

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Imobilização de microalgas em polímeros orgânicos e
inorgânico para remoção de nutrientes**

TESE DE DOUTORADO

Brunna Samuel de Carvalho Barcellos

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Imobilização de microalgas em polímeros orgânicos e inorgânico para remoção de nutrientes

Brunna Samuel de Carvalho Barcellos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Mariliz Gutterres Soares, Dr.^a

Porto Alegre, 27 de março de 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado Imobilização de microalgas em polímeros orgânicos e inorgânico para remoção de nutrientes, elaborado por Brunna Samuel de Carvalho Barcellos, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – PPGEQ

Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – PPGE3M

Prof.^a Dr.^a Joyce Cristina Gonçalves Roth

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Prof.^a Dr.^a Aline de Cássia Campos Pena

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, minha família pelo apoio em toda essa longa jornada, me incentivando nos momentos de dúvida e dizendo que sou capaz.

Ao meu marido, Luiz Gustavo, por todo carinho, amor e compreensão. Obrigada pelo incentivo e apoio em concluir essa etapa.

Agradeço imensamente à minha orientadora professora Mariliz Gutterres pela orientação, pelo incentivo e paciência nessa longa jornada. Obrigada pela oportunidade de aprendizado e pelo exemplo de pessoa e dedicação à profissão.

Ao Professor João Henrique Zimnoch dos Santos da UFRGS e aos Professores da University of New South Wales (UNSW), Rita Henderson, Richard Stuetz e Bojan Tamburic pela orientação, pelos ensinamentos e confiança.

Aos colegas e amigos do LACOURO agradeço por estarem sempre lá, por serem amigos e colegas de trabalho.

À CAPES pelo projeto MIDAS pelo financiamento desta pesquisa.

Resumo

A população mundial tem crescido nas últimas décadas, exigindo mais alimentos, produtos e outros bens de consumo. Como resultado, as indústrias têm gerado mais efluentes com altas concentrações de contaminantes químicos e biológicos. Os efluentes, dependendo do tipo de indústria, podem conter altas concentrações de nutrientes como compostos nitrogenados e fosforados. O tratamento inadequado desses efluentes pode aumentar os níveis de nitrogênio e fósforo nos corpos hídricos, causando um fenômeno chamado eutrofização. Por isso, o tratamento de efluente por microalgas tem mostrado resultados promissores, devido às microalgas absorverem esses nutrientes para sua sobrevivência. Um exemplo de indústria que gera alto volume de efluentes contendo compostos nitrogenados é a indústria do couro (curtumes), devido ao alto consumo de água, produtos químicos e pele bovina a ser processada. No entanto, para o tratamento de efluentes por microalgas, a colheita das microalgas é necessária, o que limita sua aplicação. A imobilização de microalgas em polímeros pode ser uma boa alternativa para aplicação no tratamento de efluentes facilitando a colheita das mesmas. Por isso, o objetivo deste estudo é avaliar o uso de biopolímeros e polímero inorgânico para imobilização de microalgas, o crescimento e viabilidade das microalgas imobilizadas, e avaliar a remoção de nutrientes presentes em efluentes. No primeiro estudo, as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. foram imobilizadas, em diferentes concentrações, em polímero inorgânico, sílica sol-gel e o álcool gerado pela síntese foi eliminado por evaporação. As microalgas foram cultivadas por 72 h para posterior emprego em efluentes de ribeira do processamento do couro e foi avaliada remoção de nitrogênio e carbono. Os resultados mostraram que para microalgas imobilizadas, a melhor remoção de carbono orgânico foi de 65% para *Chlorella* sp. e 53% para *Scenedesmus* sp. Em um segundo estudo, *Chlorella vulgaris*, em três diferentes concentrações iniciais, C1, C2 e C3, foi imobilizada em um biopolímero, alginato de cálcio, para avaliar a concentração de microalgas, a intensidade de fluorescência da clorofila e a remoção de nutrientes em comparação com microalgas suspensas. Na concentração inicial de *C. vulgaris* imobilizada C3 de $2,95.10^7 \pm 9,81.10^5$ cell.mL⁻¹, cresceu de forma semelhante às microalgas suspensas. Já a intensidade da clorofila foi maior para C2, $1,75.10^6 \pm 5,09.10^5$ cell.mL⁻¹. A remoção de nutrientes para microalgas imobilizadas, nas concentrações C2 e C3, foi maior do que para microalgas suspensas nos primeiros 3 dias de experimento. Ao final do experimento, após 7 dias, a remoção foi de 100% de nitrato e 96% de fosfato para C3. O último estudo investigou a microalga imobilizada em uma mistura de biopolímeros, alginato (A) mais pectina (PECT) ou carboximetilcelulose (CMC) em diferentes concentrações, avaliando a viabilidade celular e a remoção de nutrientes. A concentração de alginato foi de 2,0 %, e os aditivos Pectina e CMC variaram de 1,0 %, 1,5 % e 2,0 %. As microalgas em APECT 1,0% cresceram mais de 25% em comparação com as microalgas imobilizadas apenas em alginato (A). O menor crescimento da *C. vulgaris* foi para APECT 2,0%. A remoção foi efetiva com a mistura de biopolímeros, APECT e ACMC nas concentrações 1,0% e 2,0%. Para fosfato, a maior remoção foi de 95% para ACMC 2,0% e 86% para APECT 2,0%. Para nitrato foi removido 100% em microalga em ACMC 1,0% e 1,5 e em APECT 1,0% foi de 98%.

Abstract

The population has grown in recent decades, demanding more food, products and other consumables. As a result, industries have generated more effluent and wastewater that contain a high concentration of chemical and biological contaminants. Inadequate treatment of wastewater can increase levels of nitrogen and phosphorus in the water systems, causing a phenomenon called eutrophication. The wastewater, depending on the type of industry, contains high concentrations of nutrients such as nitrogenated compounds. Therefore, wastewater treated by microalgae has shown promising results. An example of an industry that generates a high volume of wastewater is from the tannery industry due to requires high consumption of water and chemicals in the process. However, after treatment, harvesting microalgae is required, and their application is limited. The immobilisation of microalgae in polymers can be a good alternative for application in wastewater treatment to remove pollutants and help harvest microalgae. For that reason, this study aims to evaluate the use of organic and inorganic polymers for microalgae immobilisation, the microalgae growth and viability of immobilised microalgae, and to evaluate the removal of nutrients present in wastewater. In the first study, *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. microalgae were immobilised, in different initial concentrations, in an inorganic polymer, silica sol-gel which the alcohol generated by the synthesis was eliminated by evaporation, cultivated for 72h in beamhouse wastewater evaluating nutrients removal, nitrogen and carbon. The results showed that for immobilised microalgae, the best removal was 65% for *Chlorella* sp. and 53% for *Scenedesmus* sp. for inorganic carbon. However, the removal rate for total organic carbon and total nitrogen was higher for *Chlorella* sp. in suspension. In addition, the immobilised *Scenedesmus* sp. showed higher removal rates for total nitrogen, ammonium nitrogen and inorganic carbon. In a second study, *Chlorella vulgaris*, in different initial concentrations, was immobilised in an organic polymer, calcium alginate, to evaluate microalgae growth and the removal of nutrients compared to suspended microalgae. The initial concentration of immobilised *C. vulgaris* $2.95 \cdot 10^7 \pm 9.81 \cdot 10^5$ cell.mL⁻¹, C3, grew similarly to suspended microalgae. However, chlorophyll intensity was more intense for C2, $1.75 \cdot 10^6 \pm 5.09 \cdot 10^5$ cell.mL⁻¹. The removal of nutrients for immobilised microalgae, C2 and C3 concentrations, was higher than suspended microalgae in the first 3 days of the experiment. At the end of the experiment, after 7 days, the total removal was 100% nitrate and 96% phosphate for C3. The last study investigated the microalgae immobilised in a mixture of polymers, alginate (A) plus pectin (PECT) or carboxymethyl cellulose (CMC), in different concentrations, assessing cell viability and nutrient removal. The alginate concentration was 2.0 %, and the additives varied of 1.0 %, 1.5 % and 2.0 %. *C. vulgaris* in APECT 1.0% grew over 25% compared to microalgae immobilised in alginate only (A). The lowest microalgae growth was for APECT (2.0%). The removal was effective with the blend of biopolymers, APECT e ACMC at a concentration of 1,0% e 2,0%. For phosphate, the highest removal of immobilised microalgae was 95% for ACMC 2.0% and 86% for APECT 2.0%. For nitrate, the microalgae in ACMC 1.0% and 1.5% removed 100%, and in APECT 1.0% was 98%.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	4
1.2. Estrutura do trabalho.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	7
2.1. Microalgas	7
2.1.1. Metabolismo.....	9
2.1.2. Efluentes tratados por microalgas	15
2.1.3. Colheita das microalgas.....	20
2.2. Imobilização celular em biopolímeros	21
2.3. Biopolímeros para imobilização	24
2.3.1. Alginato	24
2.3.2. Mistura de biopolímeros com alginato.....	31
2.4. Imobilização celular em polímero inorgânico.....	40
2.4.1. Sílica em sol-gel.....	41
2.4.2. Metodologia de sol-gel por evaporação do álcool gerado.....	44
2.5. Efluentes industriais	48
2.6. Efluentes de curtume.....	50
2.6.1. Tratamento de efluentes de curtume	52
2.6.2. Recentes pesquisas para o tratamento de efluentes de curtume	53
3. Carbon and Nitrogen Removal by <i>Chlorella</i> sp. and <i>Scenedesmus</i> sp. suspended and immobilised in Silica Gel Non-Toxic in Leather Processing Wastewater	55
4. Growth of <i>Chlorella Vulgaris</i> Immobilised in Calcium Alginate accomplished by cell concentration and chlorophyll.....	57
5. Microalgae Immobilisation Using Biopolymer Blend-Modified Alginate Beads in Wastewater Treatment Applications	59
6. Conclusões.....	61
6.1. Sugestões de trabalhos futuros	63
Referências Bibliográficas.....	65

Lista Figuras

Figura 1.1. Forma esquemática dos três artigos que compõe a tese.	6
Figura 2.1. Métodos de imobilização. Fonte: Cassidy <i>et al.</i> (1996).	22
Figura 2.2. Conformação das cadeias de alginato (Wijffels, 2001).	25
Figura 2.3. Formação de esperas de alginato com microalgas por extrusão.	27
Figura 2.4. Estrutura química celulose (esquerda) e CMC (direita).	36
Figura 2.5. Estrutura química alginato de sódio (a) e CMC sódico (b) (Dewangan; Tiwari; Bajpai, 2011).	37
Figura 2.6. Estrutura química alginato (esquerda) e pectina (direita).	38
Figura 2.7. Vantagens e aplicações de imobilização de células em matriz inorgânica aplicação. Fonte: Holzmeister <i>et al.</i> , (2018) (adaptado).	40
Figura 2.8. Processo de síntese do sol-gel.	42
Figura 2.9. Métodos de matriz sol-gel biocompatíveis com microrganismos.	43
Figura 2.10. Metodologia de sol-gel por evaporação do álcool gerado.	45

Lista Tabelas

Tabela 2.1. Tratamento de diferentes tipos de efluente com microalgas	15
Tabela 2.2. Proporção dos blocos (MM, GG, MG/GM) de alginato extraído de espécies de alga marinha marrom.	25
Tabela 2.3. Comparativo da eficiência de remoção de nutrientes em diferentes efluentes por diferentes microalgas imobilizadas.	30
Tabela 2.4. Aplicação de mistura de biopolímeros.	33
Tabela 2.5. Comparação de estudos com aplicação de sol-gel em microalgas	47
Tabela 2.6. Recentes estudos do grupo de pesquisa LACOURO para remoção de contaminantes do efluente de curtume.	54

Lista Quadros

Quadro 2.1. Assimilação de nutrientes pelas microalgas.....	12
Quadro 2.2. Mecanismo de gelificação para encapsulamento celular	23
Quadro 2.3. Critérios para um sistema viável com microalgas imobilizadas e propriedades para uma matriz ideal para imobilização.	24
Quadro 2.4. Fonte e propriedades dos biopolímeros.....	34

Lista de abreviaturas

A	Alginato
ATP	Adenosina trifosfato
Chl	<i>Chlorella vulgaris</i>
CI/IC	Carbono inorgânico/ <i>inorganic carbon</i>
CMC	Carboximetilcelulose
COT/ TOC	Carbono organico total/ <i>total organic carbon</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de oxigênio
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EEM	<i>Excitation-emission matrix</i> /matriz excitação-emissão
FT	Fósforo total
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
G	Gulurônicos
HPLC	Cromatografia liquida de alta eficiência
JM	<i>Jaworski's Medium</i>
M	Manurônicos
MEV/SEM	Microscopia eletrônica de varredura/ <i>Scanning electron microscopy</i>
NA/AN	Nitrogenio amonical/ <i>amoniactal nitrogen</i>
NT/ TN	Nitrogenio total/ <i>total nitrogen</i>
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
PECT	Pectina
PVA	Acetato de polivinila
PVC	<i>Polivinil chloride</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
Sc	<i>Scenedesmus sp.</i>
SDT	Sólidos dissolvidos totais
TEOS	Tetraetoxissilano
TMOS	Tetrametoxissilano

Capítulo 1

Introdução

Um dos grandes problemas da atualidade é a contaminação de rios e lagos, dificultando os processos de tratamentos de água, necessários para se atingir os níveis e potabilidade exigidos pela legislação. Devido aos tratamentos limitados ou ausência de tratamento para remoção de contaminantes de efluentes industriais, os corpos hídricos estão cada vez mais poluídos por excesso de nutrientes, matéria orgânica e compostos químicos.

Estima-se que 80% dos efluentes gerados são lançados em corpos hídricos sem nenhum tipo de tratamento prévio. Isso acaba impactando negativamente ecossistemas de rios e lagos prejudicando a qualidade ambiental dos ambientes aquáticos além de problemas de saúde devido a elevação dos níveis de poluição e contaminação dos recursos hídricos (WWAP, 2017).

A remoção de nitrogênio em efluentes industriais tem sido um problema devido à toxicidade da amônia para espécies aquáticas, e ao nitrato, que apesar de ser a forma mais estável de nitrogênio, também pode causar danos ao meio ambiente quando em excesso. Estes excessos de formas de nitrogênio, juntamente com o fósforo, são responsáveis pela eutrofização de rios e lagos, causando sérios danos aos animais aquáticos e à saúde humana (Soller *et al.*, 2003).

Igualmente, o processamento do couro também gera um efluente potencialmente prejudicial a qualidade dos recursos hídricos. Isso se deve as várias operações químicas e mecânicas que transformam a pele crua de animais em material acabado e produtos comerciais utilizando um grande volume e, também, excedentes de produtos químicos orgânicos e inorgânicos. Este processamento constitui-se de um conjunto de etapas que são agrupadas nas

operações de ribeira, curtimento e acabamento. Dentre estas etapas, as que consomem mais água e geram mais matéria orgânica residual são as de ribeira, cujos efluentes contêm altas concentrações de nitrogênio. É estimado que 70% do efluente total do processamento de couro é proveniente das operações de ribeira, que pode atingir concentrações de 3800 mg.L⁻¹ de amônia, 20.000 mg.L⁻¹ de DBO e 30.000 mg.L⁻¹ de cloretos e pH (Gutterres *et al.*, 2015).

Os tratamentos convencionais de efluentes para remoção de nitrogênio são baseados em processos biológicos de nitrificação e desnitrificação. Porém, esses tipos de tratamentos dificilmente chegam aos limites de concentração exigidos pelas agências reguladoras para lançamentos de efluentes (Zhu *et al.*, 2008). Os microrganismos envolvidos na depuração enfrentam dificuldades para chegarem a melhor eficiência. As bactérias envolvidas no tratamento biológico são sensíveis a mudanças de temperatura, pH e presença de outros compostos no efluente a ser tratado, excesso de amônia e metais tóxicos. Além disso, o sistema demanda espaço físico para os tanques necessários para esse tratamento (Khuntia; Majumder; Ghosh, 2013).

As microalgas vêm se mostrando uma boa alternativa para remoção de nutrientes orgânicos como nitrogênio e fósforo, que os empregam no seu metabolismo. E além de tratar efluentes, elas produzem a própria biomassa, que pode ser utilizada como fertilizante para geração de biocombustíveis e para a indústria de alimentos (de-Bashan; Bashan, 2004; Ruiz-Martinez *et al.*, 2012).

Para tratamento de efluentes de curtumes, as microalgas apresentaram resultado satisfatório, removendo até 100% de amônia em tratamento de efluente bruto (efluente de todas as etapas do processamento do couro) e 85% para efluente da etapa de ribeira (Pena *et al.*, 2020; Tolfo *et al.*, 2015). Porém, após o tratamento, é necessário que a microalga seja coletada dos tanques. Estima-se que o custo envolvido na colheita das microalgas esteja na faixa de 25%-60% de um sistema de produção de microalgas (Lardon *et al.*, 2009). Além disso, as células de microalgas são de proporções micrométricas, fazendo-se necessário o uso de coagulantes/floculantes para remoção das mesmas, aumentando o volume de lodo a ser descartado (Christenson; Sims, 2011).

A imobilização celular apresenta-se como uma solução ao desafio econômico que a colheita das microalgas representa e já vem sendo utilizada pela indústria farmacêutica e alimentícia por muitos anos (Hassan *et al.*, 2019). As matrizes poliméricas imobilizadoras mais

utilizadas para microalgas são a base de alginato e outros biopolímeros, não existindo muitos estudos com polímeros inorgânicos.

O biopolímero (polímero orgânico) mais comum utilizado para imobilização de microalgas é o alginato, que apresenta limitações ao seu uso como dissolução, mudança de formato e entre outras (Moreno-Garrido, 2008; Wijffels, 2001). Outros biopolímeros como celulose, polivinil acrílico, pectina, agar-agar também são utilizados para imobilização e apresentam limitações (Vasilieva *et al.*, 2016; Wijffels, 2001). Para aplicação em efluentes é necessário que a matriz seja resistente para que não ocorra dissolução ou ruptura da imobilização. A mistura de biopolímeros ou o uso de polímero inorgânico como a sílica pode melhorar a viabilidade do uso em efluentes.

Os estudos encontrados na literatura mostram o crescimento de microalgas por contagem de células para verificar o crescimento das mesmas. Contudo, a relação da viabilidade das células com remoção de nutrientes e crescimento das microalgas ainda não foi bem explorada pela literatura. Uma metodologia que pode mostrar a viabilidade das células em imobilizações em matrizes poliméricas é por clorofila fluorescência. O método mais comum é por espectroscopia de fluorescência, fluorômetros e HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, que requer a extração da clorofila por solvente, se tornando um método invasivo. Já com a medição em espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão não é necessária a extração da clorofila por solvente, assim as amostras podem ser medidas *in vivo*.

Dentro deste contexto, o presente estudo investiga a aplicação da imobilização de microalgas, *Chlorella spp.* e *Scenedesmus sp.*, em polímero inorgânico como a sílica em sol-gel e para biopolímeros, como alginato, e misturas de alginato e com os biopolímeros, pectina e carboximetilcelulose (CMC), para a imobilização da *Chlorella vulgaris*. A proposta do estudo é o cultivo de microalgas imobilizadas nas matrizes citadas acima, avaliando a viabilidade da matriz, o crescimento das microalgas, a intensidade da clorofila fluorescência presente e a remoção de nutrientes presentes em efluentes industriais como o de curtume e em meio de cultura.

1.1. Objetivos

O presente estudo tem o objetivo de avaliar o uso de biopolímeros e polímero inorgânico para imobilização de microalgas e utilizar a microalga imobilizada para remoção de nutrientes presentes em efluentes de processamento do couro da etapa de ribeira.

Para alcançar os objetivos descritos, os objetivos específicos são:

- i. Utilizar polímero inorgânico, sílica sol-gel, para a imobilização de microalgas, *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., e testar as propriedades físicas e químicas em análises de microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e potencial zeta. Além disso, verificar a remoção de nutrientes pelas microalgas imobilizadas em sílica sol-gel cultivadas em efluentes de ribeira. Os nutrientes avaliados são nitrogênio total, carbono orgânico total e carbono inorgânico.
- ii. Avaliar o crescimento da microalga, *Chlorella vulgaris* em biopolímero, alginato de cálcio, em diferentes concentrações celulares iniciais na qual as microalgas foram coletas em diferentes tempos no início, durante e no final da fase exponencial de crescimento, analisando o comparativo entre a concentração de microalgas pelo método de contagem de células e a intensidade de clorofila, e verificar a capacidade da microalga para remoção dos nutrientes em meio de cultivo, nitrato e fosfato.
- iii. Avaliar a mistura de biopolímeros, alginato (A) e pectina (PECT) ou CMC em diferentes concentrações (1,0%, 1,5% e 2,0%) resultando nas misturas, APECT e APMC, respectivamente, para imobilizar a microalga *Chlorella vulgaris*, analisando o crescimento das mesmas em comparação com a imobilização somente em alginato, por concentração de microalgas pela análise de clorofila, e verificar a remoção dos nutrientes nitrato e fosfato quando comparados com as microalgas imobilizadas somente em alginato.

1.2. Estrutura do trabalho

Este estudo está dividido em 6 capítulos. **No Capítulo 1** é abordado o tema da tese. **No Capítulo 2** está a revisão bibliográfica sobre as microalgas, seu metabolismo para o consumo de nutrientes, tratamento de efluentes utilizando as microalgas, seguido pelo tópico da

imobilização celular em biopolímero, mistura de biopolímeros e polímeros inorgânicos, bem como as suas aplicações. Por fim é abordada a problemática dos efluentes incluindo os efluentes gerados pelos curtumes, o tratamento desses efluentes e os recentes estudos envolvendo o tema. O desenvolvimento experimental da tese é descrito e discutido na forma de artigos científicos nos Capítulos 3, 4 e 5, onde estão os materiais e métodos, resultados e discussões.

O **Capítulo 3** traz o artigo *Carbon and Nitrogen Removal by Chlorella sp. and Scenedesmus sp. suspended and immobilised in Non-Toxic Silica Gel in Leather Processing Wastewater* que está publicado no periódico *Chemistry and Ecology*. Neste artigo avaliou-se o uso de sílica sol-gel para imobilização da *Chlorella sp.* e da *Scenedesmus sp.* em rota com evaporação de álcool e foi analisada a remoção de nutrientes em efluente de ribeira. Foi analisada a estrutura da imobilização formada, a influência da concentração de microalgas e a remoção de nutrientes.

O **Capítulo 4** traz o artigo *Growth of Chlorella vulgaris immobilised in calcium alginate accomplished by cell concentration and chlorophyll* que está em revisão para periódico. Neste artigo foi comparado o crescimento das microalgas através da contagem de células e a intensidade clorofila da microalga imobilizada em alginato de cálcio e a remoção de nutrientes no cultivo. As microalgas foram imobilizadas em diferentes concentrações para avaliar as remoções comparadas com as mesmas cultivadas, não imobilizadas, em suspensão.

O **Capítulo 5** é formado pelo artigo submetido *Microalgae Immobilisation Using Biopolymer Blend-Modified Alginate Beads in Wastewater Treatment Applications* que foi aceito para publicação no periódico *Environmental Engineering Science*. Neste artigo foi investigado o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* quando imobilizada com uma mistura de biopolímeros e analisada a remoção de nutrientes no cultivo. As misturas comparadas foram alginato + pectina em 3 concentrações (1,0, 1,5 e 2,0%) e alginato + CMC em 3 concentrações (1,0, 1,5 e, 2,0%).

No **Capítulo 6** são apresentadas as principais conclusões obtidas neste trabalho considerando os objetivos iniciais propostos.

Na Figura 1.1 apresentamos, de forma esquemática, os três artigos que compõem a presente tese, onde são mostrados os diferentes agentes imobilizantes usados, as microalgas e

em qual efluente ou meio de cultivo as microalgas foram cultivadas, e a caracterização utilizada para atender o objetivo geral do estudo e objetivos específicos da tese.

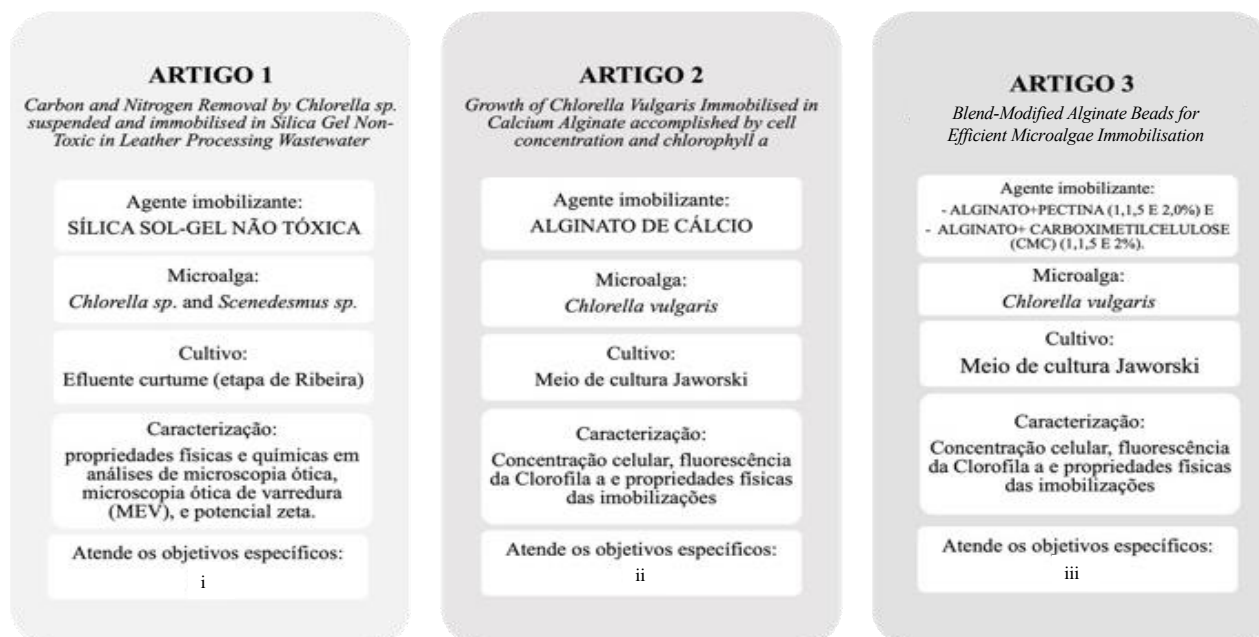


Figura 1.1. Forma esquemática dos três artigos que compõe a tese.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo são apresentados os principais tópicos aplicados neste estudo, iniciando com uma abordagem geral sobre as microalgas, metabolismo das microalgas incluindo a clorofila, a aplicação das microalgas no tratamento de efluentes, e os principais desafios para seu uso no tratamento de efluentes. Após é apresentado o conceito de imobilização celular, começando com a aplicação de biopolímeros como alginato de cálcio seguido da mistura de biopolímeros, tendo como base o alginato de cálcio e adicionando pectina ou CMC, e o uso de polímeros inorgânicos, como a sílica sol-gel, para o mesmo propósito. Por fim, é feita uma revisão teórica sobre efluentes no geral, e mais especificamente, sobre efluentes de curtume, as opções disponíveis para seu tratamento, além das recentes pesquisas envolvendo o tema.

2.1. Microalgas

Microalgas são microplânctons fotossintéticos conhecidos como a forma mais antiga de vida do planeta, estando na base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, e que também podem sobreviver em diferentes condições de ambiente. As microalgas normalmente habitam efluentes municipais, das industriais, da agricultura, de escoamento, entre outras, pois esses sistemas contém os nutrientes essenciais para sua sobrevivência (Lourenco, 2006). Existem milhares de espécies de algas que se diferenciam pela sua morfologia, como por exemplo as procarióticas (cianobactérias) e as eucarióticas, que são algas em dimensões microscópicas (Lourenco, 2006).

Estes microrganismos têm sido aplicados em substituição aos tratamentos convencionais devido à sua capacidade na remoção de macronutrientes como nitrogênio e fósforo e na produção, através da energia solar absorvida, de biomassa de alto valor. Nitrogênio e fósforo são consumidos pelas microalgas para converter carbono (orgânico e inorgânico) em lipídios e proteínas que contêm alta carga energética (Sukla; Pradhan; Subbaiah, 2019) e quando presentes em alta concentração, são conhecidos como responsáveis pela eutrofização dos rios e lagos (De; Noue ’; De Pauw, 1988; Gonçalves; Pires; Simões, 2016; Pires *et al.*, 2013).

O uso de microalgas no tratamento alternativo de efluentes foi primeiramente proposto por Oswald e Gotaas (1957) e tem sido investigado em vários estudos (Bhatt *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2022; Ting *et al.*, 2017; Vasilieva *et al.*, 2016). Os estudos vêm abordando a remoção de poluentes em efluentes e a produção de biomassa com alto valor comercial (Chiu *et al.*, 2015).

A aplicação das microalgas no tratamento de efluentes é uma boa alternativa para redução de custos, pois esses microrganismos consomem os poluentes como alimento diminuindo suas concentrações no efluente, e geram sua própria biomassa com alto valor agregado. A biomassa gerada no processo de tratamento pode ser empregada como fertilizante ou ainda ser direcionada para a indústria de alimentos ou para a extração de lipídios para biocombustível (Ruiz-Martinez *et al.*, 2012).

No entanto, quando se propõe a esses usos, é necessário selecionar a microalga que tenha as características de produção definidas. Para uma boa produção de biomassa de microalgas em efluentes, elas devem apresentar alta taxa de crescimento, alta produção de lipídeos (para produção de biocombustível), resistência a certas concentrações de poluentes como íons metálicos e alguns componentes tóxicos (Christenson; Sims, 2011).

A eficiência de remoção de poluentes pelas microalgas está relacionada a fatores como a concentração inicial de microalgas, a estirpe de microalga, as condições de cultivo e de crescimento, as taxas de consumo de nitrogênio e fósforo, as fontes dos nutrientes e as características dos efluentes (Abdel-Raouf; Al-Homaidan; Ibraheem, 2012; Xin *et al.*, 2010). Apesar de mostrar muitas vantagens em seu uso, a aplicação de microalgas ainda não é economicamente viável, pois a etapa de colheita que representa de 25-60% da produção das microalgas (Lardon *et al.*, 2009) e é caracterizada, em geral, por duas etapas: química (coagulação/floculação) e mecânica (filtração ou centrifugação) (Barros *et al.*, 2015). Um dos

métodos de colheita é através de tratamento com uso de agentes de coagulação, o que envolve consumo de energia, e que ainda geram alto volume de lodo a ser descartado em aterros (Udom *et al.*, 2013).

O principal desafio da colheita na aplicação na indústria é o tamanho da célula da microalga. A alga eucariótica tem o tamanho entre 3 – 30 μm , e a cianobactéria é menor e mede 0.2 – 2 μm . Por essa razão seu uso na indústria ainda é restrito. O desafio é reduzir os custos de colheita, e para isso, a obtenção de bioprodutos, como fertilizante e meio de absorção de metais pesados ou corante, pode ser uma solução.

2.1.1. Metabolismo

O metabolismo das microalgas envolve o consumo dos nutrientes disponíveis no ambiente, os quais são convertidos em compostos para o seu crescimento, reprodução e proteção de outros organismos. As microalgas possuem diferentes classificações, de acordo com a espécie e o meio em que vivem. As microalgas autotróficas são microrganismos fotossintéticos que necessitam de componentes inorgânicos como CO_2 , iluminação e sais para o seu crescimento. Já as microalgas heterotróficas necessitam de componentes orgânicos e nutrientes, sendo essa espécie não fotossintética. Além disso, existem as microalgas mixotróficas que realizam fotossíntese e consomem com nutrientes orgânicos. As microalgas fotoautotróficas utilizam a luz como fonte energética para converter nutrientes em energia química para fotossíntese.

Contudo, as microalgas podem sobreviver em diferentes ambientes uma vez que estes microrganismos podem assumir diferentes tipos de metabolismos e são capazes de mudá-los de acordo com as condições do ambiente onde se encontram (Mata; Martins; Caetano, 2010). As condições do ambiente são cruciais para as microalgas terem um crescimento satisfatório e sobreviverem. As características do ambiente são relacionadas ao pH, à temperatura, à concentração de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo e carbono, e à intensidade de luz (Gonçalves; Pires; Simões, 2017).

O pH tem influência no crescimento da microalga e na disponibilidade dos nutrientes no ambiente. Algumas microalgas podem crescer em condições em que o pH é ácido, como é o caso dos microrganismos acidófilos. Já as alcalófilas crescem em ambiente com pH básico.

Geralmente, as microalgas têm afinidade em meios de cultivos com pH neutro (6-8). Este parâmetro é importante pois a variação drástica pode causar o rompimento da membrana celular, inibição enzimática e o transporte de proteínas nas membranas (Sinogas; Alho, 2002).

Em relação ao pH e aos nutrientes, o pH pode influenciar na solubilização e precipitação dos nutrientes no meio ambiente. Como exemplo, o pH pode aumentar e causar a precipitação química de fosfato solúveis, comprometendo assim a assimilação de fósforo pelas microalgas (Larsdotter; Jansen; Dalhammar, 2007). Outro indicativo de pH elevado pode ocorrer quando as microalgas assimilam o nitrogênio em forma de amônia para o seu crescimento ou quando a amônia é volatilizada (Riaño; Molinuevo; García-González, 2011).

A temperatura do meio é um fator associado às reações enzimáticas relacionadas com o crescimento das microalgas. O aumento da temperatura pode influenciar no crescimento das microalgas. Contudo, as microalgas possuem um limite de tolerância. A variação de temperatura no cultivo de microalgas depende da sua espécie. Algumas espécies suportam temperaturas entre 16 e 27°C enquanto outras suportam temperaturas menores que 16°C. No entanto, altas temperaturas no cultivo, por volta de 35°C, podem ser prejudiciais para várias espécies (Butterwick; Heaney; Talling, 2004; Teoh *et al.*, 2004). Altas temperaturas podem causar a ruptura da membrana celular, uma vez que a dupla camada de lipídios muda devido ao aquecimento (Sinogas; Alho, 2002). A faixa de temperatura ótima para cultivo da maioria das microalgas é entre 20°C e 30 °C (Singh; Singh, 2015).

A intensidade de luz, qualidade do espectro e o fotoperíodo são também parâmetros importantes para o cultivo de microalgas, e que estão relacionados à energia da luz. Características no meio de cultivo de microalgas, como profundidade, densidade e volume podem afetar a intensidade de luz. Para microrganismos fotossintéticos, a intensidade e a exposição à luz estão diretamente relacionadas ao crescimento das microalgas, já que é a principal fonte de energia. No metabolismo das microalgas, os compostos orgânicos são produzidos pela conversão de compostos inorgânicos com energia da luz, conhecido como fotossíntese (Richmond, 2003). Em sistemas fotossintéticos, a produção de biomassa e a taxa de crescimento das microalgas são diretamente influenciadas pela fonte de energia devido à quantidade de carbono fixado. A exposição excessiva à luz pode causar a fotoinibição, que limita as microalgas de realizarem fotossíntese, causando assim a morte celular (Toninelli *et al.*, 2016).

Outro fator que influencia no crescimento das microalgas é a nutrição que é composta por macronutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo, e por micronutrientes. Os micronutrientes são usados em reações redox (por exemplo, Fe, Mn, Cu), catálise ácido-base (por exemplo, Zn, Ni), transmissão e armazenamento de informação e energia (por exemplo, K, Ca) e estruturação *crosslinking* (por exemplo, S e Si) (Borowitzka; Beardall; Raven, 2016; Zeng *et al.*, 2014). Contudo, para o metabolismo das microalgas, os macronutrientes são os que comandam os principais mecanismos metabólicos, como a síntese de proteínas, lipídios, adenosina trifosfato (ATP) e outras funções biológicas (Zeng *et al.*, 2014).

O carbono está presente em todos os compostos orgânicos e é sintetizado pelas células como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídios e outros, compondo 50% da biomassa seca das microalgas. Para o crescimento de microalgas, o carbono inorgânico, como CO₂, carbonatos e bicarbonatos, e carbono orgânicos são essenciais, assim como outros nutrientes complementares. No cultivo de microalgas, a aeração, agitação magnética, agitação contínua e bombas de ar são fontes para suprir a quantidade necessária de CO₂ no meio (Chinnasamy *et al.*, 2010; Mata; Martins; Caetano, 2010).

O nitrogênio é um elemento essencial que funciona como um catalisador intermediário do metabolismo primário. Ele atua como componente estrutural para proteínas e enzimas, ácidos nucleicos, clorofila e transporte de energia (Kube *et al.*, 2018). Os compostos de nitrogênio combinados à amônia (NH₃), ao nitrato (NO₃⁻) e ao nitrito (NO₂⁻) são as formas inorgânicas mais comuns usadas por algas eucarióticas (Borowitzka; Beardall; Raven, 2016). A concentração desses componentes essenciais não permanece constante quando há mudanças no meio. A elevação do pH pode ser um indicador de que está ocorrendo a assimilação de nitrogênio ou vaporização de amônia. Contudo, a inibição do crescimento de microalgas pode se dar pela alta concentração de NH₄⁺ no meio.

O fósforo é também um nutriente importante e necessário para o crescimento de algas eucarióticas. Ele tem a função de conduzir complexos metabólicos e dinâmica bioquímica, como a construção de elementos bioquímicos essenciais, como ácidos nucleicos e lipídios, usados como fonte de energia na sinalização e nas reações de condução (Merchant; Helmann, 2012). No metabolismo de microalgas, o fósforo é assimilado para seu crescimento. Elas têm a habilidade de armazená-lo em forma de polifosfato no caso de limitação de nutrientes. Como

consequência do crescimento de microalgas, ocorre o aumento de pH e a precipitação de fosfato no ambiente (Pires *et al.*, 2013).

Os mecanismos que envolvem as diferentes formas de macronutrientes encontrados no meio ambiente e como as microalgas assimilam esses nutrientes estão resumidos na Quadro 2.1.

Quadro 2.1. Assimilação de nutrientes pelas microalgas

Nutrientes	Mecanismos	Incorporação celular
Carbono		
CO ₂	Integração em ciclo de Calvin	Difusão (5.0<pH<7.0) ou transporte ativo (pH>7.0)
Carbono orgânico	Integração em metabolismo de respiração	Difusão ou transporte ativo (depende do tamanho de molécula)
Nitrogênio		
NO ₃ -N NO ₂ -N	Redução em amônia seguido por conversão em amino-ácidos	Transporte ativo
NH ₄ -N	Conversão direta em amino ácido	Transporte ativo
	Remoção devido à volatilização (alto pH e alta temperatura)	n.a.
Fósforo		
PO ₄ -P	Fosforilação	Transporte ativo
	Precipitação química (alto pH e concentração de oxigênio dissolvido)	n.a.

n.a. – não aplicável. Fonte: Gonçalves (2017)

2.1.1.1. Clorofila

Clorofila é um pigmento verde relacionado a organismos fotossintéticos como algas, plantas e cianobactérias. A sua principal função é a realização da fotossíntese, produz energia química a partir da absorção de luz visível. Existem 5 tipos de clorofila conhecidas *a*, *b*, *c*, *d* e *f* com estruturas moleculares similares. A estrutura da clorofila, é um tipo de porfirina, em outras palavras um pigmento, que é de uma classe de moléculas orgânicas com uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrólicos). A diferença entre as clorofilas é que alguns grupos periféricos do macrociclo emitem diferentes espectros de absorção (da Silva Ferreira; Sant'Anna, 2017).

A clorofila *a* está presente em todas as espécies de fitoplânctons como organismos eucarióticos (algas) e procarióticos (cianobactérias). É utilizada como parâmetro para determinar a produtividade e a biomassa total (Gregor; Maršálek, 2004; Moberg; Robertsson; Karlberg, 2001). As outras formas de clorofila são: clorofila *b* que pode ser encontrada em vegetais, algas verdes e algumas bactérias; clorofila *c* que está presente em algas marrons e pardas (feótidas) e organismos unicelulares (diatomáceas); clorofila *d* encontrada em algas vermelhas; e clorofila *f* sintetizada em cianobactérias.

A produção de clorofila por microalgas pode variar pelas mudanças de cultivo que não necessariamente está relacionada com a espécie, mas com outros fatores, como intensidade luminosa, temperatura, pH, nutrientes como nitrogênio, fósforo e carbono. As condições de cultivo podem favorecer ou limitar a acumulação de clorofila para diferentes espécies, por isso é importante a identificação das condições de cultivo ótimas para cada espécie de microalgas (da Silva Ferreira; Sant'Anna, 2017). A intensidade da fluorescência da clorofila pode determinar a atividade celular de microalgas (Wang; Wolfbeis, 2013).

A clorofila é um pigmento fluorescente que quando absorve a energia luminosa. Parte dessa energia é reemitida como luz de fóton - fluorescência, e após voltar ao seu estado de origem (Spilling, 2020). Os métodos para determinação da clorofila são por espectrofotômetro por extração em solvente orgânico, espectroscopia de fluorescência, fluorômetros e cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Gregor; Maršálek, 2004). A maioria dos métodos requer a desintegração da célula por extração da clorofila em solventes orgânicos como o metanol, acetona ou etanol, demandando muito tempo de preparo de amostras e ainda o método está sujeito a erros analíticos (Gregor; Maršálek, 2004). Já na análise em espectrofotômetro de fluorescência, as amostras podem ser *in vivo* (Spilling, 2020).

A espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão (em inglês, EEM) é uma técnica analítica multidimensional, sensível, de baixo custo, eficaz e não invasiva (Akbarian *et al.*, 2019). A vantagem desse método é que não exige a adição de aditivos fluorescentes para preparar amostras e fornece informações apenas sobre componentes fluorescentes (Meira *et al.*, 2011).

Normalmente as bandas de fluorescência são sobrepostas dificultando as amostras biológicas mais complexas. A técnica multidimensional é capaz de determinar os componentes

fluorescentes devido à realização da varredura simultaneamente à excitação e emissão, mantendo uma diferença de comprimento de onda fixa entre eles (Meira *et al.*, 2011). Com os dados gerados da coleta de espectros de emissão em vários comprimentos de onda gera-se um gráfico topográfico ou de contorno, onde é possível obter as coordenadas de excitação e emissão identificando os picos de fluorescência (Simonazzi *et al.*, 2022).

Geralmente, essa análise é utilizada para caracterização de amostras semelhantes, mas desconhecidas, para classificação em grupos. Essa técnica vem sendo utilizada para rastreamento em amostras heterogêneas de matéria orgânica dissolvida (em inglês, DOM) fluorescente em ambientes contaminados ou naturais como efluentes, rios e lagos (Henderson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2023).

O espectro da clorofila em células vegetais apresenta picos de absorção e de emissão. O sinal da clorofila fluorescente se obtém da luz de excitação ao ser irradiada com o comprimento de onda que é igual ao pico de absorção do espectro da clorofila, que emite sinal óptico com comprimento de onda do pico de emissão devido à clorofila na célula absorver a energia da luminosa (Wang *et al.*, 2021). Na literatura tem sido demonstrado que a quantidade de clorofila nas células está diretamente relacionada à intensidade do sinal da clorofila fluorescente (Wang; Wolfbeis, 2013). Apesar de que a quantidade de clorofila *a* fluorescente em células é pouca, aproximadamente 1-2% da luz total absorvida, ainda é uma medida direta e confiável (Suresh Kumar *et al.*, 2014).

A luz de fluorescência clorofila *a* é emitida com um pico por volta de 680 nm. A medição da clorofila *a* pode ser feita *in vivo*, em células vivas, ou *in vitro*, após extração do pigmento de clorofila *a* com um solvente como acetona ou etanol (Spilling, 2020). Para amostras *in vivo* é necessário, que após a coleta, a amostra seja climatizada no escuro e em temperatura ambiente (Akbarian *et al.*, 2019). Já *in vitro* o método é invasivo e requer a extração por solvente orgânico, por exemplo acetona 9:1 (acetona:água) (Moberg; Robertsson; Karlberg, 2001). Em estudo que avaliou a fluorescência em *Chlorella vulgaris in vivo* e com o pigmento extraído, o pico de emissão encontrado para clorofila *in vivo* foi de 690 nm e em comparação com o pigmento em extração foi de 10 nm (680 nm) (Teplicky *et al.*, 2017).

Na literatura é possível encontrar semelhantes parâmetros para a análise por espectroscopia de fluorescência de amostras. Para análise de matéria orgânica dissolvida, os parâmetros são excitação de 200-400 nm e emissão de 280-500 nm com incremento de 5 nm

(Hambly *et al.*, 2010). E para determinação de clorofila em células vegetais os parâmetros de emissão são 200-800 nm e excitação de 200-800 nm com incremento de 5 nm (Akbarian *et al.*, 2019). Em estudo que avaliou a clorofila em microalgas, os parâmetros foram de 250-790 nm de excitação e 260-800 nm de emissão com incremento de 5 nm (Sá *et al.*, 2020).

A clorofila pode ser um indicativo de mudanças de ambiente como variação de pH e deficiência de nutrientes. Fan *et al.* (2014) estudaram a variação da clorofila em cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* com deficiência de nitrogênio e fósforo. O resultado mostrou que a deficiência desses nutrientes reduz a intensidade de clorofila. Em outro estudo, Marcek Chorvatova *et al.* (2020) avaliaram a diferença de pH na intensidade de clorofila em cultivo de *Chlorella* sp. e constataram que pH mais ácidos aumentam a intensidade de fluorescência. Estudos avaliaram cultivo de microalgas em suspensão ou imobilizadas e o pico de clorofila foi verificado no segundo dia de cultivo para imobilizadas (Fan *et al.*, 2014; Praveen; Loh, 2015). Em suma, a intensidade de clorofila fluorescente pode ser uma forma de avaliar a viabilidade das microalgas em cultivos.

2.1.2. Efluentes tratados por microalgas

As microalgas vêm sendo utilizadas como alternativa para o tratamento de efluentes, uma vez que os nutrientes principais para seu crescimento são o nitrogênio e o fósforo. A composição dos efluentes depende do tipo de indústria, matéria prima, componentes químicos e dos processos associados ao tratamento.

Na literatura, a maioria dos estudos tem utilizado microalgas em condições limitadas, como em alta e baixa concentração de nutrientes ou em meios com pH diferentes. Os efluentes recalcitrantes (Valderrama *et al.*, 2002), de curtume (Rao *et al.*, 2011), e às vezes municipais (Li, Yecong *et al.*, 2011), são exemplos de efluentes com alta concentração de nutrientes, pois contêm alta concentração de matéria orgânica. Outras condições de cultivo analisadas são a intensidade da luz e tempo de exposição a ela (Fontoura *et al.*, 2017).

Em geral, esses estudos mostram uma grande remoção de nitrogênio e fósforo devido à precipitação dos mesmos, causado pelo aumento do pH no meio e volatilização do nitrogênio amoniacal. A Tabela 2.1 mostra um comparativo de tratamento de efluentes usando microalgas.

Tabela 2.1. Tratamento de diferentes tipos de efluente com microalgas

Efluente	Microalgas	Tempo de cultivo (dias)	Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	Fósforo (mg.L ⁻¹)	Eficiência (%)	Referências
Industrial anaeróbio recalcitrante de uma usina de açúcar	<i>Chlorella Vulgaris</i>	10-14	NH ₃ -N: 3-8	FT: 1,5-3,5	NH ₃ -N: 71,6 F:28	(Valderrama <i>et al.</i> , 2002)
Processamento do couro	<i>Chlorella vulgaris</i>	7	NH ₃ -N:56,3 NTK: 55	FT: 78,09	NH ₃ -N: 79,5 NTK:72 PO ₄ : 94,16	(Rao <i>et al.</i> , 2011)
Curtume bruto	<i>Scenedesmus sp</i>	24	NH ₃ -N: 343	FT: 6,6	NH ₃ -N: 60,42-85,63 F:84,17- 96,65	(Fontoura <i>et al.</i> , 2017)
Cervejaria	<i>Scenedesmus obliquus</i>	14	NT: 54		NT : 11- 24,4	(Mata <i>et al.</i> , 2012)
Sintético	<i>Chlorella kessleri</i>	3	NO ₃ ⁻ : 168,1	PO ₃ ⁻⁴ :11	NO-N: 8-18 PO ₃ : 8-20	(Lee; Lee, 2001)
Processamento da soja	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	5	NT: 189,9- 267,1 NH ₃ -N: 52,1- 169,8	FT: 45,6-56,3	NH ₃ -N: 89,1 NT:88,8 FT: 70,3	(Hongyang <i>et al.</i> , 2011)
Lodo do tratamento de efluentes municipais	<i>Chlorella sp.</i>	14	NH ₃ -N: 82,5- 85,9 NT:116-132,3	FT: 212-215,1	NT:89,1 NH ₃ -N: 93,9 FT: 80,9	(Li, Zhe <i>et al.</i> , 2011)
Agro-industrial	<i>Chlorella vulgaris and Scenedesmus simorphus</i>	9	NH ₃ -N: 36,3	FT: 111,8	NH ₃ -N: 95 FT: 55	(González-Fernández; Molinuevo-Salces; Cruz García-González, 2011)
Indústria siderúrgica	<i>Chlorella vulgaris</i>	120h	NH ₃ -N: 54,6- 90,0	FT: 15,3-46	NH ₃ -N: 0,95g/m ³ .h	(Yun <i>et al.</i> , 1997)
Sintético	<i>Scenedesmus sp.</i>	13	NT: 2,5-25 NT: 10	FT: 1,3 FT: 0,1-2,0	NT: 39-100 FT: 100	(Xin <i>et al.</i> , 2010)
Meio de cultivo com vinhaça	<i>Scenedesmus sp.</i>	10	NT: 136-145	FT: 16-18	NT: 96-65 FT: 98-99,9	(Ramirez, 2013)

O cultivo de microalgas em condições limitadas foi investigado por Valderrama (2002) e Yun *et al.*, (1997). Eles usaram a *Chlorella vulgaris* em efluente industrial anaeróbio recalcitrante e de uma siderúrgica. Na primeira condição, o efluente continha alta concentração de matéria orgânica e baixo pH, e na segunda condição, o efluente não continha fósforo que então foi adicionado no cultivo. Os resultados da remoção dos nutrientes no efluente foram satisfatórios. Contudo, em comparação com a literatura estão abaixo do esperado. Avaliando os estudos listados na Tabela 2.1, o menor valor de remoção de fósforo foi de 8% (Lee; Lee, 2001).

Com relação ao efluente, foi observado que quando o fósforo não foi adicionado no cultivo, a taxa inicial de remoção de amônia foi atrasada pela deficiência de fosfato.

Rao *et al.* (2011) pesquisaram o uso de *Chlorella vulgaris* em tratamento de efluente de curtume. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e em campo durante 7 e 5 dias, respectivamente. Comparando os resultados, os experimentos conduzidos em campo tiveram melhor resultado do que em laboratório. A justificativa foi a intensidade de luz a que os cultivos foram expostos em comparação com os experimentos em laboratório, que foram executados sob iluminação artificial de no máximo 4000 lux. Fontoura *et al.* (2017) também estudaram a influência da intensidade de luz para remoção de nutrientes em cultivos com diferentes concentrações de efluente de curtume usando *Scenedesmus* sp. As condições iniciais do efluente eram 343 mg.L⁻¹ de nitrogênio amoniacal, 6,6 mg.L⁻¹ de fósforo e pH 7,5. Os resultados mostram que a remoção máxima de nitrogênio amoniacal foi de 85% e de fósforo 96,78%, em uma concentração de efluente de 88,4% com intensidade luminosa de 182,5 $\mu\text{mol photos.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Na avaliação dos resultados, a influência da intensidade de luz e concentração do efluente estavam diretamente relacionados com o aumento da produção de biomassa e a remoção de nitrogênio e fósforo.

Outro estudo que investigou a influência da iluminação foi de Mata *et al.* (2012), usando *Scenedesmus obliquus* para simular um tratamento de efluente de cervejaria. A remoção dos nutrientes, a influência da exposição à luz, a intensidade luminosa e a aeração no cultivo foram investigadas. Os resultados mostraram que a condição ideal do cultivo de microalgas foi em aeração contínua, exposição à luz de 12 h com intensidade luminosa de 12000 lux. A remoção de nutrientes foi de 20,8% para nitrogênio total no dia 14. A conclusão foi de que os melhores resultados foram obtidos em experimentos com aeração, pois promove a nitrificação na qual ocorre a conversão de compostos nitrogenados em nitratos que são assimilados pelas microalgas.

Altas remoções de nitrogênio e fósforo foram verificadas em alguns outros estudos. O cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em efluente da indústria da soja para remoção de nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e fosfato foi feito em 120 h. Os resultados reforçaram a relação da remoção de nutrientes com a nutrição das microalgas exigida pelo seu metabolismo. Contudo, o nível de pH observado foi elevado, o que causa a precipitação do fósforo e a volatilização do nitrogênio amoniacal (Wang *et al.*, 2012). Em outro estudo, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus*

dimorphus foram usadas para tratamento de efluentes da indústria agrícola para remoção de amônia e fósforo durante 9 dias por González *et al.* (1997). Comparando as duas microalgas, *Scenedesmus dimorphus* removeu mais amônia do que *C. vulgaris* em 7 dias. Contudo, ao final do experimento, a remoção de amônia foi semelhante. A concentração de nitrato aumentou nos dois cultivos e a remoção do fósforo foi similar para as duas microalgas. Os autores justificaram que o aumento da temperatura no meio ocasionou a volatilização da amônia através de *air stripping* e precipitação do fósforo, ao invés de estarem relacionados ao pH de cultivo.

Em efluente municipal com alta concentração de poluentes, Li *et al.* (2011) investigaram a possibilidade de tratamento usando *Chlorella vulgaris* durante 14 dias. Os resultados mostraram remoção de amônia, nitrogênio total, e fósforo total maior que 80%. Eles destacaram que a microalga é tolerante a altas concentrações de fósforo. Contudo, o pH no final do experimento chegou a 9 e isso pode ter causado a precipitação desse composto.

Lee e Lee (2001) estudaram a influência da exposição do cultivo à luz diurna com uma irradiação de $45 \mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-2}$ em 12 horas em um efluente sintético usando *Chlorella kessleri*. O cultivo foi exposto a temperatura de 30 °C sob uma agitação de 300 rpm. A iluminação constante no cultivo influenciou na remoção do nitrogênio. Por outro lado, a remoção de fósforo teve os melhores resultados na luz diurna.

Diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo no cultivo foram estudadas por Xin *et al.* (2010) usando *Scenedesmus* sp. em um efluente sintético. Para atingir uma alta remoção de nitrogênio e fósforo, a proporção de nitrogênio e fósforo (N/P) deve ser controlada entre 5:1-8:1. Em outras proporções, o nitrogênio não foi removido devido à limitação do fósforo. N/P é um dos fatores mais importantes para o cultivo de microalgas afetando o seu metabolismo e crescimento (Slinksiénė *et al.*, 2022). O excesso ou a insuficiência de fósforo no meio de cultivo gradativamente limita a fotossíntese das microalgas (Qian *et al.*, 2024).

Portanto, as condições/parâmetros dos efluentes devem ser considerados para uma boa eficiência no tratamento usando microalgas. As microalgas consomem o nitrogênio, fósforo e carbono, presentes na maioria dos efluentes para o seu crescimento, o que as torna uma boa alternativa de tratamento. Por outro lado, as microalgas podem ser tolerantes a certas concentrações de poluentes, que quando ultrapassadas, levam ao estresse celular, e conseqüentemente, ineficiência no processo de tratamento (quando empregadas para este fim).

A tolerância das microalgas com poluentes orgânicos foi listada por Palmer (1969). E nessa lista, oito microalgas se mostraram tolerantes a esses poluentes incluindo *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula* e *Stigeoclonium* (Abdel-Raouf; Al-Homaidan; Ibraheem, 2012). Com isso as microalgas são bioindicadores que sinalizam poluentes em águas incluindo os orgânicos responsáveis pela eutrofização (Khalil *et al.*, 2021).

Chlorella vulgaris, *Scenedesmus* sp. e as cianobactérias são as microalgas que além da alta concentração de lipídios, apresentam maior taxa de crescimento e maior tolerância em diferentes condições, como variação de pH, temperatura, O₂ e CO₂ (Barsanti *et al.*, 2008; Msanne; Polle; Starckenburg, 2020). Estas microalgas também mostram bons resultados para remoção de nitrato e fósforo (Eroglu; Smith; Raston, 2015), podendo inclusive, apresentar resistência à salinidade, como é o caso da *Scenedesmus* sp. (Msanne; Polle; Starckenburg, 2020).

A salinidade em efluentes pode ser prejudicial para as microalgas, pois em altos níveis pode afetar a fotossíntese, fosforilação oxidativa, biossíntese de ácidos graxos e metabolismo para conversão em aminoácidos (tirosina). Alguns efluentes, como de curtume e de indústria suinícola, contêm alta salinidade. Os efluentes da indústria suinícola, devido aos seus processos, contêm altas concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo, que ajudam no desenvolvimento da microalga. Porém, com a alta salinidade, o efluente pode afetar negativamente o seu crescimento biológico e conseqüentemente dificultar a tratabilidade dos efluentes (Kim *et al.*, 2016).

No caso dos efluentes de curtume, a concentração de sólidos dissolvidos totais (SDT) é entre 65,4 e 1281,1 mg.L⁻¹. E em processos como de remolho e de curtimento, as concentrações de SDT são de 22.000–33.000 e 29.000–67.000 mg.L⁻¹, respectivamente (Bui *et al.*, 2018). SDT é um indicador de alta salinidade no efluente. Em altas concentrações é um fator significativo para causar estresse celular, pois inibe o crescimento de microalgas devido ao acúmulo de solutos (por exemplo, prolina e glicina (aminoácidos)), que por sua vez são utilizados para equilibrar as concentrações externas de sal (Asulabh, K.S., Supriya, G. & Ramachandra, 2012).

O efeito da salinidade com a concentração de biomassa foi estudado por (Bui *et al.*, 2018) que comparou microalgas provenientes de água doce (*Chlorella vulgaris*) e de água marinha (*Chlorella* sp.) cultivadas em água salina para avaliar o desempenho bioquímico, a assimilação de poluentes, e como o efeito da salinidade afeta o mecanismo de assimilação dos

mesmos. Como conclusão, foi observada uma significativa redução de biomassa com o aumento da salinidade nas duas microalgas. A tolerância de salinidade da *Chlorella vulgaris* foi de 0,1% e da *Chlorella* sp. de 0,1% a 1%. Além disto, a alta concentração de sais pode resultar em baixa eficiência de remoção de COT, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4^{3\text{-P}}$. A assimilação de nutrientes diminui à medida que o nível de salinidade aumenta e isso está relacionado a dois fatores: a competição de íons de sal e poluentes no meio; e o acúmulo interno de íons salinos nas células de microalgas devido ao Na^+ envolvido no transporte de P intro-celular das microalgas, que em alta concentração, é responsável pela inibição da reação de fotossíntese, e também o aumento excessivo de Cl^- que pode levar a morte celular.

Outro estudo que investigou os efeitos da salinidade na produção de biomassa foi de Daneshvar *et al.* (2018). Este mesmo estudo também investigou a remoção de nitrito controlando o pH e a adição de sais no cultivo de *Chlorella vulgaris*. Os sais utilizados foram cloreto de sódio (NaCl) e sal marinho nas concentrações de 0-34 g.L^{-1} . Foi concluído que a biomassa diminui quando a concentração de NaCl aumenta. Contudo, em baixas concentrações, o NaCl pode aumentar o crescimento das microalgas após 8 dias de cultivo. Além disso, as microalgas param de crescer em uma concentração de 34 g.L^{-1} de NaCl e sal marinho. A maior remoção de nitrito foi de 83% em uma concentração de 4,25 g.L^{-1} de NaCl e sal marinho. A justificativa foi de que nitrito pode ser absorvido por células vivas e mortas das microalgas. O efeito do pH não foi satisfatório no crescimento das microalgas e na remoção de nitrito em condições alcalinas e a maior remoção, de 83,6%, foi com pH 5.

2.1.3. Colheita das microalgas

Uma das principais limitações para o uso de microalgas em sistemas de cultivos abertos, como foto-reatores ou roda de pás, é a colheita da biomassa produzida da água tratada. A colheita envolve filtração e/ou centrifugação que não são eficientes para colheita em tratamento de efluentes (de-Bashan; Bashan, 2010). Esses processos são demorados, de alto custo e inviáveis para altos volumes de efluentes. Por esse motivo a imobilização de microalgas apresenta-se vantajoso pois apresenta um melhor custo-benefício para separar as microalgas do meio de cultura em tratamento efluentes (Olguín, 2003). Contudo para comparação de custos de ambas as formas, pelos métodos convencionais ou por imobilização das microalgas, é necessário avaliar a eficiência de remoção de poluentes, custos do polímero e do processo de imobilização.

Para colheita de microalgas por centrifugação há um alto consumo de energia devido ao tamanho da célula de microalga (5 – 50 μm de diâmetro) e à baixa concentração de biomassa relacionada com volume do meio de cultivo (Cheirsilp; Thawechai; Prasertsan, 2017). Em um estudo foi relatado que o consumo de energia é de aproximadamente 20 quilowatt-hora (kWh) de eletricidade por m^3 de volume de meio de cultivo. Com valor base do custo da eletricidade de US\$ 0,09 por kWh, o custo da colheita por centrifugação seria de US\$ 1,8 por m^3 de volume do meio de cultivo (Dassey; Theegala, 2013).

Já para sistemas com células imobilizadas, a colheita é realizada pelo método de peneiramento simples que não exige altos consumos de energia (Lam; Lee, 2012). A comparação de custos pode ser feita do custo da colheita por centrifugação de microalgas livres com o custo do material para imobilizar as células como o alginato. Na literatura, o custo de imobilização de microalgas foi feito com base em uma proporção de 25% de volume de esfera por volume de cultura, os custos de material para imobilização eram de aproximadamente \$ 0,2 por m^3 de volume de cultura. Como a centrifugação exige quase 20 kWh por m^3 de volume de cultura, o custo da colheita é de US\$ 1,8 por m^3 de volume de cultura (Cheirsilp; Thawechai; Prasertsan, 2017). Devido ao fato de que o custo do alginato usado para imobilização é significativamente menor do que o custo da colheita por centrifugação, o uso de células imobilizadas com alginato é viável economicamente e atraente (Alfaro-Sayes *et al.*, 2023).

2.2. Imobilização celular em biopolímeros

O processo de imobilização pode ocorrer por meio de diferentes métodos, com o uso de polímeros ou biopolímeros: por encapsulamento de células livres que consiste em células envoltas por uma rede polimérica que permite a troca de nutrientes entre as células e o meio (Sizemore *et al.*, 2013); por floculação na qual o agente floculante, devido à diferença de cargas, liga-se com as células (Banerjee *et al.*, 2012); por *crosslinking* entre células em que as células se ligam, por forças físicas e químicas, formando uma rede entre elas; por anexação das células em uma superfície sólida, como suporte, por absorção; por acoplamento covalente na qual as células são ligadas em uma superfície por ligações covalentes (Mohamad *et al.*, 2015); ou por aprisionamento das células em membranas semipermeáveis na qual as células ficam aprisionadas em poros da superfície da membrana (Cassidy; Lee; Trevors, 1996; Sizemore *et al.*, 2013). Na Figura 2.1 se ilustra os métodos citados. Os métodos mais comuns de

imobilização celular são por encapsulamento em biopolímeros ou anexadas em uma superfície sólida.

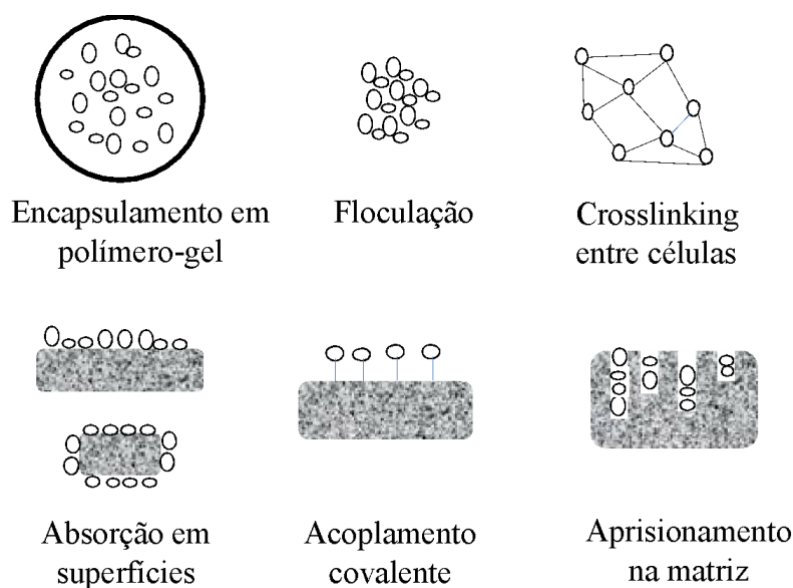


Figura 2.1. Métodos de imobilização. Fonte: Cassidy *et al.* (1996).

Os polímeros usados como matriz são de origem natural ou sintética. A matriz ideal deve ser não-tóxica para não afetar a viabilidade celular, ser foto-transparente para as células realizarem fotossíntese, ter estabilidade no meio, ser capaz de reter a biomassa, e ser resistente para não ocorrer vazamento das células da matriz (Mallick, 2002). Contudo, algumas matrizes podem causar um significativo estresse celular. No caso das microalgas, por exemplo, esse estresse pode afetar o seu metabolismo e, por consequência, causar um crescimento lento (de-Bashan; Bashan, 2010; Wijffels, 2001). Então, é importante que o material da matriz seja permeável para que os substratos e produtos sejam capazes de se difundir para as células.

Os materiais mais comumente usados para imobilização por encapsulamento são os biopolímeros como alginato, celulose, agar-agar, carragenina, entre outros, ou polímeros sintéticos como poliacrilamida, poliuretano, polivinil (PVC) e polipropileno. O método de encapsulamento consiste em usar um polímero que aprisiona as células. Os microrganismos ficam confinados na matriz imobilizante, consequentemente com a mobilidade limitada, assemelhando-se, nesse aspecto, às células naturalmente imobilizadas (Vasilieva *et al.*, 2016). Essa matriz polimérica é uma membrana semipermeável destinada a protegê-los (Guisan, 2006). O método deve preservar a biomassa para que não a deixe vazar para o meio onde as células estão sendo cultivadas.

Os mecanismos de gelificação do encapsulamento para imobilização usando biopolímeros podem variar dependendo da sua origem e são classificados como gelificação ionotrópica, gelificação ionotrópica/térmica ou por precipitação (Quadro 2.2).

Quadro 2.2. Mecanismo de gelificação para encapsulamento celular

Mecanismos de gelificação	Polissacarídeos
Térmica	Agar, agarose
Inotrópica	Alginato, quitosana, pectato
Inotrópica/térmica	Goma k-carragenina, goma gelana
Precipitação	Celulose, triacetato de celulose

Fonte: Mallick, (2002)

As vantagens desse método, tanto com a matriz de origem sintética quanto com origem natural, em comparação com o cultivo de células suspensas, é que o uso de células imobilizadas ocupa menos espaço, possui fácil manuseio, pode ser recuperado e reutilizado e, também, retém biomassa (Mallick, 2002). Muitas matrizes vêm apresentando resistência a meios com salinidade, metais tóxicos e pH, e mostraram proteção às células em competição com outros microrganismos (Hall-Stoodley; Costerton; Stoodley, 2004; Ramawat, 2015).

A imobilização de células vem sendo usada em diferentes aplicações como remoção de nutrientes (Banerjee *et al.*, 2019), produção de biodiesel (Lam; Lee, 2012), bio-sorção de metais tóxicos em efluentes (de-Bashan; Bashan, 2010), foto-produção de hidrogênio e foto-pigmentos (Bailliez *et al.*, 1986; Laurinavichene *et al.*, 2008), uma alternativa para o processo de criopreservação (Faafeng; van Donk; Källqvist, 1994) e como indicador de toxicidade (Rai; Mallick, 1992).

No caso com uso de microalgas, tem sido usado para o tratamento de efluentes devido aos benefícios apresentados, como flexibilidade operacional na parte de colheita após o uso (Feng *et al.*, 2017), e na preservação da biomassa (Mallick, 2002; Moreno-Garrido, 2013). Contudo, para imobilização das mesmas, é necessário que a matriz apresente alguns critérios e propriedades para que o sistema de tratamento seja eficiente. Devem ser considerados fatores como a interação entre matriz e microalga, por exemplo, como a imobilização afeta as suas células, incluindo mudanças morfológicas, características de crescimento, e atividades metabólicas (Mallick, 2002). O Quadro 2.3 resume os principais critérios para um sistema

viável e eficiente para microalgas imobilizadas e as propriedades para uma matriz ideal para imobilização.

Quadro 2.3. Critérios para um sistema viável com microalgas imobilizadas e propriedades para uma matriz ideal para imobilização.

Critérios para um sistema viável com microalgas imobilizadas	Propriedade para uma matriz ideal para imobilização
Retenção da viabilidade	Não tóxica
Habilidade para fotossíntese	Foto transparente
Alta densidade celular	Estabilidade para o crescimento em culturas
Produtividade contínua	Retenção de biomassa
Baixo vazamento de células da matriz	Resistência à ruptura pelo crescimento celular

Fonte: Mallick (2002).

2.3. Biopolímeros para imobilização

2.3.1. Alginato

O Alginato é o biopolímero mais comumente usado como matriz para imobilização de células. Esse biopolímero é um polissacarídeo aniônico originado de algas marrons e de algumas espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* (Moreno-Garrido, 2008; Ramawat, 2015; Sizemore *et al.*, 2013). Alginato vendido comercialmente é proveniente de algas e as espécies mais comuns são *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria japonica*, *Macrocystis pyrifera*, e *Ascophyllum nodosum* (Sizemore *et al.*, 2013). Para a imobilização de microalgas, o alginato vem mostrando ser uma boa matriz por proporcionar uma longevidade fotossintética e ser um biocatalisador celular, pois é um gel não-tóxico, transparente e permeável (de-Bashan; Bashan, 2010).

O alginato é um copolímero linear constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4. A estrutura molecular depende do organismo de onde foi extraído o alginato, pois está relacionada extensamente em termos de sua proporção entre os resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), bem como em sua estrutura sequencial e grau de

polimerização (Tabela 2.2). Desta forma, o polímero pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G (Figura 2.2).

Tabela 2.2. Proporção dos blocos (MM, GG, MG/GM) de alginato extraído de espécies de alga marinha marrom.

Espécies de algas marinhas	Proporção M/G	MM (%)	GG (%)	MG/GM (%)
<i>Laminaria digitata</i> ,	1,43	49,0	25,0	26,0
<i>Laminaria japonica</i> ,	2,26	36,0	14,0	50,0
<i>Macrocystis pyrifera</i> ,	1,56	40,6	17,7	41,7
<i>Ascophyllum nodosum</i>	1,5	38,4	20,7	41,0

A proporção de M/G varia dependendo da espécie. Fonte: Sizemore *et al.* (2013).

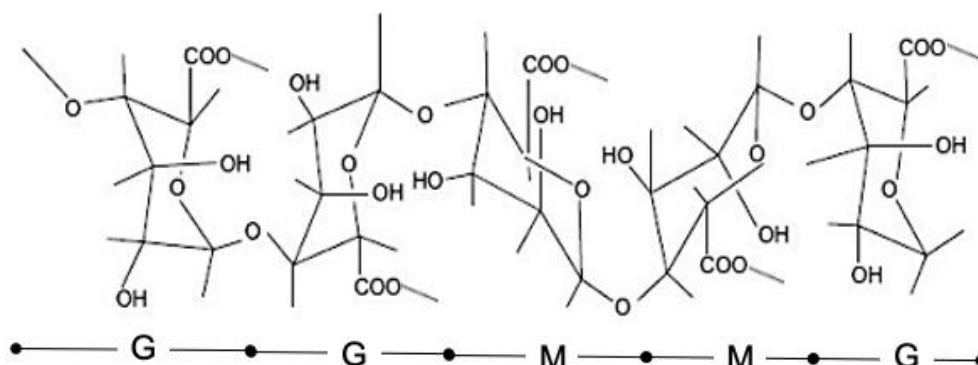


Figura 2.2. Conformação das cadeias de alginato (Wijffels, 2001).

Para várias aplicações nas quais o alginato é utilizado, sua capacidade de formar géis é essencial, mas as características dependem da proporção M/G e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas. De acordo com Sizemore *et al.* (2013), a relação ideal de G-M seria de no mínimo de 70% de G. Para obter um gel mecanicamente resistente, uma alta porosidade e uma baixa retração durante a gelificação é necessário ter uma alta proporção de G. Porém, para obter um gel mais maleável e elástico, com maior retração e com baixa porosidade, geralmente a proporção de M é maior (Sizemore *et al.*, 2013; Smidsrod; Skjakbrk, 1990).

A formação do gel pode ocorrer por dois métodos: *crosslinking* iônico com cátion (gel iônico) ou por precipitação ácida (gel ácido). Gel iônico é o método mais utilizado nas indústrias por sua habilidade de formação do gel na presença de cátions multivalentes. Devido a essa propriedade, esse método vêm sendo usado para encapsulamento de bioativos para indústria alimentícia, medicamentos e imobilização celular (Ching; Bansal; Bhandari, 2017).

A gelificação/polimerização do alginato está relacionada com a afinidade do mesmo com íons divalentes. Uma maior afinidade causa o aumento da rigidez do gel. A ligação do cátion divalente ao alginato é um processo altamente seletivo e a afinidade ao cátion aumenta nessa ordem $Mn < Zn, Ni, Co < Fe < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$. A afinidade dos cátions está diretamente relacionada com a quantidade de blocos G presentes na estrutura do alginato (Ching; Bansal; Bhandari, 2017). Porém, a alta concentração desses cátions no meio, de um ou mais, podem desestabilizar os géis devido à constante troca de cátion na superfície. Os cátions que não são comumente encontrados em meios de cultura ou efluentes são Ba^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} e tem grande afinidade com alginato. Porém não são geralmente utilizados na imobilização por serem potencialmente tóxicos (Lavin; Bintz; Thanos, 2017).

A polimerização do alginato, mais conhecida como modelo “caixa de ovos”, é onde blocos G fazem a troca iônica e, com o aprisionamento dos cátions divalentes, formam uma configuração espiral devido aos íons cátions estarem localizados nas cavidades eletronegativas, como ovos em uma caixa de ovos (Sizemore *et al.*, 2013). Já os géis ácidos são formados quando o pH da solução é reduzido para ser menor que a constante de dissociação (pKa) do polímero (Donati *et al.*, 2009). Os resíduos M e G tem pKa de 3,38 e 3,65, respectivamente. Assim, o alginato é carregado negativamente em uma ampla faixa de pH. A redução do pH afeta a solução de alginato de duas formas: a rápida redução de pH resulta na precipitação de moléculas de ácido algínico em agregados, ou de forma lenta e constante da diminuição de pH forma continuamente ácido algínico de mesmo tamanho. Os géis ácidos são estabilizados por ligações de hidrogênio e blocos de M fazem parte da gelificação, diferentemente dos géis iônicos. Porém, a resistência dos géis relacionados ao bloco G é similar aos géis iônicos (Ching; Bansal; Bhandari, 2017).

O método de encapsulamento é determinado dependendo da aplicação dos géis de alginato. Para a indústria alimentícia, normalmente, os microgéis são de tamanho em média de 30 μm de diâmetro. Já em aplicações biomédicas, como medicamentos, os nanogéis são mais

utilizados (100-200 nm) (Rathore *et al.*, 2013). Para o encapsulamento de células, enzimas e plantas, os géis são de tamanhos acima de 1 mm e chamados de macro géis.

Para a formação de macro géis, a metodologia mais utilizada é por extrusão por gotejamento simples (*simple dripping*) (Ching; Bansal; Bhandari, 2017). O método consiste em extrair a solução de alginato misturado com as células vivas através de um orifício, por exemplo uma seringa, na qual as gotículas formadas, por gravidade, vão em direção a uma solução de um agente *crosslinking*. A gelificação da gotícula em forma de esfera ocorre durante o contato entre solução de alginato e o agente *crosslinking* devido à tensão superficial (Figura 2.3). As vantagens do uso desse método são a simplicidade de operação, baixo custo e condições operacionais que são seguras para manter a atividade celular estável (Rathore *et al.*, 2013).

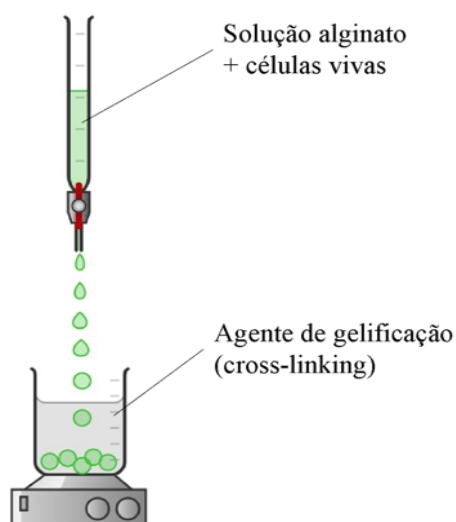


Figura 2.3. Formação de esferas de alginato com microalgas por extrusão.

A morfologia e o tamanho da esfera em gel dependem da viscosidade do alginato, do diâmetro do orifício de onde foi extraído, do fluxo do alginato na saída do orifício e da distância entre o orifício e solução com o agente *crosslinking* a qual determina a esfericidade da gotícula (Blandino; Macías; Cantero, 1999). Para a formação de gotículas em esferas, a distância entre o orifício e a superfície da solução com o agente *crosslinking* deve ser entre 7 cm e 10 cm, pois a gota do líquido é capaz de superar o impacto e as forças de arraste para formar partículas de gel esféricas (Blandino; Macías; Cantero, 1999). O tamanho da esfera é fundamental para a difusão de substratos para células vivas. Geralmente, uma esfera pequena tem melhor rendimento e produtividade, pois em esferas maiores pode ocorrer uma limitação da difusão, assim limitando o metabolismo celular. A esfericidade do gel é importante para a estabilidade

química e mecânica, pois o gel não esférico apresenta maior fragilidade do que um gel esférico, resultando em vazamento das células (Lee; Ravindra; Chan, 2013).

Contudo, outros fatores podem influenciar na eficiência da formação dos géis, como a concentração e viscosidade de alginato, a concentração e a temperatura do agente *crosslinking*, e o tempo de cura das esferas no agente *crosslinking*.

A estrutura do gel está relacionada à viscosidade do alginato que, em altas concentrações, resulta em esferas mais estruturadas. De acordo com Wijffels (2001), a melhor concentração para utilizar o alginato de sódio é de 4-5% (p/v). Concentrações de alginato na solução acima desta proporção tornam-na muito viscosa e difícil para extração das esferas.

A influência da viscosidade de diferentes alginatos na imobilização da *Chlorella vulgaris* foi investigada para uso em tratamento de efluentes (Kube *et al.*, 2019). Foram estudados alginatos com viscosidade média (derivado da *Macrocystis pyrifera*), viscosidade baixa (derivado da *Laminaria hyperborea*) e grau alimentar. A viscosidade e a origem do alginato têm influência na estrutura das esferas. A remoção de poluentes não é afetada pelo tipo de alginato, porém, o alginato grau alimentar (*food grade*) é mais indicado para o uso de tratamento de efluentes. Um dos argumentos é de que o alginato com baixo resíduos gularônicos (G) não é indicado para imobilização de microalgas para os fins de tratamento de efluentes, pois as esferas apresentam inchaço e a perda da resistência da estrutura após a exposição com os efluentes. Adicionalmente, devido ao baixo *crosslinking* do Ca-alginato, a estrutura apresenta menor porosidade e eficiência de imobilização. O alginato com baixa viscosidade mostrou-se melhor para o crescimento da biomassa em comparação com o alginato de grau alimentar. Porém, devido ao custo-benefício, o alginato de grau alimentar é o melhor indicado para esses fins.

Outro fator que está relacionado à gelificação dos géis já formados é a concentração de cálcio como agente de *crosslinking*, pois afeta outras propriedades. O CaCl_2 é o agente mais utilizado por ter alta solubilidade em soluções aquosas, além de promover uma rápida gelificação. Porém, o processo de gelificação é de difícil controle, e o CaSO_4 que apresenta baixa solubilidade e tem baixa gelificação (Sizemore *et al.*, 2013).

A temperatura está relacionada à estrutura das esferas e às propriedades mecânicas durante a gelificação das esferas. A solução do agente *crosslinking* em baixas temperaturas

melhora a estrutura do gel e a resistência mecânica devido à troca de cátions divalentes para o meio ser lenta (Sizemore *et al.*, 2013).

O tempo de cura das esferas no agente *crosslinking* é importante para as esferas tenham uma estrutura rígida e mecânica estável. O período de cura normalmente é de duas horas, porém longos períodos de cura podem certificar que a gelificação foi completa e que encolham de tamanho até um tamanho estacionário antes da aplicação nas esferas. Contudo, se isso for necessário e em caso que esferas tenham células vivas, é importante adicionar nutrientes no agente de gelificação para não causar a morte das células. Em caso de pouco tempo de cura, é necessário colocar baixas concentrações do agente *crosslinking* onde as esferas estão sendo cultivadas (Riddle *et al.*, 2004).

2.3.1.1. Uso de microalgas imobilizadas em alginato de cálcio para remoção de poluentes

A imobilização de microalgas tem sido aplicada em diferentes tipos de efluentes, muitas vezes, comparando com o cultivo de microalgas suspensas. Geralmente, o objetivo principal dos estudos em imobilização é como manter a viabilidade das microalgas e obter os mesmos ou melhores resultados do que cultivo com as microalgas suspensas. A Tabela 2.3 mostra um comparativo dos estudos na literatura por tipo de efluente, espécie e concentração de microalga, período de cultivo, concentração de alginato, intensidade luminosa, pH de cultivo, concentração de nitrogênio e fósforo no início do processo, e a eficiência de remoção.

Tabela 2.3. Comparativo da eficiência de remoção de nutrientes em diferentes efluentes por diferentes microalgas imobilizadas.

Efluente	Microalga	Tempo de cultivo	Concentração de microalgas	Concentração de alginato (% ;p/v)	Intensidade luminosa	pH	Nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹)	Fósforo (mg.L ⁻¹)	Eficiência (%)	Referências
Urbano e sintético	<i>Scenedesmus obliquos e Chlorella vulgaris</i>	181h	10.10 ⁷ células.mL ⁻¹	2%	135μEm ⁻² s ⁻¹		32,5	2,5	NH ₃ -N: Chl: 80 Sc: 96,6	(Ruiz-Marin; Mendoza-Espinosa; Stephenson, 2009)
Urbano	<i>Chlorella vulgaris</i>	3 dias	3,60.10 ⁴ células/esferas	2%		7,1	37,5	4,3	NH ₄ ⁺ -N: 99 PO ₄ ³⁻ : 95	(Lau; Tam; Wong, 1997)
Urbano	<i>Chlorella vulgaris</i>	48h	1.10 ⁶ células.mL ⁻¹	2%		7,34	~28	~5,5	NH ₄ ⁺ -N: 100 PO ₄ ³⁻ : 95	(Tam; Wong, 2000)
Sintéticos	<i>Chlorella sorokiniana e Chlorella vulgaris</i>	48h	2,6.10 ⁶ células.mL ⁻¹ e 2,4. 10 ⁶ células.mL ⁻¹	2%				20	PO ₄ ³⁻ :72	(Hernandez; De-Bashan; Bashan, 2006)
Pré-tratado de estrume bovino	<i>Chlorella vulgaris</i> (C.V.), <i>Chlorella kessleri</i> (C.k)	6 dias		1%			31 237	6/ 34	Luz natural: C.V.:N: 81,7 e F: 71,9 C.k.:N: 63,8 e F: 59,7 Luz artificial: C.V.:N:69,7 e F:60,5 C.k.:N:34 e F:56,1	(Travieso <i>et al.</i> , 1996)
Urbanos	<i>Scenedesmus rubescens</i>	12 dias	6.10 ⁷ células.mL ⁻¹	2%	25 μmol photons m ⁻² s ⁻¹			1,37	F: 68,8%	(Zamani <i>et al.</i> , 2012)
Urbanos	<i>Chlorella</i> sp.	8h	1,4.10 ⁷ células.ml ⁻¹ ou 2,8.10 ⁷ células.mL ⁻¹	3%		7,3	~24	~0,5	N: 60,7 F:84 (1) N: 81,6 F:100(2)	(Zhang <i>et al.</i> , 2012)

A viabilidade da microalga *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, em matriz de alginato, foi investigada por Ruiz-Marin *et al.* (2009). As microalgas foram cultivadas em efluentes urbanos e sintéticos e os resultados não mostram diferença entre as microalgas. As maiores concentrações para *C. vulgaris* foram de 15×10^5 e 13×10^5 cells.esfera⁻¹ e, para *Scenedesmus obliquus*, foram de $6,7 \times 10^5$ e $8,5 \times 10^5$ cells.esfera⁻¹, para efluente sintético e urbano, respectivamente. A justificativa foi atribuída à diferença de tamanho das células das microalgas. O tamanho da célula da *Chlorella vulgaris* é menor que a da *Scenedesmus obliquus*, 2,7 µm e 4,7 µm, respectivamente. Contudo, depois da imobilização, a microalga com o menor tamanho de célula tem mais chance de ocupar homoganeamente o espaço da matriz, apresentando maior densidade celular por esfera (Lau; Tam; Wong, 1997; Tam; Lau; Wong, 1994). Em comparação entre os cultivos com as células suspensas e imobilizadas, a clorofila mostrou estar em maior concentração no cultivo com as microalgas imobilizadas. Foi também observado que as microalgas imobilizadas tiveram a fase inicial de crescimento (fase *lag*) mais longa do que as células suspensas. Esse comportamento também já foi observado em outro estudo, porém aplicando as microalgas em efluente municipal (Lau; Tam; Wong, 1997).

A concentração de esferas com *Chlorella vulgaris* foi investigada quando aplicadas em efluentes domésticos simulados (Tam; Wong, 2000). A melhor concentração de esferas foi de 12 esferas.mL⁻¹, o que equivale a 1:3 esferas:água, v/v. Com essa concentração, foram removidos 100% e 95% de nitrogênio amoniacal e fósforo, respectivamente. Foi observado que pouca concentração de esferas não tem biomassa suficiente para remover a concentração de poluentes do meio. No entanto, alta concentração de esferas também não é favorável pois pode reduzir a emissão de luz favorecendo o auto sombreamento entre as esferas limitando o crescimento e atividades metabólicas das microalgas.

2.3.2. Mistura de biopolímeros com alginato

A fragilidade e a instabilidade das esferas de alginato são os desafios para implementação das mesmas em sistemas de tratamento de efluentes, já que rompimento e dissolução das esferas são comumente reportados durante os experimentos (Travieso *et al.*, 1996). Na literatura foram observadas esferas rompidas e mudando de formato, de uma esfera para uma elipse, e uma parte das esferas dissolvidas. Com isso, as células que estavam imobilizadas ficaram suspensas (Faafeng; van Donk; Källqvist, 1994; Lau; Tam; Wong, 1997). Outros problemas observados foram a baixa estabilidade, degradação térmica e baixa

resistência mecânica. Causas observadas foram que a matriz de imobilização é sensível a compostos quelantes como o fosfato, citrato e lactato ou cátions não-gelificantes como íons sódio e magnésio, e também pode estar relacionado à espécie de microalga imobilizada (Moreno-Garrido, 2008; Wijffels, 2001).

A estabilidade do alginato em gel se dá através do processo covalente *crosslinking*. As técnicas aplicadas são *crosslinking* direto dos grupos carboxila ou adição covalente de alginato com polímeros sintéticos. Com isso é possível o aumento da estabilidade e força mecânica. Contudo, a adição de outros polímeros nos géis pode ser nociva para algumas células (Wijffels, 2001).

Um estudo explorou a alternativa de aumentar a concentração de CaCl_2 ou adicionar outro microrganismo como a microalga a fim de preservar a matriz de imobilização. A concentração de CaCl_2 variou de 2% a 6%, e a bactéria *Azospirillum brasilense* foi adicionada junto com *Chlorella vulgaris*. Os resultados mostraram que a bactéria ajudou na preservação da matriz, não apresentando degradação e o aumento de CaCl_2 deixou o gel mais resistente (Cruz *et al.*, 2013).

A adição de outros aditivos em alginato gel também foi investigada. Os aditivos adicionados foram polivinilpirrolidona (PVP) (2%), Acetato de polivinila (PVA) (3%) + H_3BO_3 , CMC (1%), CaCO_3 (2%) e SrCl_2 . Os resultados da adição de qualquer um dos polímeros e Sr^{2+} mostraram um gel mais frágil do que do controle com 2% Ca^{2+} . No entanto, a adição de PVP produziu um gel mais forte em comparação com os outros aditivos (Moreira *et al.*, 2006). Outros estudos também investigaram a adição de outros componentes na matriz, como polivinil álcool (Lorenzetti; Moro; García-Cruz, 2015; Yujian *et al.*, 2006), carboximetilcelulose (Joo *et al.*, 2001) e quitosana (Gåserød; Smidsrød; Skjåk-Bræk, 1998). Os resultados constataram que os géis se mostram mais estáveis mesmo quando cultivados em efluentes estéreis ou sintéticas. Em relação à sensibilidade das células imobilizadas, os biopolímeros que se mostraram mais compatíveis com as células são ágar/agarose, quitina/quitosana, carragenina, celulose, amido, colágeno/gelatina, pectina, dextrano e xantana. No entanto, a maioria dos estudos vêm investigando a imobilização em misturas de biopolímeros em enzimas, bactérias, levedura e células completas e há poucos estudos com microalgas, como pode ser visto na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Aplicação de mistura de biopolímeros.

Biopolímeros	Concentrações da mistura	Célula imobilizada	Objetivo	Remoção (%)	Referência
Carragenina, xantana	Alginato de sódio – 1,5% k-carragenana – 0,5% ou Alginato de sódio- 1,5%, p/v e goma xantana – 0,5 %, p/v	Levedura	Investigar propriedades físicas e químicas	N/A	(Kumari <i>et al.</i> , 2014)
Carboximetilcelulose, alginato de sódio e alginato de cálcio	1:1 AS and AC; 1:1 AS and CMC and 1:1: AC, CMC and AS	<i>Chlorella vulgaris</i>	Avaliação da estrutura formada para promover o crescimento celular para aumentar a produção de lipídios	N/A	(Abu Sepian <i>et al.</i> , 2019)
Amido	Alginato - 2% p/v Amido - 0 – 60% p/v	Bactéria	Investigar propriedades físicas e químicas	N/A	(Chan <i>et al.</i> , 2011)
Quitosana	Quitosana - 2% Alginato - 2% Quitosana/alginato: 1/1	Fibroplasto	Investigar propriedades físicas e químicas	N/A	(Baysal <i>et al.</i> , 2013)
Quitosana (cobrindo alginato)	Alginato- 1,5, 1,9 e 2,3% (p/v) Quitosana – 0,15%	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Investigar propriedades físicas e químicas	N/A	(Moreira <i>et al.</i> , 2006)
Quitosana (cobrindo alginato)	Alginato de sódio - 4% quitosana 1,5% (p/v)	Enzima	Descoloração de corantes	78-85% de Malachite verde	(Bagewadi; Mulla; Ninnekar, 2017)
Goma guar, Agarose	Alginato – 2,5% p/v GG- 1% p/v ou Agarose - 3%, p/v GG- 1%, p/v	Enzima	Suporte de enzima para tratamento de efluente têxtil	pelo menos 68% do corante	(Ali; Husain, 2018)
Celulose, Hidroxiapatita	Sódio alginato 0,6% Celulose – 0,4% Hap – 1%	-	Remoção de metais tó	80% Níquel II e cobre II	(Jamshaid <i>et al.</i> , 2018)
Gelatina	Alginato 1% Gelatina 10%	Enzima	Remoção de corantes	> 90%	(Mogharabi <i>et al.</i> , 2012)
Pectina	Alginato 2.5% Pectina 2.5%	Enzima	Remediação de compostos aromáticos em efluente industrial avaliando atividade enzimáticas		(Matto; Husain, 2006)
Carboximetilcelulose (CMC)	Alginato 0.5, 0.65, 0.825, 1.25, 2.5% CMC 0, 1.25, 1.675, 1.875, 2%	-	Remoção de chumbo II	84-98%	(Ren <i>et al.</i> , 2016)

Os estudos avaliam a caracterização das esferas formadas, analisando propriedades físicas e químicas. A caracterização envolve as análises morfológicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), FTIR, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (Chan *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2016). Essas análises são importantes para entender a estrutura e composição formada e já observar prováveis alterações devido à exposição à temperatura por um determinado tempo.

Também em relação à estrutura das esferas, são analisadas a textura da esfera, o inchamento, porosidade e resistência mecânica para observar se a esfera é suscetível para conter células vivas ou enzimas (Chan *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2014; Mogharabi *et al.*, 2012). Para entender o comportamento das células dentro de uma esfera são avaliadas a estabilidade celular, toxicidade e capacidade de absorção (Baysal *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2014; Moreira *et al.*, 2006). No caso das microalgas são analisadas a curva de crescimento e produção de lipídios (Abu Sepian *et al.*, 2019). Para as enzimas, os fatores estudados são os efeitos do pH e diferentes solventes, atividade enzimática e capacidade de adsorção (Ali; Husain, 2018; Bagewadi; Mulla; Ninnekar, 2017; Mogharabi *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2016).

Contudo, para aplicação em células, deve-se levar em consideração a espécie, a tolerância a temperaturas e diferenças de pH para não afetar o desempenho e o crescimento das mesmas. Por exemplo, os biopolímeros que envolvem temperatura para gelificação são agarose, carragenina, goma gelana, colágeno, gelatina e elastina. E o colágeno ainda envolve variação de pH (Quadro 2.4) (Wiederschain, 2007).

Quadro 2.4. Fonte e propriedades dos biopolímeros.

Nome	Fonte	Tipo	Gelificação
Agarose	Alga marina	Polissacarídeo	Térmica
Carragenina	Alga marina	Polissacarídeo	Térmica/ ionotrópico
Alginato	Alga marina	Polissacarídeo	Ionotrópico
Quitossana	Crustáceos	Polissacarídeo	Ionotrópico
Goma gelana	Alga marina	Polissacarídeo	Térmica/ ionotrópico
Colágeno	ECM	Proteína	Térmica/variação de pH
Gelatina	ECM/colágeno	Proteína	Térmica
Pectina	Tecidos de plantas e frutas cítricas	Polissacarídeo	Ionotrópico

Celulose	Tecidos de plantas e algas, fungos e bactérias	Polissacarídeo	Térmica
CMC	Celulose	Polissacarídeo	Ionotrópico

ECM – matriz extracelular . Fonte: Wiederschain, (2007)

2.3.2.1. Celulose

A celulose é um dos mais abundantes biopolímeros encontrados na biosfera e é amplamente usado em diferentes aplicações pela indústria. Pode ser encontrada em diferentes fontes, porém a maior fonte de celulose é em fibras de plantas, embora também possa ser encontrado em microrganismos como algas, fungos e bactérias (Khan; Ahmad, 2013). Nas plantas, pode ocorrer na forma pura como celulose vegetal, mas é comumente acompanhada por lignoceluloses. A celulose bacteriana, por outro lado, produzida diretamente como uma rede fibrosa não contém hemiceluloses, pectina, lignina ou outros produtos biogênicos (Heinze; Heinze, 2016).

A estrutura molecular da celulose é constituída por uma cadeia linear de glucano de D-glicose (1-4)-b-ligada não ramificada na qual todos os outros resíduos de glicose são girados a 180 graus em relação aos seus dois vizinhos e contrasta com outros polímeros de glucano, como amido (1-4 -a-glucano) e calose (1-3-b-glucano). Assim, a unidade básica de repetição da molécula de celulose não é a D-glicose, mas a celobiose. Estruturalmente, a celulose exibe resistência, rigidez e estabilidade térmica notavelmente altas (Mahmood Zia; Zuber; Ali, 2017). A celulose e seus derivados demonstraram aplicações potenciais em diversos campos devido a muitas propriedades atraentes, incluindo baixo custo, menor toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Bilal; Iqbal, 2019).

CMC é um derivado da celulose produzido pela reação entre monocloroacetato de sódio e a celulose em meio alcalino, formando um polissacarídeo aniônico de anidro glicose solúvel em água (Akalin; Pulat, 2018; Rahman *et al.*, 2021). A principal diferença entre CMC e celulose, no nível molecular, é apenas alguns grupos carboximetil aniônicos (ou seja, $-\text{CH}_2\text{COOH}$) na estrutura de CMC que substituem os átomos de hidrogênio de alguns grupos hidroxila presentes na infraestrutura da celulose pura (Figura 2.4).

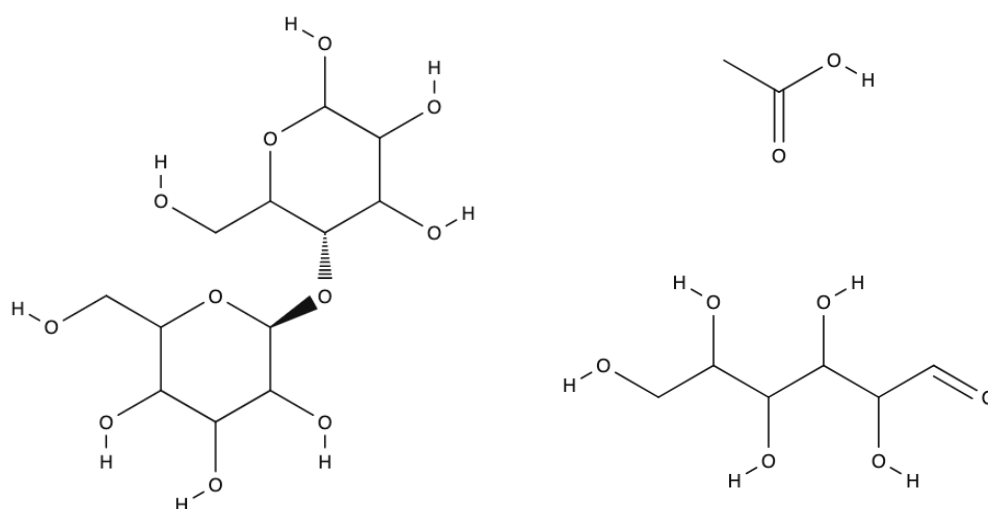


Figura 2.4. Estrutura química celulose (esquerda) e CMC (direita).

O CMC tem uma grande importância para a indústria devido à sua alta viscosidade e não-toxicidade (Mohamed, 2012). Outras propriedades são a sensibilidade com pH e a variação de força iônica (Akalin; Pulat, 2018). Devido às suas propriedades de superfície, o CMC apresenta características como resistência mecânica, hidrofiliabilidade ajustável, propriedades viscosas, e tem como vantagens alta disponibilidade como matéria-prima e o processo de síntese de baixo custo (Rahman *et al.*, 2021).

Com essas propriedades, o CMC gerou interesse em diversas áreas de pesquisa. Dentre suas aplicações, pode-se citar as indústrias de alimentos, papel, têxteis e farmacêuticas, engenharia biomédica, tratamento de efluentes, produção de energia e produção de energia de armazenamento, entre outras (Rahman *et al.*, 2021).

Com a mistura de CMC e alginato de sódio são produzidas esferas poliméricas por *crosslinking* com íons cálcio devido os dois polímeros possuírem sítios de ligação para cátions divalentes. A presença de vários grupos funcionais nos polímeros forma uma estrutura rígida e porosa (Dewangan; Tiwari; Bajpai, 2011) (Figura 2.5).

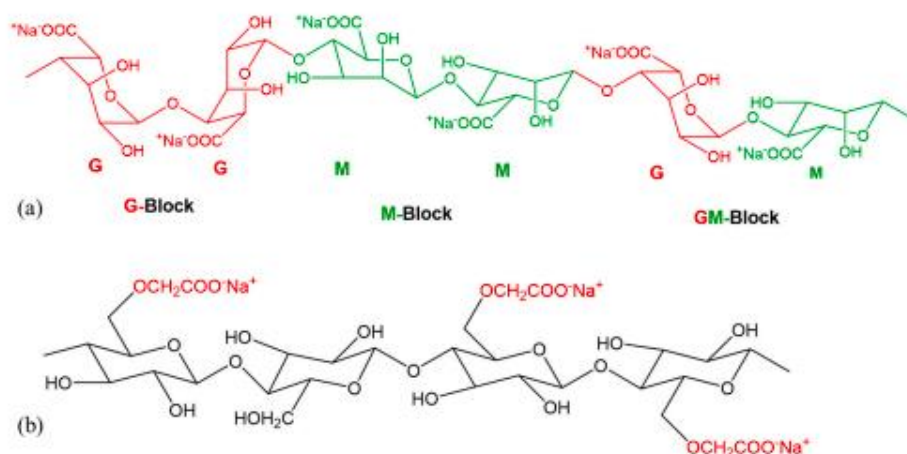


Figura 2.5. Estrutura química alginato de sódio (a) e CMC sódico (b) (Dewangan; Tiwari; Bajpai, 2011).

Em especial para tratamento de águas e efluentes, a utilização de misturas com CMC tem demonstrado bons resultados para remoção de corantes, íons metálicos inorgânicos incluindo metais tóxicos e radionuclídeos (Rahman, 2020).

Para a remoção de metais tóxicos, as esferas de alginato e CMC foram usadas para avaliar a adsorção de Hg II, Cr II e Pb II (Dewangan; Tiwari; Bajpai, 2010, 2011; Ren *et al.*, 2016). Nesses estudos, além da capacidade de adsorção e remoção dos metais, foram avaliados o efeito da concentração de alginato e a concentração de esferas, mostrando que esses fatores têm influência na remoção. Os resultados mostraram que esses dois fatores são responsáveis pela remoção dos metais, pois aumentando a concentração de alginato, aumenta a disponibilidade de sítios ativos para ligações com íons divalentes. Contudo, o aumento da concentração de CMC, que no experimento foi de no máximo 0,5 g.L⁻¹, dificulta a difusão e limita a remoção por tornar a esfera mais rígida e compacta (Dewangan; Tiwari; Bajpai, 2010, 2011). O aumento da concentração de esferas de CMC e alginato proporcionou uma remoção maior dos metais (Ren *et al.*, 2016).

Já para remoção de corantes, foi feito um estudo avaliando um compósito com CMC+Fe₃O₄⁺ óxido de grafeno para adsorção de três azo corantes. A remoção foi entre 90-95% com uma adsorção rápida e a saturação ocorreu depois de 40 minutos (Allouss *et al.*, 2020).

Outro estudo avaliou as características da estrutura formada com alginato e CMC e, também, a viabilidade celular de células humanas (Habib *et al.*, 2018). Foi constatado que a adição de CMC junto com alginato deixou a estrutura mais rígida e com o aumento da concentração de CMC aumenta a interação do *crosslinking*, consequentemente aumentando os sítios disponíveis para interação iônica. Essa mistura mostrou ser uma estrutura mais porosa em comparação somente com alginato. As estruturas com mais alginato do que CMC se mostraram com mais chances de inchaço. Em termos de viabilidade celular, as células se mostraram mais resistentes em estruturas com alginato e CMC do que somente com alginato, sobrevivendo por até 23 dias.

2.3.2.2. Pectina

Pectina é um polissacarídeo aniônico extraído de tecidos de plantas e frutas cítricas composto por longas sequências de ácido α -D-galactosilurônico (GalA) parcialmente metil-esterificado (1 \rightarrow 4)-ligado. Semelhante ao alginato, a pectina com 25% a 50% de grau de metoxilação (DM) sofre associação cadeia-cadeia e forma hidrogéis com a adição de cátions bivalentes, como o Ca^{2+} (Figura 2.6).

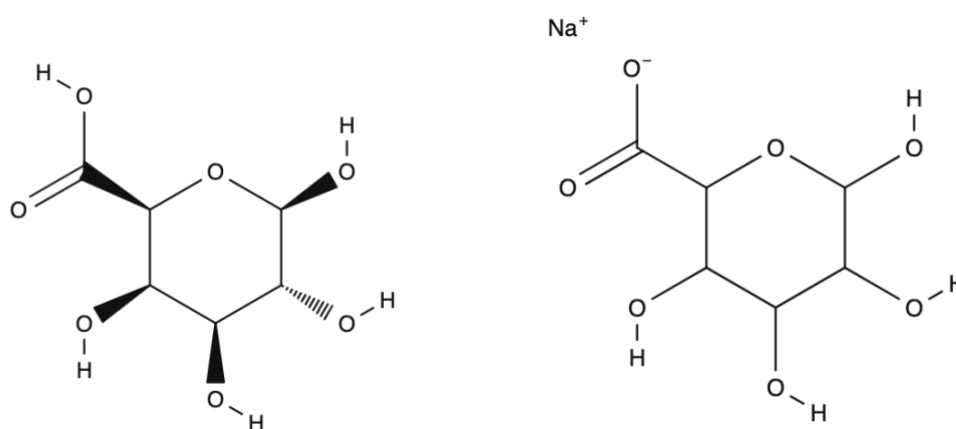


Figura 2.6. Estrutura química alginato (esquerda) e pectina (direita).

A pectina tem sido usada em outras áreas, como na agricultura e medicina, devido às suas propriedades antimicrobianas e antivirais, aprimoramento propriedades mecânicas e redução da solubilidade em água. Ela tem mostrado vantagens para formulações que facilmente se adaptam para uso como hidrogéis, filmes e nanopartículas (Martău; Mihai; Vodnar, 2019).

A interação entre pectina e alginato ainda não foi muito bem explorada. A gelificação de alginato e pectina resulta em uma interação forte e específica entre íons gelificantes e blocos de resíduos de ácido gulurônico e galacturônico, respectivamente. A mistura entre pectina e alginato é descrita como uma associação heterogênea de blocos poli-G de alginato e regiões de éster metílico de pectina de baixa carga, rigidamente unidas (Toft; Grasdalen; Smidsrød, 1986). Isso indica, indiretamente, que a resistência mecânica e a estabilidade dos grânulos do núcleo à base de pectina são mais fortes e mais estáveis do que os grânulos do núcleo de alginato. O aumento de concentração de íons cátion produz géis com pectina mais densos, elásticos e termo-reversível e que a capacidade de sorção de grânulos de gel misto de alginato/pectina é maior em comparação com géis somente com alginato de cálcio (Cao *et al.*, 2020; Cataldo *et al.*, 2013; Voo *et al.*, 2011).

No entanto, as propriedades mecânicas dependem da proporção de pectina e alginato. Em comparação de esferas somente com alginato ou somente com pectina, sabe-se que as esferas com alginato são mais maleáveis do que as de pectina depois de expostas em meio de cultura. No entanto, quando expostas a meios com presença de quelantes de cálcio tais como fosfato, lactato ou citrato, e a cátions tais como sódio, magnésio, elas são capazes de deslocar o cálcio (Voo *et al.*, 2011). As esferas com pectina por sua vez possuem uma resistência mecânica maior do que as de alginato, 0,22 N/esfera e 0,19 N/esfera, respectivamente (Cataldo *et al.*, 2013). Esferas com alginato e pectina podem ser mais densas e insolúveis quando o pH do meio for próximo do valor de pKa de cada um, na qual o do alginato é entre 3,4/3,7 e da pectina, 2,9 (Voo *et al.*, 2011).

Essa mistura já vem sendo utilizada na indústria alimentícia, produzindo alimentos com baixa gordura e açúcar, por possuir propriedades antimicrobianas e antivirais (Voo *et al.*, 2011). Ela também vem sendo usada para imobilização de enzimas na qual o suporte tem resistência térmica e de desnaturação (Datta; Christena; Rajaram, 2013).

Em aplicação de tratamento de efluentes, uma enzima peroxidase foi imobilizada em uma matriz com alginato e pectina. A sua atividade em diferentes condições como em solventes orgânicos e em diferentes pH para o tratamento de efluentes fenólicos e outros poluentes aromáticos foi investigada. Foi constatado que a matriz é resistente em diferentes condições e que preservou a atividade da enzima (Matto; Husain, 2006).

2.4. Imobilização celular em polímero inorgânico

A imobilização de células vivas ou microrganismos em matriz inorgânica é feita pelo encapsulamento em componente inorgânico como a sílica. As vantagens dessa matriz são alta resistência química e física em um ambiente com condições adversas, como exemplo, em altas concentrações de poluentes (Figura 2.7).

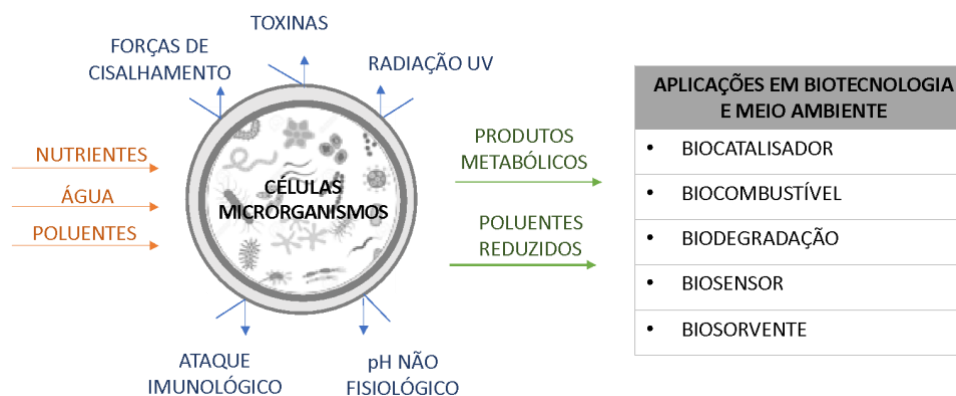


Figura 2.7. Vantagens e aplicações de imobilização de células em matriz inorgânica aplicação. Fonte: Holzmeister *et al.*, (2018) (adaptado).

Assim como o encapsulamento protege as células sensíveis de forças de cisalhamento, mudanças desfavoráveis de pH ou solventes citotóxicos, ele também evita a lavagem da cultura e simplifica a separação dos produtos formados. Contudo, o maior desafio é manter a viabilidade e atividade celular durante o processo de encapsulação e manter e prolongar as células vivas imobilizadas em sua aplicação (Holzmeister *et al.*, 2018). Como exemplo, a maioria dos microrganismos, particularmente as células eucarióticas que têm pouca tolerância às variações de ambiente.

O controle das condições como a temperatura, pH e forças iônicas é necessário. No caso da imobilização em matriz com sol-gel, em rota ácida convencional, são geradas substâncias citotóxicas como álcool e resíduos de monômeros alcoxissilanos. No caso do processo de encapsulamento ou após a matriz formada deve-se evitar a formação em altas concentrações dessas substâncias. Também é importante formar uma matriz que não seja extremamente rígida, porém evitando o encolhimento ou a desidratação celular para que não ocorra a lise celular (Léonard *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016).

Uma das vantagens desse tipo de matriz é o possível ajuste com precisão das propriedades físicas em benefício da célula que está sendo encapsulada, assim como a difusão de nutrientes ou trocas metabólicas através dos poros formados (Holzmeister *et al.*, 2018). Além disso, esse tipo de imobilização apresenta alta estabilidade química e mecânica (Carturan *et al.*, 2004; Perullini *et al.*, 2014b).

Devido às características desta matriz inorgânica ser biológica e quimicamente inertes, com estabilidade química e mecânica, é possível ter resistência a inchamento em contato com solventes orgânicos e químicos. Com isso evita-se que ocorra o vazamento de células para o meio devido à alteração da porosidade ou instabilidade mecânica, por exemplo. Os polímeros inorgânicos, que apresentam características como transparência e translucência, têm mais interesse à pesquisa pois é possível imobilizar microrganismos fotossintéticos como as algas/microalgas e cianobactérias (Perullini *et al.*, 2007).

2.4.1. Sílica em sol-gel

A sílica é um composto biodegradável que se encontra depositado em solos e ambientes aquáticos devido a combinações de fatores ambientais que realizaram a sua dissolução (Baccile *et al.*, 2009a). Muitos microrganismos existentes na natureza têm seu esqueleto a base de silicato, como exemplo a alga diatomácea. Essa correlação e a afinidade biológica fez com que pesquisadores ficassem interessados em utilizar os componentes a base de sílica para imobilização de microrganismos.

Os componentes a base de sílica e seus derivados apresentam resistência mecânica, são quimicamente inertes, opticamente transparentes, termicamente isolantes e estáveis, e com biocompatibilidade (Meunier; Dandoy; Su, 2009). A possibilidade de síntese em baixas temperaturas e também a utilização em diferentes propósitos como microesferas, filmes finos ou em matrizes 3D mesoporosas são vantagens do uso de sílica como matriz imobilizante para microrganismos. A imobilização em sílica sol-gel tem como objetivo preservar as atividades biológicas de interesse em diferentes indústrias como medicina, engenharia, biologia, etc.

As primeiras publicações relacionadas com a imobilização de biomoléculas em sílica foram com a investigação da atividade biológica de enzimas imobilizadas em matriz sol-gel no começo da década de 70 (Johnson; Whateley, 1971) e na imobilização em tetrametoxissilano (TMOS) (Braun *et al.*, 1990). Desde então, é possível encontrar estudos que investigaram a

imobilização em proteínas e enzimas (Avnir *et al.*, 2006a), bactérias (Nassif *et al.*, 2003), cianobactéria (Dickson; Ely, 2013; Rooke *et al.*, 2008), algas (Darder *et al.*, 2010; Perullini *et al.*, 2014a; Rooke *et al.*, 2011) e células de plantas (Carturan *et al.*, 1998; Dickson *et al.*, 2013).

A metodologia que envolve o processo de síntese do sol-gel tem como os precursores mais comuns o tetrametoxissilano (TMOS, R= CH₃) ou o tetraetoxissilano (TEOS, R=C₂H₅). O mecanismo de sol-gel, primeiramente, ocorre de acordo com o pH da solução predominante, que pode ser tanto em meio ácido ou básico, na qual favorece a hidrólise dos grupos alcóxidos para a formação dos grupos silanóis (Si-OH) (Figura 2.8). Os silanóis são instáveis e tendem a formar ligações Si-O-Si em uma reação de polimerização por condensação (Coiffier *et al.*, 2001; Meunier *et al.*, 2010). Essa condensação pode ocorrer pela reação de dois grupos de silanol (desidratação) ou pela reação do silanol com um grupo alcóxido (desalcoholização). À medida que a reação/condensação progride, partículas de sílica de tamanho nanométrico são inicialmente formadas, que crescem ainda mais e finalmente se interligam até que uma rede 3D seja formada (Brinker; Scherer, 2013).

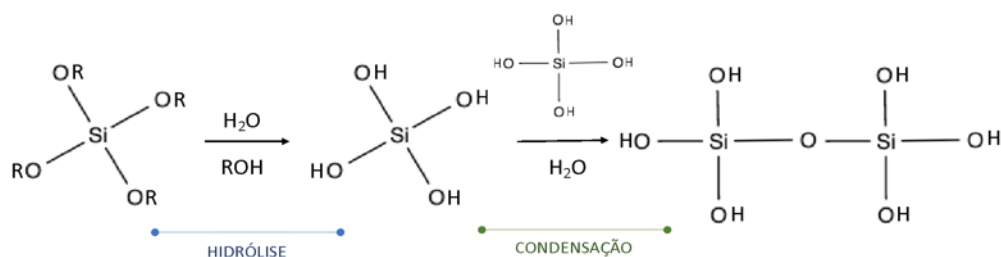


Figura 2.8. Processo de síntese do sol-gel.

No entanto, na hidrólise, há formação de R-OH (moléculas álcool) devido à reação entre o precursor e a água (Coradin; Nassif; Livage, 2003). No caso da imobilização de células, a concentração de álcool na solução formada pode ser fatal para os microrganismos. Contudo, alguns microrganismos como bactérias e leveduras, mostraram ser resistentes a essa condição (Livage; Coradin; Roux, 2001).

As propriedades físicas e químicas do sol-gel são definidas de acordo com o precursor e o meio de gelificação escolhidos. Com isso, também é definida a porosidade do gel para melhor difusão de nutrientes e condições estáveis para o encapsulamento das células (Callone *et al.*, 2008).

A formação do sol-gel de maneira convencional tem a biocompatibilidade limitada para imobilização de células. Além da formação de álcool pela hidrólise, que pode ser tóxica para células, a rigidez da estrutura formada pode limitar ou conter o crescimento celular (Homburg; Patel, 2022). Para que a matriz em sol-gel seja biocompatível para imobilização celular é necessário que ocorra a evaporação do álcool. A Figura 2.9 ilustra as metodologias encontradas na literatura e listadas a seguir:

- mistura de alta proporção de água e menor proporção de precursores para imobilização evitando a toxicidade dos subprodutos gerados na reação, como álcool, quando aplicado a células (Conroy *et al.*, 2000);
- evaporação do álcool gerado pela fase sol antes de adicionar os microrganismos (Ferrer *et al.*, 2003; Pannier *et al.*, 2014);
- formação de uma camada fina de sol-gel por imersão na qual o álcool pode ser evaporado rapidamente evitando o contato prolongado com o microrganismo (Carturan *et al.*, 2004);
- método Biosil – aplicação do precursor da fase gasosa durante a evaporação do álcool evitando o contato com material encapsulado (Avnir *et al.*, 2006a; Carturan *et al.*, 2004);
- modificação de precursores com alcóxidos biocompatíveis como poliglicerol silicato (Gill; Ballesteros, 1998).

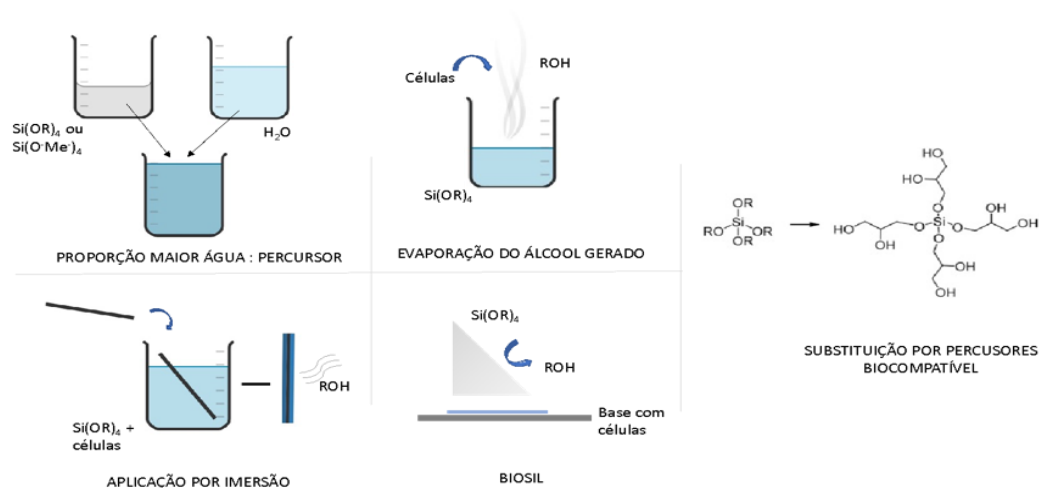


Figura 2.9. Métodos de matriz sol-gel biocompatíveis com microrganismos.

Para evitar a rigidez da estrutura formada, a qual pode limitar o crescimento celular, o estudo vem utilizando a mistura de sílica hidrogel e biopolímeros ou bioaditivos, na qual os microrganismos são imobilizados em um biopolímero e depois são encapsulados em sol-gel. Os biopolímeros mais utilizados são: gelatina (Avnir *et al.*, 2006a; Nassif *et al.*, 2003), celulose (Avnir *et al.*, 2006a; Shchipunov; Karpenko, 2004), alginato (Carturan *et al.*, 2004; Coradin; Nassif; Livage, 2003; Coradin; Livage, 2003; Perullini *et al.*, 2012, 2015; Shchipunov; Karpenko, 2004), e quitosana (Cho; Moon; Lee, 2004; Shchipunov; Karpenko, 2004; Trujillo *et al.*, 2015).

2.4.2. Metodologia de sol-gel por evaporação do álcool gerado

A fim de viabilizar a utilização da aplicação em sol-gel para imobilização de células, Ferrer *et al.* (2002) desenvolveram a metodologia de uma rota sol-gel com a evaporação do álcool por modificação orgânica dos precursores alcóxidos. A metodologia trata da remoção do álcool formado em rotaevaporador. Um dos benefícios desse método é que a ausência do álcool preserva as atividades celulares durante o processo de encapsulamento e, também, depois da estrutura formada, minimiza o encolhimento da matriz durante o processo de cura.

O processo ocorre com a preparação da solução com o precursor, tetraetoxissilano (TEOS), solvente, água em meio ácido, ácido clorídrico. A solução é homogeneizada em ultrassom por 30 minutos. Após, a solução é submetida à rota evaporação com o mesmo volume de água para eliminação do álcool. A adição do excesso de água é para evitar a gelificação do sol antes da remoção do álcool. As células, no caso desse experimento foram enzimas que foram adicionadas em uma solução tampão, em mesmo volume com a solução sol formada em um molde. Após é deixado em ambiente de temperatura e pressão controlada para o tempo de cura (Figura 2.10).

No estudo foi feita a comparação com a rota convencional de sol-gel. Os resultados mostraram que a rota sol-gel sem álcool preservou mais as enzimas do que a rota convencional e também a atividade enzimática foi um pouco mais elevada do que com as enzimas livres.



Figura 2.10. Metodologia de sol-gel por evaporação do álcool gerado

2.4.2.1. Aplicação em microalgas

Microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus intermedius*, *Scenedesmus* sp., *Dictyosphaerium Chlorelloides*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlamydomonas reinhardtii*, assim como cianobactérias *Synechocystis* sp., já foram immobilizadas em sol-géis como precursores TEOS e, menos frequente, TMOS. A concentração de TEOS utilizada foi entre 5% p/p a 22% p/p com a evaporação de álcool de 0,92 a 4,24 mol.L⁻¹. A maioria dos estudos investigou o uso dessas células com objetivo de ser um produto biotecnológico, por exemplo, biossensores para remoção de contaminantes como herbicidas ou metais, o cobre, e também para geração de produtos metabólicos como hidrogênio. A viabilidade celular nessas aplicações foi observada para se tornarem alternativas viáveis. A comparação entre os estudos está na Tabela 2.5.

As metodologias utilizadas para redução do álcool são pela formação de uma camada fina de sol-gel ou pela metodologia da evaporação dos álcoois (Pannier *et al.*, 2014; Perullini *et al.*, 2015; Sicard *et al.*, 2011). Foram utilizadas soluções com pH ácido ou alcalino, ou outras soluções tampão, para aumentar a biocompatibilidade e induzir a gelificação.

Um estudo comparando a imobilização da *Chlorella vulgaris* em sílica sol-gel na rota com a eliminação de álcool e a sílica sol-gel com alginato mostrou que encapsulamento com TEOS apresenta melhores propriedades óticas e mecânicas (Sicard *et al.*, 2011). A adição de glicerol em encapsulamento em sol-gel sem álcool aumenta a porosidade e reduz o estresse celular e em comparação com TEOS e TMOS, a atividade celular foi maior para o primeiro precursor (Dickson; Page; Ely, 2009).

Outro estudo do mesmo autor, para avaliar a toxicidade, mostrou que um excesso de glicerol pode ocasionar estresse celular (Dickson; Ely, 2011). Nesses dois estudos, a limitação do encapsulamento foi ressaltada devido à baixa taxa de respiração celular e de crescimento.

A adição de quitosana ajudou a matriz a ficar menos rígida e mais resistente à abrasão do que sem esse aditivo, e também proporcionou o crescimento das algas (Homburg *et al.*, 2019). A matriz com baixa concentração de álcool apresentou melhor resistência à abrasão, mesmo sem o aditivo, e maior atividade fotossintética das microalgas. Esses mesmos autores avaliaram o crescimento e atividade fotossintética, e os resultados foram que as matrizes com TEOS podem diminuir o crescimento celular em 30%. A justificativa para esta diminuição é a geração de álcool na reação, que é um subproduto tóxico para as células (Homburg; Kruse; Patel, 2019).

Tabela 2.5. Comparação de estudos com aplicação de sol-gel em microalgas

Sílica Precursores e concentração	Catalisador	pH ajustado	Método	Microalga/ cianobactéria	Características/ viabilidade	Objetivo/ propósito	Referências
TEOS: 1,70 mol.L ⁻¹ (10,56%p)	Ácido	Ajustado com maior proporção de células do que solução sol	Adição de aditivo: glicerol	<i>Synechocytis</i> sp.	Viabilidade, atividade fotossintética por mais de 6 semanas	Prolongamento da viabilidade celular Aplicação em biotecnologias	(Dickson; Ely, 2011)
TEOS: 0,23-1,06 mol.L ⁻¹ (5-22% p)	Ácido	Ajustado com TRIS para 7.2-7.4	Adição de aditivos: chitosan	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Atividade fotossintética e comparação com células suspensas	Produção contínua de metabólitos secundários	(Homburg; Kruse; Patel, 2019)
TEOS: 1,06 mol.L ⁻¹ (22%p)							(Homburg <i>et al.</i> , 2019)
Silicato de sódio: 0,16 mol.L ⁻¹ (1.08%p)	Básico	Ajustado para 9 com HCl		<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i> , <i>Scenedesmus intermedius</i> , <i>Scenedesmus</i> sp.	Clorofila fluorescência por 3 semanas	Biosensor com células completas para contaminantes aquosos	(Peña <i>et al.</i> , 2009)
Silicato de sódio + LUDOX® 3,96 mol.L ⁻¹ (18,34%p)	Básico	Ajustado para 7 com HCl	Adição de aditivos: glicerol	<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofila fluorescência por 4 semanas	Biosensor com células completas para contaminantes aquosos	(Nguyen-Ngoc; Tran-Minh, 2007a)
					Ativo por 5 semanas		(Nguyen-Ngoc; Tran-Minh, 2007b)
TEOS: 1,66 mol.L ⁻¹ (10,15%p)	Ácido	Ajustado com buffer de fosfato pH 7	Evaporação do álcool e por 2 passos de encapsulamento	<i>Chlorella vulgaris</i>	Conservação da clorofila por irradiação UV	Adição de CeO ₂ para proteger as células imobilizadas para produção de energia verde	(Sicard <i>et al.</i> , 2011)

Outra metodologia utilizada foi o encapsulamento das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Chlamydomonas reinhardtii* em duas etapas: na primeira etapa, as células são imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e depois encapsuladas em sílica sol-gel. Na segunda etapa, o álcool formado pela hidrólise foi removido ou teve a adição de silicato de sódio como aditivo (Sicard *et al.*, 2011).

Para fins de aplicação dessas imobilizações como biossensores, foi constatado que as microalgas imobilizadas em sílica sol-gel são capazes de responder à presença de herbicidas por fluorescência. A fluorescência está conectada com a concentração de microalgas, e quanto mais concentrada, maior a sua detecção (Peña *et al.*, 2009). Contudo, uma alta concentração de microalgas pode influenciar no tempo de gelificação do sol-gel (Nguyen-Ngoc; Tran-Minh, 2007b). No entanto, a atividade celular dentro da matriz se manteve por 95% (Nguyen-Ngoc; Tran-Minh, 2007a). Outro fator de otimização para essa aplicação é a formação de camadas sol-gel sem álcool em cima de microalgas em alginato de sódio (Perullini *et al.*, 2014c). Os resultados mostram que uma camada mais grossa de sol-gel diminui o sinal de fluorescência para o uso como biossensor.

2.5. Efluentes industriais

O grande volume de geração de efluentes vem impactando o meio ambiente, e gera um problema drástico de despejos em corpos hídricos com altos níveis de poluentes, caso não haja tratamento adequado. A má qualidade da água para consumo é consequência dos efluentes não tratados e do excesso de poluentes não tratados adequadamente que são lançados nos corpos hídricos (Gupta *et al.*, 2009; UNESCO, 2021). Essas fontes têm um impacto instantâneo e local nas águas.

Existem fontes poluidoras que podem causar danos mais persistentes, como efluentes da indústria agrícola que impactam nas águas subterrâneas com excesso de nitrato (Chowdhury *et al.*, 2013). Além disso, outros fatores que também afetam a qualidade da água são os micropoluentes orgânicos, produtos farmacêuticos e microplásticos (Coggan *et al.*, 2019; UNESCO, 2021). Os efluentes não tratados, ou sem tratamento adequado, acabam sendo lançados com altas concentrações de nutrientes e matéria orgânica, e podem conter uma combinação de compostos tóxicos, casos das indústrias alimentícias e de bebidas, coureira e têxtil, gráfica e de manufatura (Kyzas; Fu; Matis, 2013).

Quando os níveis de nitrogênio e fósforo lançados não estão atingindo a concentração permitida podem causar a eutrofização. Nos últimos anos o aumento da poluição por nitrogênio tem crescido em diferentes partes do mundo. O excesso de compostos de nitrogênio em água de consumo pode causar sérios problemas para saúde pública, como compostos nitrosos que são cancerígenos e mutagênicos (Niculescu *et al.*, 2017).

As principais formas do nitrogênio são a amônia (NH_3), o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-). O NO_3^- é a forma mais estável em água e a maioria das formas de nitrogênio aquoso tendem a se converter em nitrato. Por ser um composto inorgânico de fácil dissolução em água, ele tem sido usado como fertilizante pela agricultura. Contudo, a indústria agrícola utiliza em excesso fertilizantes, adubos e esterco de animais, desta forma contribuindo com a poluição tanto do solo quanto dos corpos hídricos (Niculescu *et al.*, 2017).

Outra forma de nitrogênio que tem potencial poluidor é a amônia, que pode ser encontrada em várias concentrações, tanto em águas superficiais quanto subterrâneas. A presença desse composto em águas não é desejável por ser facilmente oxidado por bactérias, transformando-se em nitrato e nitrito e consumindo o oxigênio dissolvido da água. A amônia da forma não ionizada (NH_3) é a forma mais tóxica, não somente para humanos, mas também para animais aquáticos, pois causa limitação de oxigenação no meio aquático. Além disso, a presença de amônia causa a redução da eficiência de tratamentos convencionais de água, como na cloração, na qual o cloro é consumido pela amônia, e também é o responsável pelo odor presente em efluentes (Khuntia; Majumder; Ghosh, 2013).

Em altas concentrações, o nitrogênio juntamente com o fósforo, tanto em solo como em água, pode acelerar o processo de eutrofização. A eutrofização estimula o crescimento de algas e plantas aquáticas, alterando o ecossistema aquático pela redução da penetração de luz na água e aumentando a degradação de matéria orgânica. Isso afeta tanto as plantas aquáticas que vivem no fundo, quanto os peixes e outros animais marinhos (Niculescu *et al.*, 2017).

Contudo, o aumento na demanda de água potável assim como da qualidade da água para utilização nas indústrias, torna os tratamentos para remoção de poluentes e reuso extremamente necessários antes do retorno para os corpos hídricos. Os métodos mais adotados para o tratamento de efluente para fins de remoção de poluentes podem ser divididos nos seguintes processos: físico-químicos, biológicos, elétricos e eletromagnéticos (Gupta *et al.*, 2009).

A remoção de nitrogênio é feita por processos físico-químicos e biológicos, como desnitrificação biológica, *air stripping*, troca iônica, cloração por ruptura e precipitação química. Outros processos mais novos são fotocatalise e oxidação eletroquímica. Devido ao fato de os processos biológicos serem mais efetivos, os processos físico-químicos já não são mais tão utilizados (Ahn, 2006).

No entanto, esses métodos têm suas limitações. Como exemplo, o processo de desnitrificação biológica, que demanda muito espaço para os vários tanques utilizados para nitrificação, desnitrificação, decomposição da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), e a separação sólido-líquido. Além disso, a bactéria usada é sensível a mudanças de temperatura, pH, e outros compostos que podem estar presentes no efluente, como metais tóxicos e amônia. O *air stripping* causa uma poluição no ar devido à volatilização da amônia. Já a cloração por ruptura necessita de grandes quantidades de cloro para a oxidação da amônia e após os tratamentos, é preciso separar o cloro ainda presente na água (Khuntia; Majumder; Ghosh, 2013).

2.6. Efluentes de curtume

O processamento do couro consiste na utilização de pele animal crua (verde) ou salgada (semi-preservada) para um produto de valor comercial, que é utilizado na indústria manufatureira. A pele animal é constituída por três camadas distintas (hipoderme, derme e epiderme) e contém material proteico, gorduras, substâncias minerais e outras, além da água, presente em abundância (Fontoura *et al.*, 2017). O processamento do couro é feito por etapas, nas quais vários produtos químicos são adicionados. O volume de água utilizado no processo é alto devido às lavagens e aos processos mecânicos (Mella, 2017).

As etapas principais de processamento são agrupadas em operações de ribeira, curtimento, acabamento molhado e acabamento. Contudo, dependendo do produto final, os processos podem ser diferentes, alterando o volume de resíduos e efluentes gerados.

Os produtos químicos comumente utilizados na transformação de peles cruas ou salgadas em produtos comerciais são ácidos, bases, sais de cromo, taninos, solventes, sulfetos, corantes, auxiliares e muitos outros compostos. Muitos desses produtos e compostos químicos não são completamente retidos (fixados) pelas peles e permanecem no efluente. Muitas das etapas são em meio aquoso e o efluente gerado é descartado a cada etapa (Fontoura, 2017).

Somente o processo de ribeira consome entre 35 e 40 litros de água para processar um quilograma de pele (Aquim, 2009) e o volume de efluente é de 67.6% para ribeira, sendo que as outras etapas representam 21.7% para curtimento e 10.7% para acabamento (Cooper; Gutterres; Marcilio, 2011). Contudo, isso pode variar dependendo da qualidade da matéria prima e do processo de produção.

Os processos de ribeira são os que mais consomem água durante todo o processamento do couro. A etapa de remolho concentra produtos como a cal, sulfetos e matéria orgânica, surfactantes e graxas, em pouca quantidade. Há grande concentração de matéria em suspensão e o pH é acima de 9,0.

Nas etapas de depilação e caleiro, são descartadas quantidades consideráveis de sulfetos. Isto acarreta a geração gás sulfídrico (H_2S), que devido à ação de microrganismos, é convertido em ácido sulfúrico, que por sua vez, consome boa parte do oxigênio dissolvido presente no efluente, através do processo oxidativo (Fontoura, 2017).

As etapas de desencalagem e purga geram efluentes com altas concentrações de sais amoniacais, ácidos e enzimas. Em especial, a etapa de desencalagem é responsável pela geração de 80% de NH_3-N do efluente total gerado no processo de ribeira (Wang; Wang; Zhou, 2011).

Na última etapa do processo de ribeira, os efluentes gerados no píquél contém elevadas concentrações de cloreto de sódio e ácidos, o que aumenta a acidez, e tem a presença de biocidas. As características do efluente gerado nas etapas do processo de ribeira são pH alcalino, alta concentração de DQO e sais, devido ao sal aderido nas peles para conservação, além dos sais adicionados nos processos. Os parâmetros como pH, DBO, cloretos e amônia podem chegar a 14, 20000, 30000 e 3800 $mg.L^{-1}$ em um efluente de ribeira, respectivamente (Gutterres *et al.*, 2015).

As características gerais do efluente de curtume incluindo todos os processos contém altas concentrações de nitrogênio, especialmente nitrogênio orgânico, cloretos, sulfitos, DBO e DQO, e baixas concentrações de fósforo (Cooper; Gutterres; Marcilio, 2011).

2.6.1. Tratamento de efluentes de curtume

O sistema de tratamento de efluente de curtume passa pelas etapas de tratamento preliminar, tratamento primário (ou tratamento físico-químico), tratamento secundário (ou biológico), e pode ocorrer o tratamento terciário. Contudo, dependendo das características do efluente, outras tecnologias podem ser utilizadas em substituição a alguma etapa de tratamento. Em algumas etapas de processo de curtimento pode ocorrer a reciclagem dos efluentes dependendo das suas características (Aquim, 2009; Fontoura, 2017; Mella, 2017).

O **Tratamento preliminar** tem como objetivo a remoção de sólidos grosseiros. É realizado por processos físicos como gradeamento, peneiramento e separação de óleos e graxas.

O **Tratamento primário** ou tratamento físico-químico ocorre por processos físico-químicos para a redução de DQO, sólidos suspensos (SS) e substâncias tóxicas, que podem interferir no tratamento biológico. As etapas que o constituem são: homogeneização, neutralização, coagulação, floculação e sedimentação.

O **tratamento secundário ou tratamento biológico** tem como objetivo a remoção de matéria orgânica e alguns nutrientes. Por envolver fenômenos biológicos, é um tratamento sensível a fatores físico-químicos como pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. Esses fatores estão diretamente relacionados à eficiência do tratamento por depender de microrganismos. No entanto, alguns componentes pertencentes ao efluente podem ser tóxicos a esses microrganismos.

O **tratamento terciário** não é comum num sistema de tratamento de efluentes de curtume, mas pode ser fundamental para tratar compostos que não são removidos em um sistema de tratamento convencional e para atingir padrões de lançamentos de efluente. Os compostos são os íons cloreto, sódio e cálcio, e/ou corantes e complexos orgânicos. Desta forma é possível remover microrganismos indesejáveis, como patogênicos e coliformes entre outros. Dentre dos tratamentos terciários se encontram a troca iônica, processos de membranas, microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose reversa, eletroanálise, entre outros.

2.6.2. Recentes pesquisas para o tratamento de efluentes de curtume

Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas empregando com tecnologias inovadoras para tratamento de efluentes a fim de minimizar o impacto ambiental causado pela indústria coureira. O grupo de pesquisa do LACOURO/UFRGS vem estudando esses tratamentos alternativos para o tratamento de efluentes de curtume que estão em resumo na Tabela 2.6.

Um dos meios de tratamentos investigados é o uso de microalgas como *Scenedesmus* sp., *Tetraselmis* sp. e consórcio de microalgas para remoção de nutrientes presentes nos efluentes de ribeira e de acabamento completo. Os resultados mostraram-se promissores com uma remoção de 96-100% de nitrogênio amoniacal, de 40-91% de DQO, 96% de fósforo e 44% de DBO (Fontoura *et al.*, 2017; Pena *et al.*, 2020, 2018, 2019). Outros microrganismos investigados foram a biomassa do fungo *Trametes* sp. para ser utilizado como absorvente do corante Acid Blue 161, comumente presente nos efluentes de acabamento molhado e houve uma remoção de 89% do corante (Puchana-Rosero *et al.*, 2016). Outro fungo que foi utilizado para remoção de corantes (Acid Red 357 e Acid Orange 142), DQO e DBO em efluente real de curtume se chama *Trametes villosa* e os resultados mostraram a eficiência de descoloração de 50-70%, com redução da DQO em 40-60% (Ortiz-Monsalve *et al.*, 2020).

Também foram investigados tratamentos físico-químicos, de eletrocoagulação e precipitação química, para remoção do cromo presente em efluentes de curtimento, que teve uma eficiência de remoção de 97% (Mella; Glanert; Gutterres, 2016, 2015), e tratamentos conjugados, como coagulação-floculação com adsorção em pelo de pele de bovina ou ozônio para remoção de corante Acid Red 357 (Mella *et al.*, 2018). Subprodutos ou rejeitos de processos de tratamento, como biomassa seca de microalga, aparas de couro curtido ao cromo, foram avaliados como meio de adsorção para remoção de corantes Acid Blue 161, Basic Red 2 e Acid Brown 414, Acid Red 357 (Carvalho Pinheiro; Perez-Lopez; Gutterres, 2020; Fontoura *et al.*, 2017; Piccin *et al.*, 2016). Outros meios adsorventes com rejeitos, como bagaço de uva encapsulada em sol-gel também foram investigados para remoção de corante Acid-Blue 161 (Benvenuti *et al.*, 2019).

Tabela 2.6. Recentes estudos do grupo de pesquisa LACOURO para remoção de contaminantes do efluente de curtume.

Efluente	Meio de tratamento	Objetivo	Resultados	Referência
Ribeira	Microalgas - <i>Scenedesmus</i> sp.	Influência da luz para remoção de nutrientes	Remoção de 85% de nitrogênio amoniacal, 96% de fósforo e 80% de DQO	(Fontoura <i>et al.</i> , 2017)
Curtimento	Precipitação química e eletrocoagulação	Remoção do cromo	Remoção de 97% de cromo	(Mella; Glanert; Gutterres, 2015)
Acabamento	Biomassa seca de microalga	Remoção do corante Acid-Blue (AB-161)	Remoção de 75% do corante	(Fontoura <i>et al.</i> , 2017)
Acabamento	Uso do bagaço da uva encapsulada em sol-gel		Remoção de 60% do corante	(Benvenuti <i>et al.</i> , 2019)
Acabamento	Biomassa fúngica - <i>Trametes</i> sp.		Remoção de 89%	(Puchana-Rosero <i>et al.</i> , 2016)
Acabamento	Biomassa fúngica - <i>Trametes villosa</i>	Remoção do corante Acid res 357e Acid Orange 142 e DQO	Remoção de 50-70% do corante e remoção da DQO de 40-60%	(Ortiz-Monsalve <i>et al.</i> , 2020)
Acabamento	Resíduo de cromo curtido	Adsorção do corante Acid Red 357	Remoção de 58%	(Piccin <i>et al.</i> , 2016)
Acabamento	Tratamento conjugados de coagulação-floculação (CF)/ adsorção/ozonização	Remoção de poluentes incluindo o corante Acid Red 357	Remoção máxima do corante de 85% por CF-OZ	(Mella <i>et al.</i> , 2018)
Acabamento	Uso de raspas de couro após diferentes curtimentos ou sem curtimento	Adsorção de corantes Basic Red 2 e Acid Brown 414	Remoção máxima de 98%	(Carvalho Pinheiro; Perez-Lopez; Gutterres, 2020)
Acabamento	Consortio de microalgas	Influência da luz para remoção de nutrientes	Remoção máximo de carbono orgânico total de 31%, DQO de 56% e DBO de 20%	(Pena <i>et al.</i> , 2020)
Acabamento	Microalgas - <i>Tetraselmis</i> sp.	Remoção de nutrientes	Remoção máxima de 40% de DQO, 59% de carbono orgânico total e DBO de 44%.	(Pena <i>et al.</i> , 2018)
Completo (ribeira até acabamento)	Consortio de microalgas	Remoção de nutrientes	Remoção de amônia de 99%, de nitrogênio total de 82% e DQO de 91%	(Pena <i>et al.</i> , 2019)

Capítulo 3

Carbon and Nitrogen Removal by *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. suspended and immobilised in Silica Gel Non-Toxic in Leather Processing Wastewater

Autores: Brunna S. C. Barcellos, Caroline B. Agustini, Guilherme. S. Rolim1 João Henrique Z. Santos, Mariliz Gutterres

Artigo publicado na revista *Chemistry and Ecology*. DOI: 10.1080/02757540.2023.2199725.

Abstract: *Microalgae have been effectively used as a nutrient removal method in wastewater treatment. However, the harvesting microalgae step is a major hurdle to the industry. In this study, the silica non-toxic sol-gel is used as a matrix to immobilise microalgae. Non-toxic silica gel matrix was synthesized by tetraethoxysilane (TEOS) derived alcohol free route. This study aims to evaluate the effect of microalgae immobilisation in non-toxic silica gel to remove tanneries wastewater pollutants. The experiments were conducted by applying immobilised Scenedesmus sp. and Chlorella sp. in three concentrations in leather processing wastewater during 72 h of cultivation. The morphology of immobilisation was evaluated by optical microscopy, SEM and Zeta Potential analysis. The rate removals of total nitrogen (TN), total organic carbon (TOC) and Inorganic Carbon (IC) in comparison to immobilised and suspended microalgae were evaluated by the influence of the immobilisation, type of microalgae and microalgae concentration. For both microalgae, immobilisation showed promise for removing these nutrients. The immobilised Chlorella sp. at the initial concentration of $5.84 \pm 0.975 \text{ mg.L}^{-1}$ (I-Ch2) had the highest removal by immobilised microalgae, with an uptake of 20.82% of AN, 18.44% of TN, 30.42% of TOC and 64.73% of IC.*

Keywords: *Microalgae, Scenedesmus sp., Chlorella sp., Silica gel non-toxic, Total nitrogen, Tannery wastewater*

Capítulo 4

Growth of *Chlorella Vulgaris* Immobilised in Calcium Alginate accomplished by cell concentration and chlorophyll

Autores: Brunna S. de C. Barcellos; Mariliz Gutterres

Este artigo está em revisão..

Abstract: *Microalgae immobilisation is an attractive alternative for wastewater treatment. These microorganisms have high nutrient absorption capability, and when immobilised, are easy to apply and collect into the treatment. Although, the viability of cells in this condition and effectiveness still needs to be explored. This study aims to evaluate the viability of three initial Chlorella vulgaris concentrations of cells, C1, $5.93 \times 10^5 \pm 8.84 \times 10^4$ cells.mL⁻¹, C2, $1.75 \times 10^6 \pm 5.09 \times 10^5$ cell.mL⁻¹, and C3, $2.95 \times 10^7 \pm 9.81 \times 10^5$ cell.mL⁻¹, immobilised in the calcium alginate beads the nutrients removal in Jaworski's modified medium. The cell growth of immobilised and suspended cells was analysed by cell counting and chlorophyll content by fluorescence spectroscopy in an excitation-emission matrix (EEM). The results presented that the immobilised microalgae grew and removed nutrients regardless of initial concentration. The most concentrated immobilised Chlorella vulgaris (C3) had the highest concentration of cells, 1.67×10^8 cells.mL⁻¹, and removed more nutrients (100% of nitrate and 96.33% of phosphate) with chlorophyll fluorescence of C3, 22.99 RFU at the end of experiment.*

Keywords: *calcium alginate beads, cell growth, chlorophyll fluorescence, microalgae concentration, nutrients removal*

Capítulo 5

Microalgae Immobilisation Using Biopolymer Blend-Modified Alginate Beads in Wastewater Treatment Applications

Autores: Brunna S. de C. Barcellos, Narasinga R. H. Rao, Bojan Tamburic, Rita K. Henderson, Mariliz Gutterres

Este artigo foi aceito para publicação no periódico *Environmental Engineering Science*.

Abstract: *The stability of calcium alginate beads for microalgae immobilisation in wastewater treatment has been a concern due to the potential exchange of Ca^{2+} ions from the bead surface with the environment. To overcome this constraint, adding biopolymers might improve the properties of alginate gel. The purpose of the study is to immobilise *Chlorella vulgaris* in blends of sodium alginate with carboxymethylcellulose (CMC) or Pectin in different concentrations (1%, 1.5% and 2%) to evaluate the microalgae growth and nutrient removal from culture media. The microalgae growth was assessed by cell counting and chlorophyll content using a fluorescent excitation-emission matrix (EEM). Nutrient removal was conducted by measuring the phosphate and nitrate concentration using ion chromatography. The characterisation of beads, such as size, shrinkage degree, swelling ratio, water content and dry weight, were also investigated. Compared to alginate-only beads, the results present better performance for cell growth and, similarly, for removing nutrients in the presence of Pectin and CMC blends. Microalgae in alginate with 1.0% of Pectin grew 26% more than in Alginate-only beads on day 8. The blends with CMC showed faster removal of nutrients compared to Pectin blends and Alginate-only in only three days. For phosphate, the highest removal was by immobilised microalgae of 95% for 2.0% of CMC and 86% for 2.0% of Pectin. For nitrate, the immobilised microalgae removed 100% in 1.0% and 1.5% of CMC and 98% in 1.0% of Pectin.*

Keywords: Alginate beads, Pectin, CMC, biopolymers blend, *Chlorella vulgaris*.

Capítulo 6

Conclusões

Os estudos realizaram a imobilização de microalgas em três diferentes meios imobilizantes, sílica sol-gel, alginato de cálcio, e misturas de alginato com pectina ou carboximetilcelulose (CMC). As microalgas empregadas foram *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris* e *Scenedemus* sp. Foram avaliados o crescimento das microalgas por contagem de células, clorofila, estrutura dos meios de imobilização e remoção pelas microalgas imobilizadas e não imobilizadas de nutrientes como nitrogênio amoniacal, nitrogênio total, nitrato, fosfato, carbono inorgânico e carbono orgânico total, em meio de cultivo e em efluente de curtume.

Os resultados obtidos mostraram que as microalgas imobilizadas, independentemente do tipo de imobilização, são capazes de crescer e remover nutrientes do meio onde estão sendo cultivadas. Com esse estudo realizado é possível concluir que:

- Na imobilização de microalgas em **sílica sol-gel**, *Scenedemus* sp. e *Chlorella* sp. imobilizadas tiveram desempenho inferior do que as mesmas em suspensão quanto à remoção de nutrientes em efluente de curtume. As microalgas imobilizadas tiveram somente remoção satisfatória para carbono orgânico total e carbono inorgânico.
- A estrutura em sílica sol-gel para imobilização teve características apropriadas para encapsulamento de microrganismos fotossintéticos, como a transparência, resistência em meios com altas concentrações de compostos químicos, como o efluente de curtume, e não se verificando o vazamento de células.
- A maior remoção de nutrientes para microalgas imobilizadas em sílica gel foi verificada para concentração inicial de $5,84 \pm 0,975 \text{ mg.L}^{-1}$ (ICh2), e foi de 20,82%

de nitrogênio amoniacal (NA), 18,44% de nitrogênio total (NT), 30,42% de carbono orgânico total (COT) e 64,75% de carbono inorgânico (CI).

- *Chlorella* sp. em suspensão apresentou a maior taxa de remoção para COT e NT, em comparação com a mesma microalga imobilizada. Já a *Scenedesmus* sp., quando imobilizada, apresentou maior taxa de remoção para NT, NA, e CI em comparação com a mesma em suspensão.

- Para a imobilização de microalga *Chlorella vulgaris* em **alginato de cálcio**, todas as concentrações avaliadas tiveram crescimento celular, independentemente da concentração inicial. A concentração C1 de $2,66 \cdot 10^4$ cells.mL⁻¹ apresentou o maior crescimento durante o experimento e a concentração C3 teve o crescimento semelhante as microalgas em suspensão de $1,79 \cdot 10^6$ cells.mL⁻¹.

- A matriz em alginato de cálcio permaneceu estável na microalga cultivada em meio de cultura, não havendo vazamento de células ou ruptura das mesmas, e o tamanho permaneceu constante em todo o experimento.

- As microalgas imobilizadas em alginato de cálcio tiveram desempenho melhor do que as microalgas em suspensão para remoção de nutrientes. Em 5 dias foram removidos 89% de fosfato e 98% de nitrato, chegando a 96% e 100%, respectivamente, após 7 dias, para concentração C3 de $1,79 \cdot 10^6$ cells.mL⁻¹.

- As imobilizações de microalgas em **misturas de biopolímeros**, tanto a mistura de alginato + CMC (ACMC) quanto a mistura de alginato + pectina (APECT), proporcionaram o crescimento da *Chlorella vulgaris*. A mistura que apresentou o melhor desempenho, foi a com alginato e pectina 1%. O menor desempenho foi para a imobilização em alginato e pectina a 2%, em comparação com as células imobilizadas somente com alginato.

- A adição de mais um polímero com alginato aumentou levemente o diâmetro das esferas com as misturas e as características estruturais foram semelhantes entre as esferas de alginato + pectina (APECT) 1% e somente alginato.

- Para remoção de nutrientes, as microalgas imobilizadas em alginato, independente do meio imobilizante apresentaram resultados satisfatórias. As esferas de

alginate + CMC (ACMC) removeram os nutrientes mais rapidamente em comparação com as outras. Em somente 3 dias, as esferas de ACMC 2% removeram 99% de nitrato e as esferas de ACMC 1,5% removeram 77% de fosfato.

Desse trabalho pode-se concluir que a imobilização de microalgas pode ser capaz de viabilizar o crescimento celular e a remoção de nutrientes do meio. A metodologia utilizando sílica em sol-gel precisa de maiores estudos a fim de verificar o crescimento e viabilidade celular. Já o estudo avaliando o crescimento das microalgas e a intensidade de clorofila somente em alginato mostrou que as microalgas imobilizadas apresentaram melhor resultados que a microalgas em suspensão. A intensidade de clorofila por fluorescência pode ser empregada como um parâmetro de viabilidade já que mostra a evolução do crescimento das células. As microalgas imobilizadas em misturas de biopolímeros mostraram que a concentração de aditivos adicionados no alginato influencia no crescimento das células e na remoção de nutrientes.

6.1. Sugestões de trabalhos futuros

Como sugestões para trabalhos futuros, observa-se a importância da realização de estudos complementares conforme segue:

- Avaliar o crescimento de microalgas em matriz inorgânica em meio de cultura para observar a viabilidade das microalgas.
- Avaliar fatores de toxicidade da matriz inorgânica que afetam o crescimento de microalgas.
- Cultivar *Chlorella Vulgaris* em matriz orgânica, alginato ou a mistura de biopolímeros, em efluente real e avaliar a remoção de nutrientes e o crescimento das mesmas.
- Comparar outras microalgas, *Scenedesmus* sp. e *Spirulina*, em imobilização em matriz inorgânica e orgânica.
- Comparar as microalgas em imobilização e em suspensão, avaliando, por espectro fluorescência, as diferenças dos componentes fluorescente como a clorofila *a* e *b*.
- Avaliar a concentração de micronutrientes, como lipídios, em microalgas imobilizadas, para produção de biodiesel.

- Avaliar a viabilidade do uso de microalgas imobilizadas em escala industrial, analisando o custo para o uso em tratamento de efluentes.
- Realizar análises quantitativas e estatísticas, como análise bibliométrica e/ou análise multivariadas, para resumir e definir dados, como espécies de microalgas, concentração de microalgas, concentração de matriz imobilizante entre outros, para aplicação em escala industrial.
- Avaliar a aplicação pós-uso das microalgas imobilizadas, como o reuso das microalgas, como estudo de compostagem para uso como fertilizante, ou até mesmo a regeneração/reciclagem das mesmas para outros fins, como absorção e remoção de outros componentes, tanto nutrientes como corantes.

Referências Bibliográficas

ABDEL-RAOUF, N; AL-HOMAIDAN, A A; IBRAHEEM, I B M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 19, p. 257–275, 2012.

ABU SEPIAN, N. R. *et al.* Fatty acid profile from immobilised *Chlorella vulgaris* cells in different matrices. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 40, n. 9, p. 1110–1117, 2019.

AHN, Young-Ho. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1709–1721, 2006.

AKALIN, Gulen Oytun; PULAT, Mehlika. Preparation and Characterization of Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose Hydrogel Beads. **Journal of Nanomaterials**, [s. l.], v. 2018, p. 1–12, 2018.

AKBARIAN, Somayyeh *et al.* Unsupervised classification of PSII with and without water-oxidizing complex samples by PARAFAC resolution of excitation-emission fluorescence images. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 195, p. 58–66, 2019.

ALFARO-SAYES, Daniel A. *et al.* Enhanced growth and lipid productivity by living *Chlorella sorokiniana* immobilized in Ca-alginate beads. **JPhys Energy**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2023.

ALI, Misha; HUSAIN, Qayyum. Guar gum blended alginate/agarose hydrogel as a promising support for the entrapment of peroxidase: Stability and reusability studies for the treatment of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 116, p. 463–471, 2018.

ALLOUSS, Dalia *et al.* Effective removal of Cu(II) from aqueous solution over graphene oxide encapsulated carboxymethylcellulose-alginate hydrogel microspheres: towards real wastewater treatment plants. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 7476–7492, 2020.

AQUIM, Patrice Monteiro de. **Gestão em Curtumes : Uso Integrado e Eficiente da Água**. 2009. PhD Thesis, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, [s. l.], 2009.

ASULABH, K.S., SUPRIYA, G. & RAMACHANDRA, T.V. Effect of Salinity Concentrations on Growth Rate and Lipid Concentration in *Microcystis* Sp., *Chlorococcum* Sp.

and Chaetoceros Sp. **National Conference on Conservation and Management of Wetland Ecosystems 06th**, [s. l.], n. November, p. 27, 2012.

AVNIR, David *et al.* Recent bio-applications of sol–gel materials. **J. Mater. Chem.**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1013–1030, 2006.

BACCILE, Niki *et al.* Introducing ecodesign in silica sol–gel materials. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 45, p. 8537, 2009.

BAGEWADI, Zabin K; MULLA, Sikandar I; NINNEKAR, Harichandra Z. Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. [s. l.], 2017.

BAILLIEZ, Christine *et al.* **Immobilization of Botryococcus braunii in alginate: influence on chlorophyll content, photosynthetic activity and degeneration during batch cultures** *Appl Microbiol Biotechnol.* [S. l.: s. n.], 1986.

BANERJEE, Shantanu *et al.* Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: Uptake kinetics and adsorption studies. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 149, p. 107241, 2019.

BANERJEE, Chiranjib *et al.* Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 51, p. 456–461, 2012.

BARROS, Ana I. *et al.* Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 41, p. 1489–1500, 2015.

BARSANTI, Laura *et al.* Oddities and Curiosities in the Algal World. *In: [S. l.: s. n.]*, 2008. p. 353–391.

BAYSAL, Kemal *et al.* Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 59, p. 342–348, 2013.

BENVENUTI, Jaqueline *et al.* Silica-based adsorbent material with grape bagasse encapsulated by the sol-gel method for the adsorption of Basic Blue 41 dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 103342, 2019.

BHATT, P. *et al.* Microalgae-based removal of pollutants from wastewaters: Occurrence, toxicity and circular economy. **Chemosphere**, [s. l.], v. 306, 2022.

BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz M.N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 130, p. 462–482, 2019.

BLANDINO, Ana; MACÍAS, Manuel; CANTERO, Domingo. Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 88, n. 6, p. 686–689, 1999.

BOROWITZKA, Michael A.; BEARDALL, John; RAVEN, John A. **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

BRAUN, Sergei *et al.* Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. **Materials Letters**, [s. l.], v. 10, n. 1–2, p. 1–5, 1990.

BRINKER, C. Jeffrey; SCHERER, George W. Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. **Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing**, [s. l.], p. 1–908, 2013.

BUI, Xuan Thanh *et al.* Identification of the pollutants' removal and mechanism by microalgae in saline wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 275, n. December 2018, p. 44–52, 2018.

BUTTERWICK, C.; HEANEY, S. I.; TALLING, J. F. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. **Freshwater Biology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 291–300, 2004.

CALLONE, Emanuela *et al.* Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: Procedures, physico-chemical features and bioactivity. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 40, p. 4839–4848, 2008.

CAO, Lianqi *et al.* **Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.

CARTURAN, Giovanna *et al.* Encapsulation of functional cells by sol–gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. **J. Mater. Chem.**, [s. l.], v. 14, n. 14, p. 2087–2098, 2004..

CARTURAN, Giovanna *et al.* Production of Valuable Drugs from Plant Cells Immobilized by Hybrid Sol-Gel SiO₂. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, [s. l.], v. 13, p. 273–276, 1998.

CARVALHO PINHEIRO, Nadini S.; PEREZ-LOPEZ, Oscar W.; GUTTERRES, Mariliz. Solid leather wastes as adsorbents for cationic and anionic dye removal, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 1285–1293, 2020.

CASSIDY, Mb; LEE, H; TREVORS, Jt. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, [s. l.], v. 16, p. 79–101, 1996.

CATALDO, Salvatore *et al.* Kinetic and equilibrium study for cadmium and copper removal from aqueous solutions by sorption onto mixed alginate/pectin gel beads. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 1252–1260, 2013.

CHAN, Eng-Seng *et al.* Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 225–232, 2011.

CHEIRSILP, Benjamas; THAWECHAI, Tipawan; PRASERTSAN, Poonsuk. Immobilized oleaginous microalgae for production of lipid and phytoremediation of secondary effluent from palm oil mill in fluidized bed photobioreactor. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 241, p. 787–794, 2017.

CHING, Su Hung; BANSAL, Nidhi; BHANDARI, Bhesh. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017.

CHINNASAMY, Senthil *et al.* Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, p. 3097–3105, 2010.

CHIU, Sheng-Yi *et al.* Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 184, p. 179–189, 2015.

CHO, Gyoujin; MOON, Il Shik; LEE, Jae Suk. Preparation and Characterization of α -Amylase Immobilized Inorganic/Organic Hybrid Membrane Using Chitosan as a Dispersant in the Sol-Gel Process. <http://dx.doi.org/10.1246/cl.1997.577>, [s. l.], n. 6, p. 577–578, 2004.

CHOWDHURY, Manjushree *et al.* Treatment of leather industrial effluents by filtration and coagulation processes. **Water Resources and Industry**, [s. l.], v. 3, p. 11–22, 2013.

CHRISTENSON, Logan; SIMS, Ronald. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 686–702, 2011.

COGGAN, Timothy L. *et al.* An investigation into per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in nineteen Australian wastewater treatment plants (WWTPs). **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 8, 2019.

COIFFIER, Anne *et al.* Sol–gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 2039–2044, 2001.

CONROY, John F.T. *et al.* Cells in Sol-Gels I: A Cytocompatible Route for the Production of Macroporous Silica Gels. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 269–283, 2000.

COOPER, Miriam; GUTTERRES, Mariliz; MARCILIO, Nilson. Environmental Developments and Researches in Brazilian Leather Sector. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 243–249, 2011.

CORADIN, Thibaud; LIVAGE, Jacques. Synthesis and Characterization of Alginate / Silica Biocomposites. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, [s. l.], v. 26, p. 1165–1168, 2003.

CORADIN, T; NASSIF, N.; LIVAGE, J. Silica–alginate composites for microencapsulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 61, n. 5–6, p. 429–434, 2003.

CRUZ, Ivonne *et al.* Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 97, n. 22, p. 9847–9858, 2013.

DA SILVA FERREIRA, Veronica; SANT’ANNA, Celso. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–8, 2017.

DANESHVAR, Ehsan *et al.* Microalgal growth and nitrate removal efficiency in different cultivation conditions: Effect of macro and micronutrients and salinity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 1848–1854, 2018.

DARDER, Margarita *et al.* Algae–silica systems as functional hybrid materials. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 42, p. 9362–9369, 2010.

DASSEY, Adam J.; THEEGALA, Chandra S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 128, p. 241–245, 2013.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE, Joel; NOUE ', La; DE PAUW, Niels. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. **Biotech. Adv**, [s. l.], v. 6, p. 725–770, 1988.

DE-BASHAN, Luz E.; BASHAN, Yoav. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 1611–1627, 2010.

DE-BASHAN, Luz E.; BASHAN, Yoav. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997–2003). **Water Research**, [s. l.], v. 38, n. 19, p. 4222–4246, 2004.

DEWANGAN, Tulika; TIWARI, Alka; BAJPAI, A. K. Adsorption of hg(II) Ions onto binary biopolymeric beads of carboxymethyl cellulose and alginate. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 844–851, 2010.

DEWANGAN, Tulika; TIWARI, Alka; BAJPAI, A. K. Removal of chromium(VI) ions by adsorption onto binary biopolymeric beads of sodium alginate and carboxymethyl cellulose. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1075–1082, 2011.

DICKSON, David J. *et al.* Diffusion of dissolved ions from wet silica sol-gel monoliths: Implications for biological encapsulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 102, p. 611–619, 2013.

DICKSON, David J.; ELY, Roger L. Evaluation of encapsulation stress and the effect of additives on viability and photosynthetic activity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 encapsulated in silica gel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 91, n. 6, p. 1633–1646, 2011.

DICKSON, David J.; ELY, Roger L. Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: Lessons for academic and applied research. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1809–1819, 2013.

DICKSON, David J.; PAGE, Catherine J.; ELY, Roger L. Photobiological hydrogen production from *Synechocystis* sp. PCC 6803 encapsulated in silica sol-gel. **International Journal of Hydrogen Energy**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 204–215, 2009.

DONATI, Ivan *et al.* Effect of Elongation of Alternating Sequences on Swelling Behavior and Large Deformation Properties of Natural Alginate Gels. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 113, n. 39, p. 12916–12922, 2009.

EROGLU, Ela; SMITH, Steven M; RASTON, Colin L. **Biomass and Biofuels from Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, 2015-. ISSN 13607863 (ISSN).(Biofuel and Biorefinery Technologies). v. 2

FAAFENG, Björn A.; VAN DONK, Ellen; KÄLLQVIST, S. Torsten. In situ measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 301–308, 1994.

FAN, Jianhua *et al.* Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2014.

FENG, Bo *et al.* The combined effect of lead ion and sodium silicate in the flotation separation of scheelite from calcite. **Separation Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 567–573, 2017.

FERRER, Maria L. *et al.* Biocompatible sol-gel route for encapsulation of living bacteria in organically modified silica matrixes. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 15, n. 19, p. 3614–3618, 2003.

FONTOURA, Juliana Tolfo da. **Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual**. 2017. 197 f. Thesis PhD - Federal University of Rio Grande do Sul, [s. l.], 2017.

FONTOURA, Juliana Tolfo *et al.* Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 5076–5084, 2017a.

FONTOURA, Juliana Tolfo *et al.* Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus sp.* **Process Safety and Environmental Protection**, [s. l.], v. 111, p. 355–362, 2017b.

GÅSERØD, Olav; SMIDSRØD, Olav; SKJÅK-BRÆK, Gudmund. Microcapsules of alginate-chitosan – I: A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, [s. l.], v. 19, n. 20, p. 1815–1825, 1998.

GILL, Iqbal; BALLESTEROS, Antonio. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hybrid sol- gel polymers: An efficient and generic approach. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 120, n. 34, p. 8587–8598, 1998.

GONÇALVES, Ana L; PIRES, José C M; SIMÕES, Manuel. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, [s. l.], v. 24, p. 403–415, 2016.

GONZÁLEZ, Luz Estela; CAÑIZARES, Rosa Olivia; BAENA, Sandra. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 259–262, 1997.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Cristina; MOLINUEVO-SALCES, Beatriz; CRUZ GARCÍA-GONZÁLEZ, Maria. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae and bacteria consortium treating pig slurry. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, p. 960–966, 2011.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: A comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. **Water Research**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 517–522, 2004.

GUISAN, Jose M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. (Methods in Biotechnology™). v. 22

GUPTA, V. K. *et al.* Low-Cost Adsorbents: Growing Approach to Wastewater Treatment—a Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 783–842, 2009.

GUTTERRES, M *et al.* Characterization of Raw Wastewater from Tanneries. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 280, 2015.

HABIB, Ahasan *et al.* 3D printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. **Materials**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2018.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. **Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases**. [S. l.: s. n.], 2004.

HAMBLY, A. C. *et al.* Fluorescence monitoring for cross-connection detection in water reuse systems: Australian case studies. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 155–162, 2010.

HASSAN, Mohamed E. *et al.* Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. **3 Biotech**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 440, 2019..

HEINZE, Thomas; HEINZE, T. Cellulose: Structure and Properties. **Adv Polym Sci**, [s. l.], v. 271, p. 1–52, 2016.

HENDERSON, Rita K. *et al.* Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. **Water Research**, [s. l.], v. 42, n. 13, p. 3435–3445, 2008.

HERNANDEZ, Juan-Pablo; DE-BASHAN, Luz E; BASHAN, Yoav. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 38, p. 190–198, 2006.

HOLZMEISTER, Ib *et al.* **Artificial inorganic biohybrids: The functional combination of microorganisms and cells with inorganic materials**. [S. l.]: Acta Materialia Inc, 2018.

HOMBURG, Sarah Vanessa *et al.* Entrapment and growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in biocompatible silica hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 173, p. 233–241, 2019.

HOMBURG, Sarah Vanessa; KRUSE, Olaf; PATEL, Anant V. Growth and photosynthetic activity of *Chlamydomonas reinhardtii* entrapped in lens-shaped silica hydrogels. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 302, p. 58–66, 2019.

HOMBURG, Sarah Vanessa; PATEL, Anant V. Silica Hydrogels as Entrapment Material for Microalgae. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1391, 2022.

HONGYANG, Su *et al.* Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 21, p. 9884–9890, 2011.

JAMSHAD, Anum *et al.* Fabrication and Evaluation of Cellulose-Alginate-Hydroxyapatite Beads for the Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions. **Z. Phys. Chem.**, [s. l.], p. aop, 2018.

JOHNSON, P; WHATELEY, T.L. On the use of polymerizing silica gel systems for the immobilization of trypsin. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 557–563, 1971.

JOO, D. S. *et al.* New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 567–576, 2001.

KHALIL, Saeed *et al.* Exploration and determination of algal role as Bioindicator to evaluate water quality – Probing fresh water algae. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 5728–5737, 2021.

KHAN, Ferdous; AHMAD, Sheikh Rafi. Polysaccharides and Their Derivatives for Versatile Tissue Engineering Application. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 395–421, 2013.

KHUNTIA, Snigdha; MAJUMDER, Subrata Kumar; GHOSH, Pallab. Removal of ammonia from water by ozone microbubbles. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 318–326, 2013.

KIM, Hyun-Chul *et al.* Treating high-strength saline piggery wastewater using the heterotrophic cultivation of *Acutodesmus obliquus*. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 110, p. 51–58, 2016.

KUBE, Matthew *et al.* Impact of alginate selection for wastewater treatment by immobilised *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 358, p. 1601–1609, 2019.

KUBE, Matthew *et al.* The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. **Algal Research**, [s. l.], v. 31, p. 478–488, 2018.

KUMARI, Shweta *et al.* Comparative studies on physico-chemical characterization of yeast cells entrapped with alginate and hybrid beads. **Iranian Polymer Journal**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 111–119, 2014.

KYZAS, George Z.; FU, Jie; MATIS, Kostas A. The Change from Past to Future for Adsorbent Materials in Treatment of Dyeing Wastewaters. **Materials**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 5131, 2013.

LAM, Man Kee; LEE, Keat Teong. Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 191, p. 263–268, 2012.

LARDON, Laurent *et al.* Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 43, n. 17, p. 6475–6481, 2009.

LARSDOTTER, K.; JANSEN, J. la Cour; DALHAMMAR, G. Biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 28, n. 9, p. 953–960, 2007.

LAU, P. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella Vulgaris*. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 945–951, 1997.

LAURINAVICHENE, Tatyana V. *et al.* Prolongation of H₂ photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 134, n. 3–4, p. 275–277, 2008.

LAVIN, D. M.; BINTZ, B. E.; THANOS, C. G. **Cell Microencapsulation**. New York, NY: Springer New York, 2017. (Methods in Molecular Biology). v. 1479

LEE, Kwangyong; LEE, Choul-Gyun. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 194–199, 2001.

LEE, B.-B.; RAVINDRA, P.; CHAN, E.-S. Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. **Chemical Engineering & Technology**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1627–1642, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ceat.201300230>.

LÉONARD, Alexandre *et al.* Cyanobacteria immobilised in porous silica gels: exploring biocompatible synthesis routes for the development of photobioreactors. **Energy & Environmental Science**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 370, 2010.

LI, Yecong *et al.* Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 8, p. 5138–5144, 2011.

LI, Zhe *et al.* Simultaneous removal of ethanol, acetaldehyde and nitrogen oxides over V-Pd/ γ -Al₂O₃-TiO₂ catalyst. **Journal of Natural Gas Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 167–172, 2011.

LIVAGE, Jacques; CORADIN, Thibaud; ROUX, Cécile. Encapsulation of biomolecules in silica gels. **Journal of Physics: Condensed Matter**, [s. l.], v. 13, n. 33, p. R673–R691, 2001.

LORENZETTI, Marina F S; MORO, Marina R.; GARCÍA-CRUZ, Crispin H. Alginate/PVA beads for levan production by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Food Process Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 31–36, 2015.

LOURENCO, Sergio de Oliveira. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. [s. l.], p. 588, 2006.

MAHMOOD ZIA, Khalid; ZUBER, Mohammad; ALI, Muhammad. **Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Materials Science**. [S. l.: s. n.], 2017.

MALLICK, Nirupama. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **BioMetals**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 377–390, 2002.

MARCEK CHORVATOVA, A. *et al.* Time-resolved endogenous chlorophyll fluorescence sensitivity to pH: Study on *Chlorella* sp. algae. **Methods and Applications in Fluorescence**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2020.

MARTĂU, Gheorghe Adrian; MIHAI, Mihaela; VODNAR, Dan Cristian. The Use of Chitosan, Alginate, and Pectin in the Biomedical and Food Sector—Biocompatibility, Bioadhesiveness, and Biodegradability. **Polymers**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1837, 2019.

MATA, Teresa M. *et al.* Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 107, p. 151–158, 2012.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATTO, Mahreen; HUSAIN, Qayyum. Entrapment of porous and stable concanavalin A–peroxidase complex into hybrid calcium alginate–pectin gel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 1316–1323, 2006.

MEIRA, Marilena *et al.* Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3D e análise das componentes principais. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 621–624, 2011.

MELLA, Bianca. **Resíduo sólido de depilação como adsorvente de corantes para tingimento de couro**. 2017. Thesis PhD - Federal University of Rio Grande do Sul, [s. l.], 2017.

MELLA, Bianca *et al.* Treatment of Leather Dyeing Wastewater with Associated Process of Coagulation-Flocculation/Adsorption/Ozonation. **Ozone: Science & Engineering**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 133–140, 2018.

MELLA, Bianca; GLANERT, Ana Cláudia; GUTTERRES, Mariliz. Removal of chromium from tanning wastewater and its reuse. **Process Safety and Environmental Protection**, [s. l.], v. 95, p. 195–201, 2015.

MELLA, Bianca; GLANERT, Ana Cláudia C.; GUTTERRES, Mariliz. Removal of chromium from tanning wastewater by chemical precipitation and electrocoagulation. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 55–61, 2016.

MERCHANT, Sabeeha S.; HELMANN, John D. Elemental Economy: Microbial Strategies for Optimizing Growth in the Face of Nutrient Limitation. **Advances in Microbial Physiology**, [s. l.], v. 60, p. 91–210, 2012.

MEUNIER, Christophe F. *et al.* Living hybrid materials capable of energy conversion and CO₂ assimilation. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 46, n. 22, p. 3843–3859, 2010.

MEUNIER, Christophe F; DANDOY, Philippe; SU, Bao-Lian. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials. **Journal of Colloid And Interface Science**, [s. l.], v. 342, p. 211–224, 2009.

MOBERG, Ludvig; ROBERTSSON, George; KARLBERG, Bo. Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheopigments using parallel factor analysis. **Talanta**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 161–170, 2001.

MOGHARABI, Mehdi *et al.* Immobilization of Laccase in Alginate-Gelatin Mixed Gel and Decolorization of Synthetic Dyes. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [s. l.], v. 2012, p. 1–6, 2012.

MOHAMAD, Nur Royhaila *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MOHAMED, Maysa A. Swelling characteristics and application of gamma-radiation on irradiated SBR-carboxymethylcellulose (CMC) blends. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 207–211, 2012.

MOREIRA, Susana M. *et al.* Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 38, n. 1–2, p. 135–141, 2006.

MORENO-GARRIDO, Ignacio. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 10, p. 3949–3964, 2008.

MORENO-GARRIDO, Ignacio. Microalgal Immobilization Methods. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1051, p. 327–347, 2013.

MSANNE, Joseph; POLLE, Juergen; STARKENBURG, Shawn. **An assessment of heterotrophy and mixotrophy in *Scenedesmus* and its utilization in wastewater treatment.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

NASSIF, Nadine *et al.* A sol–gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 203–208, 2003.

NGUYEN-NGOC, Hanh; TRAN-MINH, Canh. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 583, p. 161–165, 2007a.

NGUYEN-NGOC, Hanh; TRAN-MINH, Canh. Sol-gel process for vegetal cell encapsulation. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 607–611, 2007b.

NICULESCU, Violeta; SANDRU, Claudia; PAUN, Nadia; MIRICIOIU, Marius. An overview on the removal of nitrogen compounds from water and wastewater. **Progress of Cryogenics and Isotopes Separation**, v.20, n.2, p.31–42, 2017.

OLGUÍN, E. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 22, n. 1–2, p. 81–91, 2003.

ORTIZ-MONSALVE, S. *et al.* Degradation of a leather-dye by the combination of depolymerised wood-chip biochar adsorption and solid-state fermentation with *Trametes villosa* SCS-10. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2020.

PALMER, C. Mervin. A COMPOSITE RATING OF ALGAE TOLERATING ORGANIC POLLUTION². **Journal of Phycology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 78–82, 1969.

PANNIER, Angela *et al.* Alginate/silica hybrid materials for immobilization of green microalgae *Chlorella vulgaris* for cell-based sensor arrays. **J. Mater. Chem. B**, [s. l.], v. 2, n. 45, p. 7896–7909, 2014.

PENA, Aline de Cassia Campos *et al.* Consortium of Microalgae for Tannery Effluent Treatment. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 62, 2019.

PENA, Aline C.C. *et al.* Influence of period light on cultivation of microalgae consortium for the treatment of tannery wastewaters from leather finishing stage. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 263, p. 121618, 2020.

PEÑA, Elena *et al.* Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. **Biosensors and Bioelectronics**, [s. l.], v. 24, p. 3538–3543, 2009.

PENA, Aline De Cassia Campos *et al.* *Tetraselmis* sp. Isolated from a microalgae consortium for tannery wastewater treatment. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 258–261, 2018.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Advanced Biomaterials: Hydrogels that Allow Division and Growth of Encapsulated Cells. In: CÂMARA, Fabricio Vitor; FERREIRA, Leandro J. (org.). **Hydrogels: Synthesis, Characterization and Applications**. New York: Nova Science, 2012. p. 315–328.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices. **Open Material Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2015.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Co-encapsulation of *Daphnia magna* and microalgae in silica matrices, a stepping stone toward a portable microcosm. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 147–150, 2014a.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Inorganic hydrogels for whole-culture encapsulation. **Advances in Biosensors Research**, [s. l.], n. May 2016, p. 1–345, 2014b.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Plant cell proliferation inside an inorganic host. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 542–548, 2007.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Sol–gel silica platforms for microalgae-based optical biosensors. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 179, p. 65–70, 2014c.

PICCIN, Jeferson S. *et al.* Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1061–1067, 2016.

PIRES, J. C. M. *et al.* Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 5096–5105, 2013.

PRAVEEN, Prashant; LOH, Kai-Chee. Photosynthetic aeration in biological wastewater treatment using immobilized microalgae-bacteria symbiosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 99, n. 23, p. 10345–10354, 2015.

PUCHANA-ROSETO, Mayerly Johana *et al.* Fungal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye in aqueous solution. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1–10, 2016.

QIAN, Weiyi *et al.* Effect of N/P ratio on attached microalgae growth and the differentiated metabolism along the depth of biofilm. **Environmental Research**, [s. l.], v. 240, 2024.

RAHMAN, Z. An overview on heavy metal resistant microorganisms for simultaneous treatment of multiple chemical pollutants at co-contaminated sites, and their multipurpose application. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 396, 2020.

RAHMAN, Md Saifur *et al.* Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. **Polymers** **2021**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1345, 2021.

RAI, L C; MALLICK, N. Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 110–114, 1992.

RAMAWAT, Kishan Gopal. **Polysaccharides**. Cham: Springer International Publishing, 2015.

RAMIREZ, Nelzy. **Estudo do crescimento da microalga scenedesmus sp. Em vinhaça**. 2013. 109 f. Thesis (Master Degree) - Federal Universtiy of Rio Grande do Sul, [s. l.], 2013.

RAO, P *et al.* Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. **Water SA**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 7–14, 2011.

RATHORE, Sweta *et al.* Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 116, p. 369–381, 2013.

REN, Huixue *et al.* Efficient Pb(II) removal using sodium alginate-carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 137, p. 402–409, 2016.

RIAÑO, B; MOLINUEVO, B; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Treatment of fish processing wastewater with microalgae-containing microbiota. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 23, p. 10829–10833, 2011.

RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2003.

RIDDLE, Kathryn W *et al.* Biomaterials for cell immobilization. *In*: NEDOVIĆ, Viktor; WILLAERT, Ronnie (org.). **Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. (Focus on Biotechnology). v. 8A, p. 734–763.

ROOKE, Joanna Claire *et al.* Novel photosynthetic CO₂ bioconvertor based on green algae entrapped in low-sodium silica gels. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 951–959, 2011.

ROOKE, Joanna Claire *et al.* Photosynthesis within porous silica gel: Viability and activity of encapsulated cyanobacteria. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 24, p. 2833–2841, 2008.

RUIZ-MARIN, Alejandro; MENDOZA-ESPINOSA, Leopoldo G; STEPHENSON, Tom. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, p. 58–64, 2009.

RUIZ-MARTINEZ, A *et al.* Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 126, p. 247–253, 2012.

SÁ, Marta *et al.* Fluorescence spectroscopy and chemometrics for simultaneous monitoring of cell concentration, chlorophyll and fatty acids in *Nannochloropsis oceanica*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

SHARMA, R. *et al.* Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 344, 2022.

SHCHIPUNOV, Yurii A.; KARPENKO, Tat'yana Yu. Hybrid polysaccharide-silica nanocomposites prepared by the sol-gel technique. **Langmuir**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 3882–3887, 2004.

SICARD, Clémence *et al.* CeO₂ nanoparticles for the protection of photosynthetic organisms immobilized in silica gels. **Chemistry of Materials**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1374–1378, 2011.

SIMONAZZI, Mara *et al.* Improvement of In Vivo Fluorescence Tools for Fast Monitoring of Freshwater Phytoplankton and Potentially Harmful Cyanobacteria. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 19, n. 21, 2022.

SINGH, S.P.; SINGH, Priyanka. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 50, p. 431–444, 2015.

SINOGAS, Carlos; ALHO, Luís. **PRINCÍPIOS DE MICROBIOLOGIA Textos de apoio e Manual prático**. Évora, Portugal: [s. n.], 2002.

SIZEMORE, Susan R. *et al.* **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, ISSN 10643745.(Methods in Molecular Biology). v. 1051, 2013.

SLINKSIENÉ, Rasa *et al.* Use of microalgae biomass for production of granular nitrogen biofertilizers. **Green Chemistry Letters and Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 415–425, 2022.

SMIDSRÖD, O; SKJAKBRK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 8, p. 71–78, 1990.

SOLLER, Jeffrey A. *et al.* Risk-based approach to evaluate the public health benefit of additional wastewater treatment. **Environmental Science and Technology**, [*s. l.*], v. 37, n. 9, p. 1882–1891, 2003.

SPILLING, Kristian. **Biofuels from Algae**. New York, NY: Springer New York, 2020. (Methods in Molecular Biology). v. 1980

SUKLA, Lala Behari; PRADHAN, Debabrata; SUBBIAH, Tondepu. Future Prospects of Microalgae in Wastewater Treatment. *In: the role of microalgae in wastewater treatment*. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 129–135.

SURESH KUMAR, K. *et al.* Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 104, n. 1, p. 51–71, 2014.

TAM, N. F. Y.; LAU, P. S.; WONG, Y. S. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. **Water Science and Technology**, [*s. l.*], v. 30, n. 6, p. 369–374, 1994.

TAM, N.F.Y; WONG, Y.S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, [*s. l.*], v. 107, n. 1, p. 145–151, 2000.

TEOH, Ming-Li *et al.* Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. **Journal of Applied Phycology**, [*s. l.*], v. 16, p. 421–430, 2004.

TEPLICKY, Tibor *et al.* Fluorescence Properties of *Chlorella* sp. Algae. **Advances in Electrical and Electronic Engineering**, [*s. l.*], v. 15, n. 2, p. 352–357, 2017.

TING, Han *et al.* Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, [*s. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–29, 2017.

TOFT, Knut; GRASDALEN, Hans; SMIDSRØD, Olav. Synergistic Gelation of Alginates and Pectins. [*s. l.*], p. 117–132, 1986.

TOLFO, Juliana *et al.* **Tannery Wastewater Treatment with *Scenedesmus* sp .** Novo Hamburgo/Brazil 165: XXXIII IULTCS Congress, 2015.

TONINELLI, Andrea Efrem *et al.* *Scenedesmus dimorphus* biofilm: Photoefficiency and biomass production under intermittent lighting. **Nature Publishing Group**, [*s. l.*], 2016.

TRAVIESO, L *et al.* Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 181–186, 1996.

TRUJILLO, Sara *et al.* Organic–inorganic bonding in chitosan–silica hybrid networks: Physical properties. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, [s. l.], v. 53, n. 19, p. 1391–1400, 2015.

UDOM, Innocent *et al.* Harvesting microalgae grown on wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 139, p. 101–106, 2013.

UNESCO. **Valuing water - The United Nations World Water Development Report**. [S. l.]: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2021.

VALDERRAMA, Luz T. *et al.* Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Research**, [s. l.], v. 36, n. 17, p. 4185–4192, 2002.

VASILIEVA, S. G. *et al.* Immobilized microalgae in biotechnology. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 170–176, 2016.

VOO, Wan-Ping *et al.* Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 111, n. 3, p. 294–299, 2011.

WANG, Xuefei *et al.* Factor analysis method for fluorescence excitation emission matrix. **Chemical Physics Letters**, [s. l.], v. 811, 2023.

WANG, Haiying *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggyery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 104, p. 215–220, 2012.

WANG, Yanjuan *et al.* Simultaneous Detection of Viability and Concentration of Microalgae Cells Based on Chlorophyll Fluorescence and Bright Field Dual Imaging. **Micromachines**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 896, 2021.

WANG, Hongru; WANG, Yong; ZHOU, Lizhe. Purification and recycling of Tannery degreasing wastewater by ultrafiltration with polyimide membrane. **2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering, RSETE 2011 - Proceedings**, [s. l.], p. 569–572, 2011.

WANG, Xu-Dong; WOLFBEIS, Otto S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors (2008–2012). **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 487–508, 2013.

WIEDERSCHAIN, G. Ya. Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility. **Biochemistry (Moscow)** 2007 72:6, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 675–675, 2007.

WIJFFELS, Rene H. **Immobilized Cells**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.

WWAP (United Nations World Water Assessment Programme). **The United Nations World Water Development Report 2017. Wastewater: The Untapped Resource**. Paris: [s. n.], 2017.

XIN, Li *et al.* Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, p. 5494–5500, 2010.

YUJIAN, Wang *et al.* High-rate ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* with complex of PVA and sodium alginate. [s. l.], 2006.

YUN, Yeoung-Sang *et al.* Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 451–455, 1997.

ZAMANI, Narges *et al.* Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 649–656, 2012.

ZENG, Xianhai *et al.* Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 42, p. 1385–1392, 2014.

ZHANG, Endong *et al.* Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 24, p. 6529–6534, 2012.

ZHANG, Bo-Bo *et al.* Robust and Biocompatible Hybrid Matrix with Controllable Permeability for Microalgae Encapsulation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 8, n. 14, p. 8939–8946, 2016.

ZHU, Guibing *et al.* Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. *In*: DR. DAVID M. WHITACRE (org.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springered. [S. l.]: Springer New York, 2008. p. 159–195.