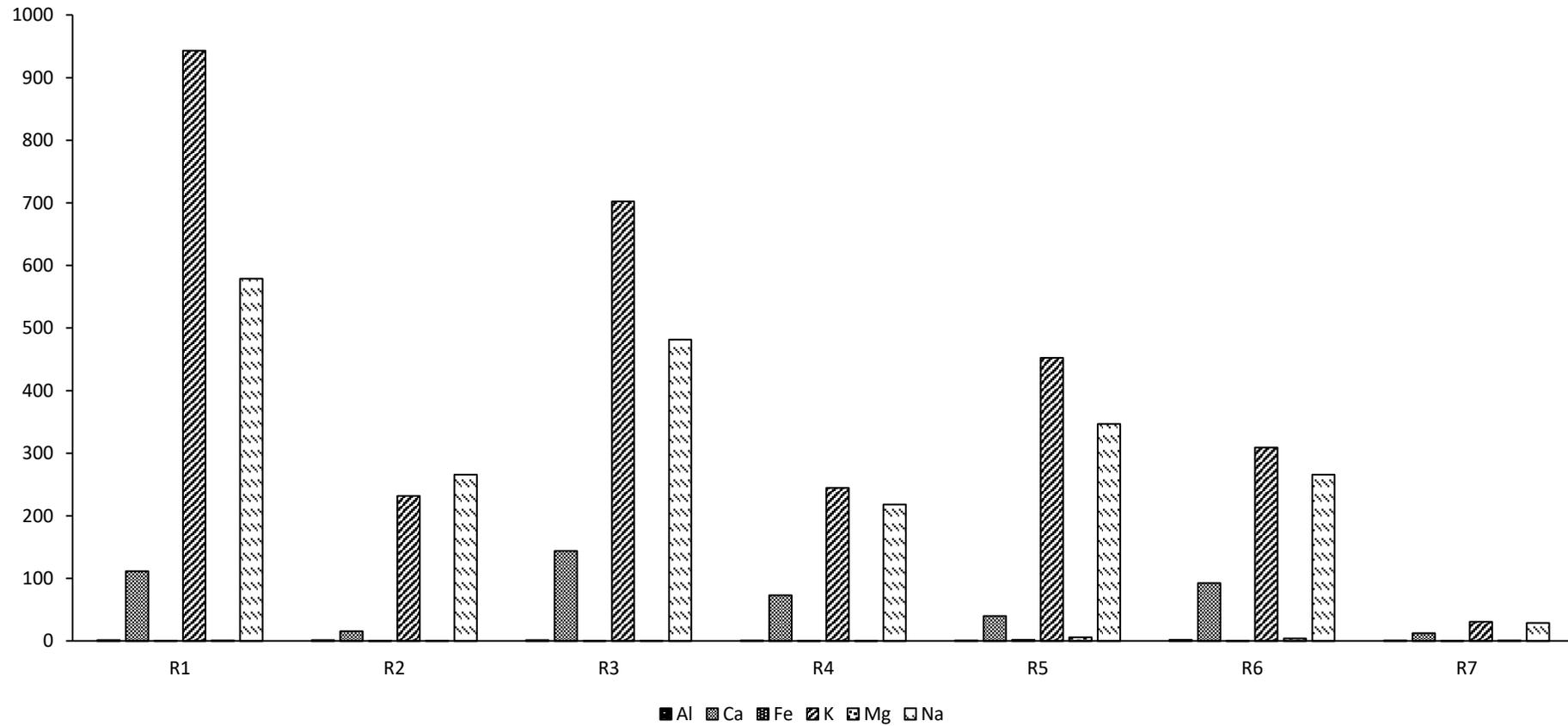


Figura 4.33 - Valores de Al, Ca, Fe, K, Mg, e Na depois da bioremediação para as várias condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 ; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

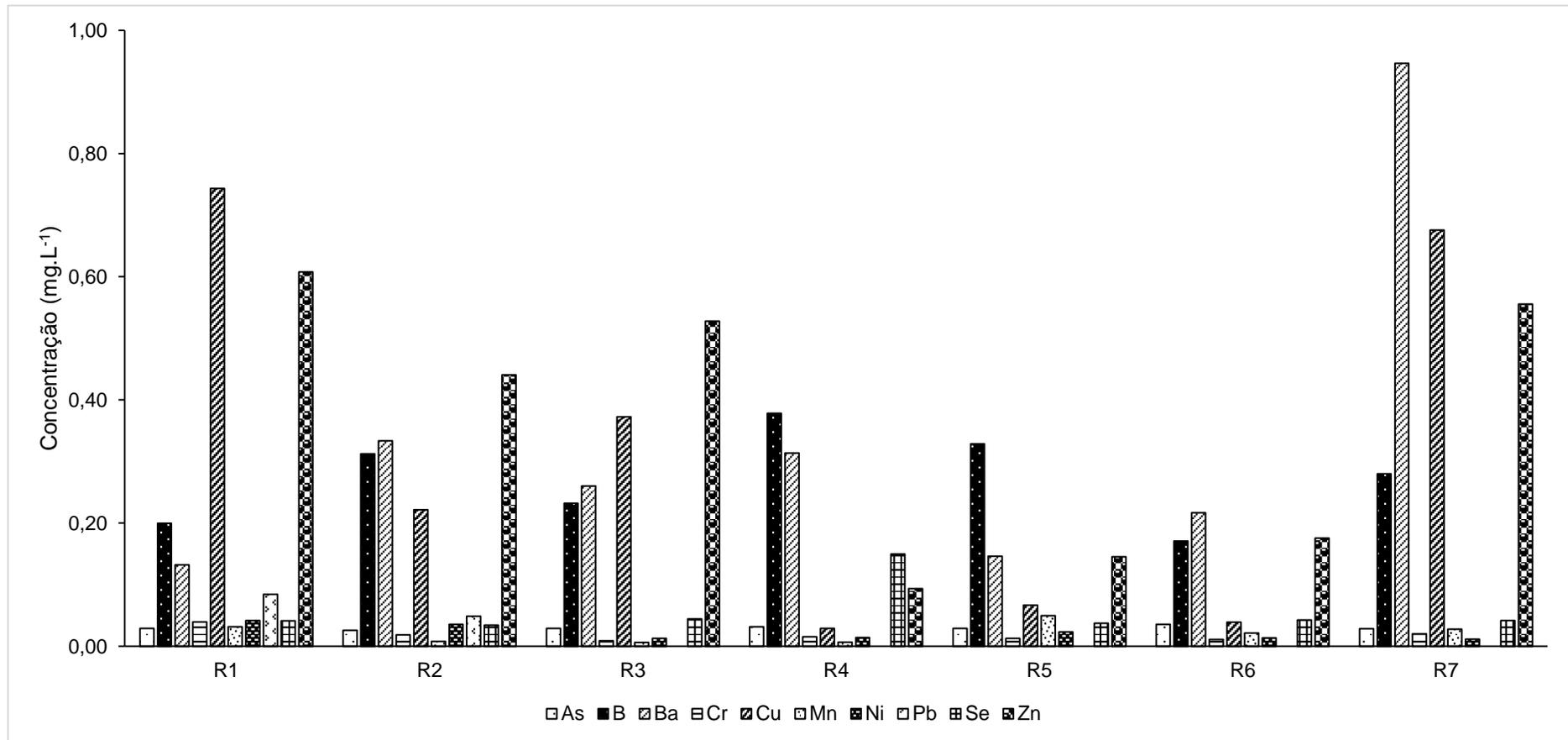


Figura 4.34 - Valores de metais minoritários depois da bioremediação para as várias condições. Legenda: R1 – Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 ; R2 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 (1:2); R3 - Lixiviado pré-tratado cinza; R4 - Lixiviado pré-tratado cinza (1:2); R5 - Lixiviado pré-tratado Ca(OH)_2 c/ efluente vacaria (1:2); R6 - Lixiviado pré-tratado cinza c/ efluente vacaria (1:2).

As condições R1 e R3 correspondem às condições C7 e C9 do pré-tratamento com Ca(OH)_2 e cinza, tendo estes resultados já sido analisados. As condições R2 e R4 correspondem as diluições das condições R1 e R3 respetivamente e, por isso, assumiu-se que a concentração dos metais foi reduzida a metade. No caso das condições R5 e R6 onde se adicionou efluente de vacaria juntamente com o lixiviado pré-tratado com Ca(OH)_2 e cinza verificou-se que os dois principais elementos que se destacam na figura 4.31 são o K (476 e 483 mg.L^{-1}) e o Na (374 e 312 mg.L^{-1}). Todavia, estes dois metais são proveniente do lixiviado e possivelmente da cinza e não do efluente de vacaria no qual a concentração destes metais maioritários é baixa.

Relativamente aos metais minoritários, nomeadamente, os metais pesados não se verificam concentrações significativas nos reatores R5 e R6 (figura 4.32).

Após o tratamento biológico com microalgas foi de novo analisado o efluente final constatando-se que em termos de metais maioritários, destacam-se em praticamente todas as condições o K e o Na (figura 4.33). O reator R1 foi o que apresentou as maiores concentrações destes dois elementos com o K a apresentar uma concentração de 943 mg.L^{-1} e o Na de 579 mg.L^{-1} . Isto equivale a uma redução de 28,6% para o K e 15,2% para Na. Os restantes elementos como o Al, Ca, o Mg e o Fe apresentaram valores abaixo dos 150 mg.L^{-1} em todas as condições.

No que respeita aos metais minoritários foi possível reduzir a sua concentração abaixo de 1 mg.L^{-1} , embora a sua concentração inicial também não fosse elevada (figura 4.34). Por outro lado, os metais que se destacam em quase todas as condições são o B, Ba, Cu e o Zn.

Com base na tabela 2.9 que consta do Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto e que estabelece os VLE para a descarga de águas residuais industriais em meios hídricos, é possível verificar que a maioria dos valores finais de qualidade do efluente tratado no presente trabalho não cumprem os requisitos mínimos. Este resultado já seria expectável dado o grau elevado de contaminação do lixiviado bruto, bem como por se tratar de um método alternativo cujas eficiências não se comparam aos da osmose inversa (método convencional).

Todavia, a qualidade final do efluente, eventualmente, não condiciona a descarga deste em coletores municipais para ser tratado posteriormente numa ETAR, visto que as normas de descarga são, substancialmente, menos exigentes a nível municipal.

Por outro lado, este efluente pode ser direcionado para a unidade de osmose inversa, possibilitando alcançar níveis de purificação elevados e promovendo a redução de custos associada sobretudo à colmatação das membranas.

4.4 Avaliação do potencial de produção de bioetanol

Após realizada uma hidrólise ácida, com o intuito de converter as moléculas de hidratos de carbono complexas em moléculas de açúcares fermentáveis, foi determinado o potencial de produção de bioetanol. Os resultados na análise dos açúcares totais e redutores presentes no hidrolisado encontram-se resumidos na tabela 4.7

Tabela 4.7 - Valores médios e respetivos desvios-padrão para as medições de açúcares totais e açúcares redutores da biomassa algal.

| Biomassa seca (g) | Volume de hidrolisado (mL) | Açúcares totais (mg_{eq. glucose}.L⁻¹) | Açúcares redutores (mg_{eq. glucose}.L⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------------|--|---|
| 8 | 200 | 7182 (±81) | 7478 (±324) |

De acordo com Zabed e co-autores (2017), a reação química equilibrada para a produção de etanol é a seguinte,



significando que, estequiometricamente, partir de 1 g de glucose obtêm-se 0,51 g de etanol. Este corresponde ao rendimento máximo que é possível obter, todavia vários fatores afetam a reação de conversão acabando o rendimento por decrescer (Zabed et al., 2017).

A partir de 8 g de biomassa seca obteve-se uma concentração de açúcares totais de 7,18 g_{eq. glucose}.L⁻¹, o que está abaixo dos valores obtidos por outros autores. Ho e colaboradores (2012) obtiveram uma concentração de glucose de 23,6 g.L⁻¹ (Ho et al., 2012). Num outro estudo com a mesma espécie, Shokrkar e colaboradores (2017) obtiveram de 13,3 g.L⁻¹ (Shokrkar et al., 2017). Miranda e co-autores (2012) alcançaram valores de 63,2 g.L⁻¹ (Miranda et al., 2012). Estas diferenças decorrem também do metabolismo das microalgas e das condições de cultura que favorecem ou não a acumulação de carboidratos.

Por sua vez, a concentração de glucose obtida corresponde a 1,44 mg_{eq. glucose}.L⁻¹ nos 200 mL de hidrolisado e um rendimento de 0,18 g_{glucose} / g_{biomassa}.

Agora sabendo pela equação 3.1 que 1 g de glucose corresponde a 0,51 g de etanol, então no caso em estudo significa que temos uma produção teórica de etanol de 0,74 g e um rendimento por massa de alga de 0,09 g_{etanol} / g_{biomassa}.

Com estes resultados é possível verificar que a espécie *S. obliquus* em condições normais (sem stress) não apresenta mais do que 10 a 20% de hidratos de carbono, a grande maioria na forma de amido (Ho et al., 2012; Milano et al., 2016; Razack and Surendhiran, 2016). Isto limita e justifica as baixas concentrações de glucose (7,18 g.L⁻¹) no hidrolisado, afetando a produção final de bioetanol.

Apesar do baixo rendimento de bioetanol obtido, torna-se importante demonstrar o potencial de produção a uma escala maior e perceber em que medida se torna viável a aplicação deste sistema de produção.

Na figura 4.35 está ilustrado um diagrama de produção de bioetanol com os vários fluxos de entrada e saída, nas mesmas condições do presente estudo, mas a uma escala industrial.

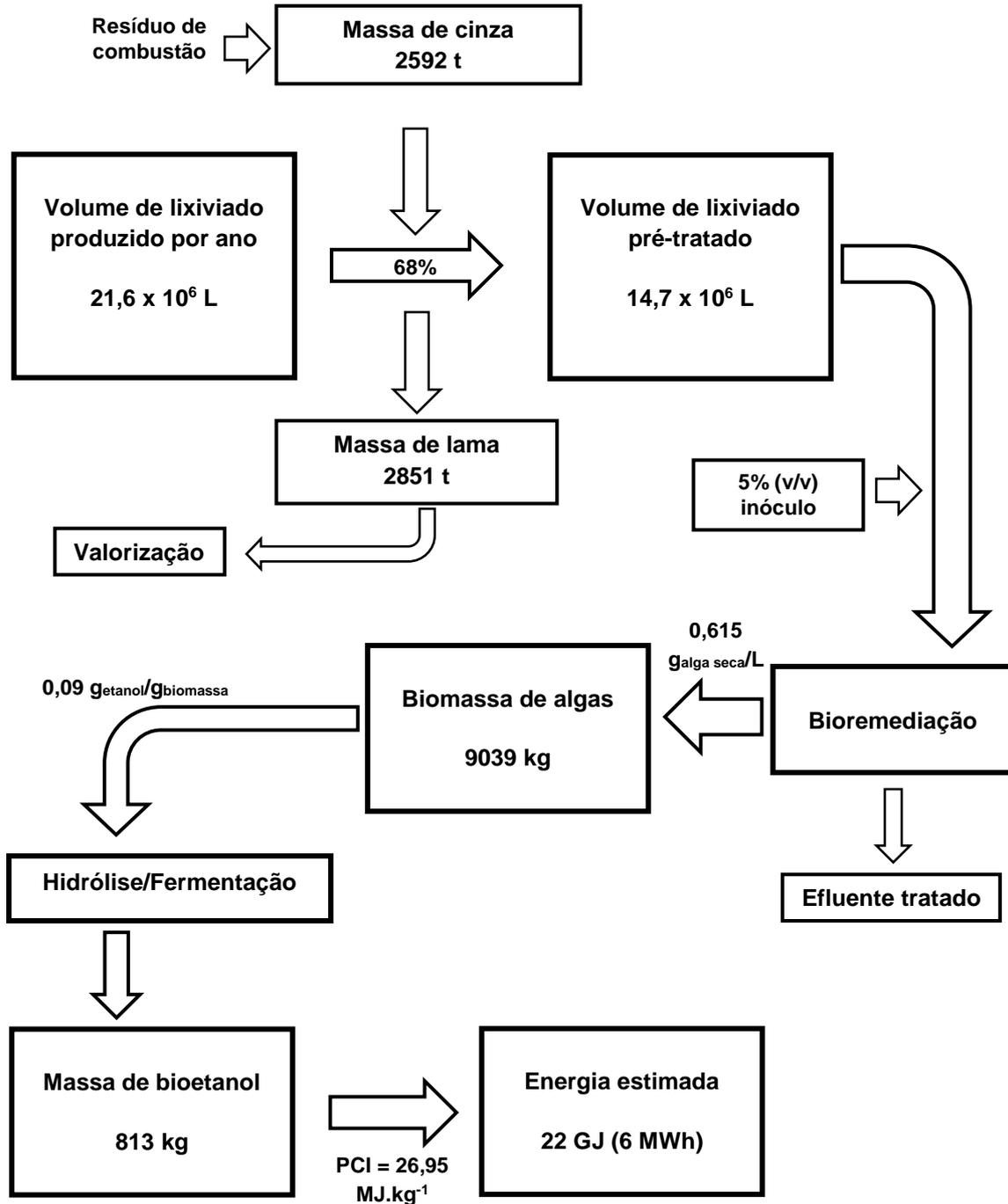


Figura 4.35 - Diagrama do potencial de produção de bioetanol a partir do sistema de bioremediação do presente estudo (scale-up).

De acordo com a licença ambiental LA n.º20/2007 detida pela CITRI, S.A., empresa de onde proveio o lixiviado do presente estudo, a ETAL tem a capacidade de receber um caudal de $120 \text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$ (CITRI S.A., 2007). Se considerarmos apenas 6 meses de produção de lixiviado no aterro, tendo em conta a reduzida precipitação durante o período de Primavera/Verão, é possível obter um volume máximo de lixiviado de cerca de $21,6 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{ano}^{-1}$.

Por sua vez, se aplicarmos um pré-tratamento por precipitação química, utilizando cinzas de biomassa (resíduo), com um rendimento de cerca de 68% obtêm-se um volume de lixiviado pré-tratado de $14,7 \times 10^6 \text{ L}$. Este volume é encaminhado para reatores onde se procede à etapa de bioremediação. Segundo, o trabalho realizado obteve-se uma concentração de biomassa seca de $0,615 \text{ g}_{\text{alga seca}} / \text{L}$, o que equivale a produzir 9039 kg de biomassa algal.

Tendo agora a biomassa produzida é necessário converter o conteúdo de hidratos de carbono em etanol. Para isso, utilizou-se a conversão teórica obtida no presente trabalho ($0,09 \text{ g}_{\text{etanol}} / \text{g}_{\text{biomassa}}$). Desta forma, a estimativa de produção de etanol num ano é de 813 kg, o que convertendo em energia ($\text{PCI}_{\text{etanol}} = 26,95 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$) corresponde a 6 MWh (Argonne National Laboratory, 2010).

Importa salientar a produção de lamas na etapa de pré-tratamento, correspondendo a um resíduo deste processo, sendo possível dar-lhes um destino final como por exemplo, para materiais de construção ou incorporação em solos (Smol et al., 2015; Wu et al., 2017).

Por outro lado, o próprio processo de fermentação das microalgas dá origem a um resíduo orgânico que compreende as leveduras e a componente não sacarificável das microalgas que poderá ser valorizável como um aditivo para fertilização ou correção de solos.

Em suma, a produção de energia obtida no diagrama acima corresponde a uma estimativa, tendo sido utilizado um rendimento de conversão teórico para o bioetanol. Todavia, importa ter uma noção do potencial energético do processo, havendo a necessidade de continuar a investigar no sentido de alcançar uma maior eficiência.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A dependência energética fóssil do atual sistema económico mundial cria um cenário de grande instabilidade a diferentes níveis, conduzindo à necessidade de procurar alternativas sustentáveis de produção de energia.

Por outro lado, aliada a esta urgência energética está um crescimento demográfico intenso nos centros urbanos provocando uma multitude de impactes económicos, sociais e ambientais. Uma das consequências mais evidentes é a geração de grandes quantidades de resíduos, sendo que grande parte destes têm como destino final os aterros sanitários, levando à geração de elevados volumes de lixiviado.

Tendo em conta estas duas grandes adversidades atuais, neste trabalho foi testado um sistema integrado e alternativo de remediação de um lixiviado de aterro ao mesmo tempo que se produziu um vetor energético sustentável. Desta forma foi investigada a capacidade de bioremediação do lixiviado por meio de microalgas e a avaliação do potencial de produção de bioetanol a partir da biomassa algal obtida.

Os resultados deste estudo permitiram entender, relativamente ao tratamento do lixiviado de aterro, a necessidade de efetuar um pré-tratamento do efluente bruto antes de se iniciar a etapa de bioremediação. O pré-tratamento por precipitação química com agitação por ar teve como agentes de precipitação o hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e cinzas de biomassa (resíduo). Este método de pré-tratamento mostrou ser bastante eficiente sobretudo na remoção da cor escura do lixiviado, associado à presença de compostos recalcitrantes (e.g. ácidos húmicos e fúlvicos), mas também conduziu à diminuição eficaz de SST e NH_4^+ .

A utilização das cinzas de biomassa permitiu atingir remoções de 99% e 77% para a densidade ótica (cor) e NH_4^+ , respetivamente. Nos ensaios com Ca(OH)_2 , as taxas de remoção destes dois parâmetros foram inferiores, na ordem dos 94% e 31%. Todavia, para os SST, foi possível remover 87% em oposição aos ensaios com cinza, onde se observou uma redução aproximada de 58%. A CQO também apresentou resultados positivos com taxas de remoção superiores a 50% em ambos os agentes de precipitação. Uma outra vantagem da utilização da cinza foi o incremento de fósforo em relação ao lixiviado bruto (75%), bem como de outros micronutrientes importantes para a fase de crescimento das microalgas

Com isto, é possível concluir o potencial de aplicação da cinza no pré-tratamento de um lixiviado altamente contaminado, podendo representar uma alternativa viável, sustentável e eficaz em comparação com o Ca(OH)_2 .

Após o pré-tratamento do lixiviado bruto foi iniciada a etapa de bioremediação com a espécie de microalga *Scenedesmus obliquus*, tendo sido utilizados os lixiviados pré-tratados com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e cinza.

Os resultados mostraram, em primeiro lugar, a capacidade da microalga *S. obliquus* em crescer nos lixiviados pré-tratado, bem como nas condições onde foram realizadas diluições 1:2 dos mesmos. Além disso, com o intuito de fornecer uma fonte de nutrientes foram também testadas duas condições onde se diluiu os lixiviados pré-tratados com efluente de vacaria.

Entre todas as condições testadas, o lixiviado pré-tratado com cinza diluído em efluente de vacaria apresentou uma produtividade média mais elevada de $0,062 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$. No caso do lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e cinza as produtividades situaram-se $0,009$ e $0,019 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, relativamente abaixo das condições onde se efetuou diluição ($0,012$ e $0,027 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$).

Quanto à capacidade das microalgas em remediarem o efluente pré-tratado constatou-se que de uma forma geral foi possível alcançar valores mais baixos para a maioria dos parâmetros analisados. No caso dos SST foi possível reduzir a sua concentração em todas as condições testadas, onde a condição com lixiviado pré-tratado com cinzas obteve os melhores resultados de remoção, na ordem dos 81%, embora todas as condições apresentaram no efluente final concentrações em média de 642 mg.L^{-1} .

Na CQO também foram obtidos resultados positivos, verificando-se a capacidade das microalgas em consumir ou adsorver a matéria orgânica e inorgânica associada a este parâmetro. Nas condições onde se utilizou apenas lixiviado pré-tratado, verificou-se uma remediação ligeiramente mais eficiente nos reatores com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (50%) em comparação com os de cinza (41%). Todavia, no global, a condição com lixiviado pré-tratado com cinza e diluindo em efluente de vacaria foi a que obteve a maior redução (68,2%), o que seria expectável ao adicionar matéria orgânica mais disponível para as algas.

Relativamente ao NH_4^+ , praticamente todas as condições apresentaram reduções, o que seria expectável visto ser um dos nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. Os melhores resultados foram determinados nas condições onde se utilizou apenas lixiviado pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ com remoções entre os 40% e 77%. Porém, nas condições com lixiviado pré-tratado com cinza observou-se um aumento de NH_4^+ . Este resultado poderá estar relacionado com uma mortalidade elevada da cultura, acabando esta por libertar o azoto contido no seu organismo para o meio, não havendo por isso remediação.

No final da bioremediação, o efluente é separado das microalgas permitindo avançar para a fase de valorização da biomassa algal como fonte potencial de produção de bioetanol.

A hidrólise ácida realizada para a conversão dos hidratos de carbono complexos em açúcares fermentáveis permitiu obter um hidrolisado final com uma concentração de açúcares totais de $7,18 \text{ g}_{\text{eq.glucose}} \cdot \text{L}^{-1}$. Esta concentração está abaixo das concentrações encontradas em outros estudos, indicando que a biomassa de *S. obliquus* apresentou uma reduzida percentagem de hidratos de carbono (10-23% bs). O rendimento teórico da produção de etanol por biomassa seca foi de $0,09 \text{ g}_{\text{etanol}} / \text{g}_{\text{biomassa}}$. Com o intuito de investigar o potencial de produção de bioetanol em larga escala foi realizada uma estimativa, na qual se obteve uma produção de bioetanol de 813 kg, o que equivale, em termos energéticos, à geração de 22 GJ.

O presente trabalho representa um contributo científico significativo, na medida em que existem ainda poucos estudos sobre bioremediação de lixiviados de aterro por meio de microalgas. Neste trabalho foi, portanto, possível converter um lixiviado altamente contaminado num efluente substancialmente mais purificado através da combinação sinérgica de um pré-tratamento físico-químico com um tratamento biológico.

A inovação deste trabalho está também patente na capacidade de utilizar outros fluxos de resíduos, permitindo assim a sua integração num conceito de economia circular. É o caso das cinzas de biomassa, que apresentaram resultados positivos ao serem utilizadas como agente de precipitação sustentável e viável. Desta forma, atribui-se um novo destino às cinzas evitando a sua deposição em aterro.

A produção de bioetanol também aumenta o grau de inovação deste trabalho, ao conciliar a remediação do lixiviado com a determinação do potencial de produção de um vetor energético, neste caso um biocombustível líquido. É necessário, no entanto, ter em consideração a dimensão do trabalho executado, sendo essencial a realização de trabalho futuro relativamente à otimização de diferentes parâmetros em todo o processo de pré-tratamento, bioremediação e produção de bioetanol.

Em termos de perspectivas futuras torna-se importante testar novas condições de pré-tratamento com a cinza, testando diferentes tipos de lixiviado, bem como outros efluentes urbanos e agro-industriais. Nesta fase seria também interessante quantificar o azoto amoniacal que se remove por volatilização e aquele que é removido por precipitação. A produção de lamas durante a precipitação não foi abordada nesta dissertação, todavia estas representam um resíduo produzido em quantidades significativas. Estudos futuros deverão examinar as potenciais aplicações destas lamas com o intuito de aumentar a sustentabilidade do processo.

Relativamente à etapa de bioremediação do lixiviado seria também de interesse aprofundar as dinâmicas de crescimento das microalgas, avaliar quais os principais fatores limitantes no seu crescimento e determinar uma forma mais expedita de monitorizar o seu crescimento. A introdução de stresses e os efeitos destes na acumulação de hidratos de carbono deverão ser

investigados no futuro, de forma a potenciar a sua produção. Outra perspectiva de estudo interessante seria avaliar a utilização de outras espécies de microalgas que apresentem um conteúdo em hidratos de carbono mais elevado, ou até microalgas geneticamente modificadas.

A passagem de um regime descontínuo para um regime contínuo é também uma modificação essencial para podermos obter dados mais próximos das condições de operação à escala industrial.

Finalmente, dado que neste trabalho se realizou a avaliação do potencial de produção de bioetanol, a investigação deste sistema integrado poderá prosseguir no sentido de otimizar também a etapa de hidrólise da biomassa algal, mediante hidrólise enzimática ou hidrólise ácida, permitindo assim comparar os dois métodos, de forma a realizar uma etapa de fermentação alcoólica para a produção de bioetanol efetiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.A., Jingsong, G., Ping, L.Z., Ya, P.Y. and Al-Rekabi, W.S. (2009), "Review on Landfill Leachate Treatments", *American Journal Of Applied Sciences*, Vol. 6 No. 4, pp. 672–684.

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. and Ibraheem, I.B.M. (2012), "Microalgae and wastewater treatment", *Saudi Journal of Biological Sciences*, King Saud University, Vol. 19 No. 3, pp. 257–275.

Ağdağ, O.N. (2017), "Characterization and treatment of Denizli landfill leachate using anaerobic hybrid/aerobic CSTR systems", *Environmental Technology*, Vol. 32 No 7, pp 699-711.

Ahmaruzzaman, M. (2009), "Role of Fly Ash in the Removal of Organic Pollutants from Wastewater", *Energy and Fuels*, Vol. 23 No. 6, pp. 1494–1511.

Ahmaruzzaman, M. (2010), "A review on the utilization of fly ash", *Progress in Energy and Combustion Science*, Vol. 36 No. 3, pp. 327–363.

Amokrane, A., Comel, C. and Veron, J. (1997), "Landfill leachates pretreatment by coagulation-flocculation", *Water Research*, Vol. 31 No. 11, pp 2775-2782.

APHA. (1985), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed., American Public Health Association, Washington D.C.

APA (2017), "MRRU 2016, Portugal continental e regiões autónomas" disponível em: <https://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=84&sub2ref=933&sub3ref=936> (acedido em: 17/05/2017).

Argonne National Laboratory. (2010), GREET, disponível em: <http://greet.es.anl.gov/> (acedido em 12/08/2017).

Ayala, J. and Fernández, B. (2016), "A Case Study of Landfill Leachate Using Coal Bottom Ash for the Removal of Cd²⁺, Zn²⁺ and Ni²⁺", *Metals*, Vol. 6 No. 12, pp. 1-15.

Bahadar, A. and Bilal Khan, M. (2013), "Progress in energy from microalgae: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 27, pp. 128–148.

Baicha, Z., Salar-García, M.J., Ortiz-Martínez, V.M., Hernández-Fernández, F.J. and Ríos, A.P.D.L., Labjar, N., Lotfi, E. and Elmahi, M. (2016), "A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production : A promising low cost substrate for microbial fuel cells", *Fuel Processing Technology*, Vol. 154, pp. 104–116.

Baig, S., Coulomb, I., Courant, P. and Liechti, P. (1999), "Treatment of landfill leachates: Lapeyrouse and Satrod case studies", *Ozone Science Engineering.*, Vol. 21 No. 1, pp. 1-22.

- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M. and Pires, J.C.M. (2015), "Harvesting techniques applied to microalgae: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 41, pp. 1489–1500.
- Becker, E.W. (2007), "Micro-algae as a source of protein", *Biotechnology Advances*, Vol. 25, pp. 207–210.
- Benli, B. (2014), "Effects of humic acid release from sepiolite on the interfacial and rheological properties of alkaline dispersions", *Applied Clay Science*, Vol. 102, pp. 1–7.
- Blair, M.F., Kokabian, B. and Gude, V.G. (2013), "Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Vol. 2 No. 1.
- Bolea, E., Gorriz, M.P., Bouby, M., Laborda, F., Castillo, J.R. and Geckeis, H. (2006), "Multielement characterization of metal-humic substances complexation by size exclusion chromatography, asymmetrical flow field-flow fractionation, ultrafiltration and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection: A comparative approach", *Journal of Chromatography A*, Vol. 1129 No. 2, pp. 236–246.
- Brennan, L. and Owende, P. (2010), "Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14 No. 2, pp. 557–577.
- Brennan, R.B., Healy, M.G., Morrison, L., Hynes, S., Norton, D. and Clifford, E. (2016), "Management of landfill leachate: The legacy of European Union Directives", *Waste Management*, Vol. 55, pp. 355–363.
- Bulgariu, L. and Gavrilescu, M. (2015), "Chapter 30 - Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae", *Handbook of Marine Microalgae*.
- Capela, F.S. (2014), Contributo para o estudo da remoção de azoto em lixiviados de resíduos urbanos, Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa.
- Carlsson, S.A., Beilen, J.B. van, Möller, R. and Clayton, D. (2007), "Micro- and Macro-Algae: Utility for Industrial Applications, Outputs from the EPOBIO Project".
- Castrillón, L., Fernández-Nava, Y., Ullman, M., Anger, I. and Marañón, E. (2010), "Physico-chemical and biological treatment of MSW landfill leachate", *Waste Management*, Vol. 30 No. 2, pp. 228–235.
- Castro, Y.A., Ellis, J.T., Miller, C.D. and Sims, R.C. (2015), "Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol and ethanol fermentation", *Applied Energy*, Vol. 140, pp. 14–19.
- Chalivendra, S. (2014), "Bioremediation of Wastewater Using Microalgae" The School of Engineering of the University of Dayton.

- Cheah, W.Y., Ling, T.C., Show, P.L., Juan, J.C., Chang, J.S. and Lee, D.J. (2016), "Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform", *Applied Energy*, Vol. 179, pp. 609–625.
- Chen, C-L., Chang, J.-S. and Lee, D-J. (2015), "Dewatering and Drying Methods for Microalgae", *Drying Technology*, Vol. 33 No. 4, pp. 443–454.
- Chen, H. and Pan, S. (2005), "Bioremediation potential of *Spirulina*: toxicity and biosorption studies of lead", *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, Vol. 6B No. 3, pp. 171–174.
- Chen, Q., Luo, Z., Hills, C., Xue, G. and Tyrer, M. (2009), "Precipitation of heavy metals from wastewater using simulated flue gas: Sequent additions of fly ash, lime and carbon dioxide", *Water Research*, Vol. 43 No. 10, pp. 2605–2614.
- Cheng, H. and Tian, G. (2013), "Preliminary Evaluation of A Newly Isolated Microalga *Scenedesmus* sp. CHX1 for Treating Landfill Leachate", *Third International Conference on Intelligent System Design and Engineering Applications*, pp. 1057–1060.
- Choi, J-A., Hwang, J-H., Dempsey, B. A., Abou-Shanab, R. A. I., Min, B., Song, H., Lee, D.S., et al. (2011), "Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent", *Energy & Environmental Science*, Vol. 4 No. 9, p. 3513.
- Christaki, E., Florou-Paneri, P. and Bonos, E. (2011), "Microalgae : a novel ingredient in nutrition", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 62 No. 8, pp. 794-799.
- Christenson, L. and Sims, R. (2011), "Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts", *Biotechnology Advances*, Vol. 29 No. 6, pp. 686–702.
- CITRI S.A. (2007), LA no20/2007 - Centro Integrado de Tratamento de Resíduos Industriais Não Perigosos de Setúbal, Vol. 90020.
- Comissão Europeia (2008), "Memo on the renewable energy and climate change package", disponível em: http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-08-33_en.htm?locale=fr (acedido em: 08/03/2017).
- Comissão Europeia (2009), "Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009", disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0028&from=PT> (acedido em: 08/03/17).
- Comissão Europeia (2015), "Diretiva (UE) 2015/1513 do Parlamento Europeu e do Conselho de 9 de setembro de 2015", disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015L1513&from=PT> (acedido em: 08/03/2017)
- Comissão Europeia (2017), "Energy Strategy and Energy Union: secure, competitive and sustainable energy", disponível em: <https://ec.europa.eu/energy/en/topics/energy-strategy-and-energy-union> (acedido em: 08/03/2017).

- Demirbas, A. (2001), "Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals", *Energy Conversion and Management*, Vol. 42, pp. 1357–1378.
- Demirbas, A. (2010), "Use of algae as biofuel sources", *Energy Conversion and Management*, Vol. 51 No. 12, pp. 2738–2749.
- DGEG (2016), *Energia Em Portugal 2014*, disponível em: www.dgeg.pt (acedido em: 22/03/2017).
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956), "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemical*, Vol. 28 No. 3, pp. 350–356.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D. and Guzik, U. (2016), "Natural carriers in bioremediation: A review", *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 23, pp. 28–36.
- El-Dalatony, M.M., Kurade, M.B., Abou-Shanab, R.A.I., Kim, H., Salama, E.S. and Jeon, B.H. (2016), "Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*", *Bioresource Technology*, Vol. 219, pp. 98–105.
- El-Gohary, F.A. and Kamel, G. (2016), "Characterization and biological treatment of pre-treated landfill leachate", *Ecological Engineering*, Vol. 94, pp. 268–274.
- El-Sheekh, M.M., Farghl, A.A., Galal, H.R. and Bayoumi, H.S. (2016), "Bioremediation of different types of polluted water using microalgae", *Rendiconti Lincei*, Vol. 27 No. 2, pp. 401–410.
- EUROSTAT (2017a), "Greenhouse gas emission statistics - emission inventories", disponível em: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Greenhouse_gas_emission_statistics (acedido em: 10/03/2017).
- EUROSTAT (2017b), "Renewable energy statistics", disponível em: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Renewable_energy_statistics (acedido em: 10/03/2017).
- EUROSTAT (2017c), "Energy dependence (graph)", disponível em: <http://ec.europa.eu/eurostat/tgm/graph.do?tab=graph&plugin=1&pcode=tsdcc310&language=en&toolbox=data> (acedido em: 10/03/2017).
- EUROSTAT (2017d), "Waste statistics", disponível em: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics (acedido em: 17/05/2017).
- Farias Silva, C.E. and Bertucco, A. (2016), "Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook", *Process Biochemistry*, Vol. 51 No. 11, pp. 1833–1842.
- Fedje, K.K., Rauch, S., Cho, P. and Steenari, B. (2010), "Element associations in ash from waste combustion in fluidized bed", *Waste Management*, Vol. 30 No. 7, pp. 1273–1279.

- Fenton, O. and Ó hUallacháin, D. (2012), "Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review", *Algal Research*, Vol. 1 No. 1, pp. 49–56.
- Ferraz, F.M., Povinelli, J. and Vieira, E.M. (2013), "Ammonia removal from landfill leachate by air stripping and absorption", *Environmental Technology*, Vol. 34 No.15, pp. 2317-2326.
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P.A.S.S., Ferreira, A.F., Dias, A.P., Pinheiro, H.M., Reis, A., et al. (2017), "*Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes", *Journal of Cleaner Production*, Vol. 165, pp. 1316–1327.
- Ferreira, J.R. and Martins, F.R. (2009), "Ventos de mudança - a energia eólica em Portugal.", 1.º *Congresso de Desenvolvimento Regional de Cabo Verde*, pp. 388–408.
- Gao, J., Oloibiri, V., Chys, M., Audenaert, W., Decostere, B., He, Y., et al. (2015), "The present status of landfill leachate treatment and its development trend from a technological point of view", *Review Environmental Science Biotechnology*, Vol. 14, pp. 93–122.
- Gerardo, M.L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T. and Skill, S.C. (2015), "Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants", *Algal Research*, Vol. 11, pp. 248–262.
- Gómez, X., Blanco, D., Lobato, A., Calleja, A., Martínez-Núñez, F. and Martin-Villacorta, J. (2011), "Digestion of cattle manure under mesophilic and thermophilic conditions: Characterization of organic matter applying thermal analysis and ¹H NMR", *Biodegradation*, Vol. 22 No. 3, pp. 623–635.
- González, L.E., Cañizares, R.O. and Baena, S. (1997), "Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*", *Bioresource Technology*, Vol. 60 No. 3, pp. 259–262.
- Gouveia, L., A. P. Batista, I.S., Raymundo, A. and Bandarra, N.M. (2008), "Chapter 2 - Microalgae in Novel Food Products", Nova Science Publishers. Inc.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K. and Bux, F. (2014), "Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production", *Fuel*, Vol. 128, pp. 46–52.
- Gupta, S.K., Ansari, F.A., Shriwastav, A., Sahoo, N.K., Rawat, I. and Bux, F. (2016), "Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels", *Journal of Cleaner Production*, Vol. 115, pp. 255–264.
- Harun, R. and Danquah, M.K. (2011), "Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production", *Process Biochemistry*, Vol. 46 No. 1, pp. 304–309.

- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S. and Ogushi, Y. (1997), "CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation", *Energy*, Vol. 22 No. 2/3, pp. 137–142.
- Hlavova, M., Turoczy, Z. and Bisova, K. (2015), "Improving microalgae for biotechnology - From genetics to synthetic biology", *Biotechnology Advances*, Vol. 33 No. 6.
- Ho, S.H., Chen, C.Y. and Chang, J.S. (2012), "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N", *Bioresource Technology*, Vol. 113, pp. 244–252.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A. and Chang, J.S. (2013a), "Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock", *Bioresource Technology*, Vol. 135, pp. 191–198.
- Ho, S.H., Li, P.J., Liu, C.C. and Chang, J.S. (2013b), "Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N", *Bioresource Technology*, Vol. 145, pp. 142–149.
- Holanda, L.R. and Ramos, F.S. (2015), "Reuse of Waste Sugarcane Agribusiness and Green Power Generation", *Journal of Clean Energy Technologies*, Vol. 4 No. 5, pp. 341–345.
- Holliday, C.P., Rasmussen, T.C. and Miller, W.P. (2003), "Establishing the Relationship Between Turbidity and Total Suspended Sediment Concentration", *Georgia Water Resources Conference*, pp. 1–3.
- Huang, H., Xiao, D., Zhang, Q. and Ding, L. (2014), "Removal of ammonia from landfill leachate by struvite precipitation with the use of low-cost phosphate and magnesium sources", *Journal of Environmental Management*, Vol. 145, pp. 191–198.
- Hui, L., Daphne, X., Utomo, H.D., Zhi, L. and Kenneth, H. (2011), "Correlation between Turbidity and Total Suspended Solids in Singapore Rivers", *Journal of Water Sustainability*, Vol. 1 No. 3, pp. 313–322.
- IEA. (2016), "Key world energy statistics", International Energy Agency, p. 80.
- IPMA. (2016), Boletim Climatológico Outubro 2016 - Portugal Continental.
- Inhabitat (2017), disponível em: <https://inhabitat.com/energaia-grows-algae-for-eating-on-rooftops-in-bangkok/> (acedido em: 05/06/2017)
- Jambo, S.A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S.H., Marbawi, H., Gansau, J.A. and Ravindra, P. (2016), "A review on third generation bioethanol feedstock", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 65, pp. 756–769.

- Jin, P., Song, J., Wang, X.C. and Jin, X. (2017), "Two-dimensional correlation spectroscopic analysis on the interaction between humic acids and aluminum coagulant", *Journal of Environmental Sciences*, p. 9.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. (2011), "Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol", *Bioresource Technology*, Vol. 102 No. 1, pp. 186–193.
- Jönsson, L.J. and Martín, C. (2016), "Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects", *Bioresource Technology*, Vol. 199, pp. 103–112.
- Kargi, F. and Pamukoglu, M.Y. (2004), "Repeated fed-batch biological treatment of pre-treated landfill leachate by powdered activated carbon addition", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 34 No. 5, pp. 422–428.
- Kim, D.Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.I., Lee, K., Park, J.Y., Chang, W.S., et al. (2016), "Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*", *Bioresource Technology*, Vol. 199, pp. 300–310.
- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G. and Bae, H.J. (2014), "Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation", *Bioresource Technology*, Vol. 153, pp. 47–54.
- Kjeldsen, P., Barlaz, M.A., Rooker, A.P., Baun, A., Ledin, A. and Christensen, T.H. (2002), "Present and Long-Term Composition of MSW Landfill Leachate: A Review", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 32 No. 4, pp. 297–336.
- Kloster, N., Brigante, M., Zanini, G. and Avena, M. (2013), "Aggregation kinetics of humic acids in the presence of calcium ions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 427, pp. 76–82.
- Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert, R. and Frampton, D.M.F. (2006), "Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds", *Aquacultural Engineering*, Vol. 35 No. 3, pp. 300–313.
- Kshirsagar, D.A. (2013), "Bioremediation of Wastewater By Using Microalgae : an Experimental Study", *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*, Vol. 2 No. 3, pp. 339–346.
- Kumar, J.I.N. and Oommen, C. (2012), "Removal of heavy metals by biosorption using freshwater alga *Spirogyra hyalina*", *Journal of Environmental Biology*, Vol. 33, pp. 27-31.

- Kumari, M., Ghosh, P. and Thakur, I.S. (2016), "Landfill leachate treatment using bacto-algal co-culture: An integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 128, pp. 44–51.
- Kurniawan, T.A., Lo, W. and Chan, G.Y.S. (2006), "Physico-chemical treatments for removal of recalcitrant contaminants from landfill leachate", Vol. 129, pp. 80–100.
- Kwon, H.K., Jeon, J.Y. and Oh, S.J. (2017), "Potential for Heavy Metal (Copper and Zinc) Removal from Contaminated Marine Sediments using Microalgae and Light Emitting Diodes", *Ocean Science Journal*, Vol. 52, pp. 57–66.
- Lam, M.K. and Lee, K.T. (2012), "Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward", *Biotechnology Advances*, Vol. 30 No. 3, pp. 673–690.
- Lee, A.K., Lewis, D.M. and Ashman, P.J. (2012), "Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 46, pp. 89–101.
- Lee, O.K., Oh, Y.K. and Lee, E.Y. (2015a), "Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1", *Bioresource Technology*, Vol. 196, pp. 22–27.
- Lee, O.K., Seong, D.H., Lee, C.G. and Lee, E.Y. (2015b), "Sustainable production of liquid biofuels from renewable microalgae biomass", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, Vol. 29, pp. 24–31.
- Lema, J.M., Mendez, R. and Blazquez, R. (1988), "Characteristics of landfill leachates and alternatives for their treatment: A review", *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 40 No. 3–4, pp. 223–250.
- Li, W., Hua, T., Zhou, Q., Zhang, S. and Li, F. (2010a), "Treatment of stabilized landfill leachate by the combined process of coagulation/flocculation and powder activated carbon adsorption", *Desalination*, Vol. 264 No. 1–2, pp. 56–62.
- Li, W., Zhou, Q. and Hua, T. (2010b), "Removal of Organic Matter from Landfill Leachate by Advanced Oxidation Processes: A Review", *International Journal of Chemical Engineering*, Vol. 2010, pp. 1–10.
- Li, X.Z., Zhao, Q.L. and Hao, X.D. (1999), "Ammonium removal from landfill leachate by chemical precipitation", *Waste Management*, Vol. 19 No. 6, pp. 409–415.
- Lin, L. and Chan, G.Y.S. (2007), "Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment", *Waste Management*, Vol. 27, pp. 1376–1382.

- Lin, S.H. and Kiang, C.D. (2003), "Combined physical, chemical and biological treatments of wastewater containing organics from a semiconductor plant", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 97 No. 1–3, pp. 159–171.
- Lin, T., Lu, Z. and Chen, W. (2015), "Interaction mechanisms of humic acid combined with calcium ions on membrane fouling at different conditions in an ultrafiltration system", *Desalination*, Vol. 357, pp. 26–35.
- Lind, S. and Nordh, M. (2004), "Ammonium removal from landfill leachate by use of ashes", TRITA-LWR Master Thesis, KTH Land and Water Resources Engineering.
- Liu, G., Fernandez, A. and Cai, Y. (2011), "Complexation of arsenite with humic acid in the presence of ferric iron", *Environmental Science and Technology*, Vol. 45 No. 8, pp. 3210–3216.
- MacDonald, Thomas R., "Solid Waste Management", Salem Press Encyclopedia of Science, Janeiro, 2016.
- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.Y. and Bhattacharya, P. (2014), "Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review", *Energy*, Vol. 78, pp. 104–113.
- Marchin, T. de, Ercicum, M. and Franck, F. (2015), "Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO₂ in Belgium", *Journal of Biotechnology*, Vol. 215, pp. 2–12.
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E. and Georgakakis, D. (2013), "Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*", *Energies*, Vol. 6 No. 8, pp. 3937–3950.
- Markou, G., Chatzipavlidis, I. and Georgakakis, D. (2012), "Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in olive-oil mill wastewater treated with sodium hypochlorite", *Bioresource Technology*, Vol. 112, pp. 234–241.
- Martin, D.P., Seiter, J.M., Lafferty, B.J. and Bednar, A.J. (2017), "Exploring the ability of cations to facilitate binding between inorganic oxyanions and humic acid", *Chemosphere*, Vol. 166, pp. 192–196.
- Martín Juárez, J., Lorenzo Hernando, A., Muñoz Torre, R., Blanco Lanza, S. and Bolado Rodríguez, S. (2016), "Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment", *Bioresource Technology*, Vol. 218, pp. 265–271.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010), "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14 No. 1, pp. 217–232.

- McKendry, P. (2002), "Energy production from biomass (part 1): overview of biomass", Vol. 83 No. July 2001, pp. 37–46.
- Melo, B.A.G., Motta, F.L. and Santana, M.H.A. (2015), "Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments", *Materials Science and Engineering C*, Vol. 62, pp. 967–974.
- Metcalf and Eddy. (2003), "Wastewater Engineering: Treatment and Reuse", 4th Edition, McGraw-Hill, New York.
- Milano, J., Ong, H.C., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Lam, M.K., Loh, P.K. and Vellayan, V. (2016), "Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 58, pp. 180–197.
- Miller, G.L. (1959), "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry*, Vol. 31 No. 3, pp. 426–428.
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C. and Gouveia, L. (2012), "Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 96 No. 2, pp. 555–564.
- Misra, M.K., Ragland, K.W. and Baker, A.J. (1993), "Wood ash composition as a function of furnace temperature", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 4 No. 2, pp. 103–116.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Eghtesadi, R. and Nejad, A.S. (2012), "Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 39, pp. 449–453.
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L. and Malcata, F.X. (2009), "Use of the microalga *Scenedesmus obliquus* to remove cadmium cations from aqueous solutions", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25 No. 9, pp. 1573–1578.
- Mor, S., Ravindra, K., Dahiya, R.P. and Chandra, A. (2006), "Leachate Characterization and Assessment of Groundwater Pollution Near Municipal Solid Waste Landfill Site".
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S. and Raghavan, G.S.V. (2017), "Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 76 No. March, pp. 493–506.
- Mutanda, T., Karthikeyan, S. and Bux, F. (2011), "The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 164 No. 7, pp. 1126–1138.
- Naik, S.N., Goud, V. V., Rout, P.K. and Dalai, A.K. (2010), "Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14 No. 2, pp. 578–597.

- Naveen, B.P., Mahapatra, D.M., Sitharam, T.G., Sivapullaiah, P.V. and Ramachandra, T.V. (2017), "Physico-chemical and biological characterization of urban municipal landfill leachate", *Environmental Pollution*, Vol. 220, pp. 1–12.
- Nunes, L.J.R., Matias, J.C.O. and Catalão, J.P.S. (2016), "Biomass combustion systems: A review on the physical and chemical properties of the ashes", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 53, pp. 235–242.
- OECD/IEA, F. (2017), How2Guide for Bioenergy Roadmap Development and Implementation.
- Olanders, B. and Steenari, B.-M. (1995), "Characterization of ashes from wood and straw", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 8 No. 2, pp. 105–115.
- Oloibiri, V., Ufomba, I., Chys, M., Audenaert, W.T.M., Demeestere, K. and Hulle, S.W.H. Van. (2015), "A comparative study on the efficiency of ozonation and coagulation – flocculation as pretreatment to activated carbon adsorption of biologically stabilized landfill leachate", *Waste Management*, Vol. 43, pp. 335–342.
- Otal, E., Vilches, L.F., Moreno, N., Querol, X., Vale, J. and Fernández-Pereira, C. (2005), "Application of zeolitised coal fly ashes to the depuration of liquid wastes", *Fuel*, Vol. 84, pp. 1440–1446.
- Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S. and Schneider, R.C.S. (2015), "Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation", *Journal of Environmental Science and Health. Part A*, Vol. 50 No. 6, pp. 585–601.
- Palma, L.D., Ferrantelli, P., Merli, C. and Petrucci, E. (2002), "Treatment of industrial landfill leachate by means of evaporation and reverse osmosis", *Waste Management*, Vol. 22 No. 8, pp. 951–955.
- Panno, S. V, Hackley, K., Hwang, H.H., Greenberg, S., Krapac, I.G., Landsberger, S. and O’Kelly, D.J. (2002), "Source Identification of Sodium and Chloride Contamination in Natural Waters: Preliminary Results", Illinois Groundwater Consortium, pp. 1–25.
- Paskuliakova, A., Tonry, S. and Touzet, N. (2016), "Phycoremediation of landfill leachate with chlorophytes: Phosphate a limiting factor on ammonia nitrogen removal", *Water Research*, Elsevier Ltd, Vol. 99, pp. 180–187.
- Peters, T.A. (1998), "Purification of landfill leachate with reverse osmosis and nanofiltration", *Desalination*, Vol. 119, pp. 289–293.
- Piana, M.J. and Zahir, K.O. (2000), "Investigation of metal ions binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy", *Journal of Environmental Science and Health. Part. B*, Vol. 35 No. 1, pp. 87–102.

- Pohndorf, R.S., Camara, Á.S., Larrosa, A.P.Q., Pinheiro, C.P., Strieder, M.M. and Pinto, L.A.A. (2016), "Production of lipids from microalgae *Spirulina* sp.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 93, pp. 25–32.
- Pragya, N., Pandey, K.K. and Sahoo, P.K. (2013), "A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 24, pp. 159–171.
- Priyadarshani, I. and Rath, B. (2012), "Commercial and industrial applications of micro algae – A review", *Journal of Algal Biomass Utilization*, Vol. 3 No. 4, pp. 89–100.
- Quan, X., Ye, C., Xiong, Y., Xiang, J. and Wang, F. (2010), "Simultaneous removal of ammonia, P and COD from anaerobically digested piggery wastewater using an integrated process of chemical precipitation and air stripping", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 178 No. 1–3, pp. 326–332.
- Razack, A. and Surendhiran, D. (2016), "Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production : A comprehensive review", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 66, pp. 248–267.
- Reimann, C., Tore, R., Andersson, M., Arnoldussen, A., Koller, F. and Englmaier, P. (2008), "Element levels in birch and spruce wood ashes — green energy?", *Science of the Total Environment*, Vol. 393, pp. 191-197.
- Ren, T. (2014), "Primary Factors Affecting Growth of Microalgae Optimal Light Exposure Duration and Frequency", Iowa State University.
- REN21. (2016), *Renewables 2016 Global Status Report* (Paris: REN21 Secretariat).
- REN21. (2017), *Renewables 2017 - Global Status Report*.
- Renou, S., Givaudan, J.G., Poulain, S., Dirassouyan, F. and Moulin, P. (2008a), "Landfill leachate treatment : Review and opportunity", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 150, pp. 468–493.
- Renou, S., Poulain, S., Givaudan, J.G. and Moulin, P. (2008b), "Treatment process adapted to stabilized leachates : Lime precipitation – prefiltration – reverse osmosis", *Journal of Membrane Science*, Vol. 313, pp. 9–22.
- Renou, S., Poulain, S., Givaudan, J.G. and Moulin, P. (2009), "Amelioration of ultrafiltration process by lime treatment : Case of landfill leachate", *Desalination*, Vol. 249, pp. 72–82.
- Richards, R.G. and Mullins, B.J. (2013), "Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate", *Ecological Modelling*, Vol. 249, pp. 59–67.

- Ricordel, C. and Djelal, H. (2014), "Treatment of landfill leachate with high proportion of refractory materials by electrocoagulation: System performances and sludge settling characteristics", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Vol. 2 No. 3, pp. 1551–1557.
- Sabah, E. and Ouki, S. (2017), "Sepiolite and sepiolite-bound humic acid interactions in alkaline media and the mechanism of the formation of sepiolite-humic acid complexes", *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 162, pp. 69–80.
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F.M., Marchettini, N. and Bastianoni, S. (2016), "Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 66, pp. 221–227.
- Sandoval R., M.A., Flores E., M.F., Narváez C., R.A. and López-Villada, J. (2015), "Phototrophic culture of *Chlorella* sp. using charcoal ash as an inorganic nutrient source", *Algal Research*, Vol. 11, pp. 368–374.
- Savaliya, M.L., Dhorajiya, B.D. and Dholakiya, B.Z. (2015), "Recent Advancement in Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources: A Review", *Research on Chemical Intermediates*, Vol. 41.
- Sharrer, M.J., Rishel, K. and Summerfelt, S. (2009), "Evaluation of geotextile filtration applying coagulant and flocculant amendments for aquaculture biosolids dewatering and phosphorus removal", *Aquacultural Engineering*, Vol. 40 No. 1, pp. 1–10.
- Shelef, G. and Sukenik, A. and Green, M. (1984), "Microalgae Harvesting and Processing : A Literature Review", Technion Research Development Foundation Ltd.
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S. and Zamani, M. (2017), "Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture", *Fuel*, Vol. 200, pp. 380–386.
- Show, K.Y., Lee, D-J. and Mujumdar, A.S. (2015), "Advances and Challenges on Algae Harvesting and Drying", *Drying Technology*, Vol. 33 No. 4, pp. 386–394.
- Slack, R.J., Gronow, J.R. and Voulvoulis, N. (2005), "Household hazardous waste in municipal landfills : contaminants in leachate", *Science of the Total Environment*, Vol. 337, pp. 119–137.
- Smol, M., Kulczycka, J., Henclik, A. and Gorazda, K. (2015), "The possible use of sewage sludge ash (SSA) in the construction industry as a way towards a circular economy", *Journal of Cleaner Production*, Vol. 95, pp. 45–54.
- Sundman, A., Karlsson, T., Sjöberg, S. and Persson, P. (2014), "Complexation and precipitation reactions in the ternary As(V)-Fe(III)-OM (organic matter) system", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 145, pp. 297–314.

- Tabrizi, G.B. and Mehrvar, M. (2004), "Integration of advanced oxidation technologies and biological processes: recent developments, trends, and advances", *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, Vol. 39 No. 11–12, pp. 3029–3081.
- Thiansathit, W., Keener, T.C., Khang, S., Ratpukdi, T. and Hovichitr, P. (2015), "The kinetics of *Scenedesmus obliquus* microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 76, pp. 79–85.
- Tipping, E., Rey-Castro, C., Bryan, S.E. and Hamilton-Taylor, J. (2002), "Al(III) and Fe(III) binding by humic substances in freshwaters and implications for trace metal speciation", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 66 No. 18, pp. 3211–3224.
- Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M.K. and Hoadley, A.F.A. (2011), "A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 174 No. 1, pp. 249–257.
- Ueno, Y., Kurano, N. and Miyachi, S. (1998), "Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 86 No. 1, pp. 38–43.
- Umamaheswaran, K. and Batra, V.S. (2008), "Physico-chemical characterisation of Indian biomass ashes", *Fuel*, Vol. 87, pp. 628–638.
- UNCTAD. (2016), *Second Generation Biofuel Markets: State of Play, Trade and Developing Country Perspectives*.
- Vaz, B. da S., Moreira, J.B., Morais, M.G. de and Costa, J.A.V. (2016), "Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements", *Current Opinion in Food Science*, Vol. 7, pp. 73–77.
- Venkatesan, G. and Swaminathan, G. (2009), "Review of chloride and sulphate attenuation in ground water nearby solid-waste landfill sites", *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, Vol. 17 No. 1, pp. 1–7.
- Voloshin, R.A., Rodionova, M. V., Zharmukhamedov, S.K., Nejat Veziroglu, T. and Allakhverdiev, S.I. (2016), "Review: Biofuel production from plant and algal biomass", *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 41 No. 39, pp. 17257–17273.
- Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinnegris, D., Bosma, R. and Wijffels, R.H. (2004), "Microalgae: the green gold of the future?", Wageningenur.
- Wang, L., Shahbazi, A. and Hanna, M.A. (2011), "Characterization of corn stover, distiller grains and cattle manure for thermochemical conversion", *Biomass and Bioenergy*, Vol. 35 No. 1, pp. 171–178.

- Wang, L.K., Vaccari, D.A., Li, Y. and Shamas, N.K. (1990), *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3: Physicochemical Treatment Process*, The Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Wang, Y., Ho, S., Cheng, C., Guo, W., Nagarajan, D., Ren, N., Lee, D., et al. (2016), "Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment", *Bioresource Technology*, Vol. 222, pp. 485–497.
- WHO. (2016), *Global Report on Urban Health: Equitable, Healthier Cities for Sustainable Development.*, disponível em: http://www.who.int/kobe_centre/publications/en/ (acedido em 19/04/2017).
- Williams, P.T. (2005), *Waste Treatment and Disposal 2nd Edition*, John Wiley and Sons Ltd.
- Worrell, W.A. and Vesilind, P.A. (2012), *Solid Waste Engineering*, Cengage Learning.
- Wu, D., Chu, S., Lai, C., Mo, Q., Jacobs, D.F., Chen, X. and Zeng, S. (2017), "Application rate and plant species affect the ecological safety of sewage sludge as a landscape soil amendment", *Urban Forestry & Urban Greening*.
- Xirokostas, N., Korkolis, A., Diamantopoulou, L., Zarkathoula, T. and Moutsatsou, A. (2003), "Characterisation of Metal Retention Agents and Study of Their Application in Liquid Wastes", *Global Nest: the International Journal*, Vol. 5 No. 1, pp. 29–37.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. and Takriff, M.S. (2014), "An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture", *Journal of Biological Research*, Vol. 21 No. 6, pp. 1–11.
- Yan, M., Benedetti, M.F. and Korshin, G. V. (2013), "Study of iron and aluminum binding to Suwannee River fulvic acid using absorbance and fluorescence spectroscopy: Comparison of data interpretation based on NICA-Donnan and Stockholm humic models", *Water Research*, Vol. 47 No. 14, pp. 5439–5446.
- Yao, X., Xu, K., Yan, F. and Liang, Y. (2017), "The Influence of Ashing Temperature on Ash Fouling and Slagging Characteristics during Combustion of Biomass Fuels", *Bioresources*, Vol. 12 No. 1, pp. 1593–1610.
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. and Faruq, G. (2017), "Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 71, pp. 475–501.
- Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R. and McHenry, M.P. (2016), "Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review", *Journal of Environmental Management*, Vol. 181, pp. 817-831.
- Zhang, T., Ding, L. and Ren, H. (2009), "Pretreatment of ammonium removal from landfill leachate by chemical precipitation", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 166, pp. 911–915.

Zhang, Y., Sun, Q., Zhou, J., Masunaga, S. and Ma, F. (2015), "Reduction in toxicity of wastewater from three wastewater treatment plants to alga (*Scenedesmus obliquus*) in northeast China", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 119, pp. 132–139.

Zhao, X., Zhou, Y., Huang, S., Qiu, D., Schideman, L., Chai, X. and Zhao, Y. (2014), "Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production", *Bioresource Technology*, Vol. 156, pp. 322–328.

Zhu, L.D. and Hiltunen, E. (2016), "Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 54, pp. 1285–1290.