

# **Universidade do Algarve**

**Instituto Superior de Engenharia**

**Utilização de macroalgas verdes como biorremediadores em  
efluentes de indústrias agroalimentares: dinâmica das vias  
metabólicas relacionadas com os compostos azotados**

**Hélder Filipe Trindade Madeira**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

**Prof. Dr. Jaime Aníbal**

**Prof. Dr. Eduardo Esteves**

**Faro, 2013**

# **Universidade do Algarve**

**Instituto Superior de Engenharia**

**Utilização de macroalgas verdes como biorremediadores em  
efluentes de indústrias agroalimentares: dinâmica das vias  
metabólicas relacionadas com os compostos azotados**

**Hélder Filipe Trindade Madeira**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:**

**Prof. Dr. Jaime Aníbal**

**Prof. Dr. Eduardo Esteves**

**Faro, 2013**

**Utilização de macroalgas verdes como biorremediadores em efluentes  
de indústrias agroalimentares: dinâmica das vias metabólicas  
relacionadas com os compostos azotados**

**Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Hélder Filipe Trindade Madeira)

**©2013 Hélder Filipe Trindade Madeira**

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível mediante o apoio e colaboração de diversas pessoas e entidades, merecedoras por isso do meu profundo reconhecimento. Em especial, pela importância relevante na execução deste trabalho, devo salientar:

O Instituto Superior de Engenharia, que aceitou o meu projeto para a obtenção do grau de mestre.

O Departamento de Engenharia Alimentar, por toda a formação que recebi até agora.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia, que acolheu o meu projeto de mestrado.

O Centro de Investigação Marinha e Ambiental, que me acolheu e disponibilizou laboratórios e meios para ser possível a realização do projeto.

A Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) pertence ao Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR, atual IPMA), pelo fornecimento de recursos necessários à concretização do projeto.

O Doutor Jaime Aníbal, pela amizade, pela orientação científica, pela sua permanente disponibilidade e incentivo, e por toda a sua partilha de conhecimento.

O Doutor Eduardo Esteves, pela amizade, pela orientação científica, pela sua permanente disponibilidade e incentivo e pela partilha do seu conhecimento estatístico.

A Doutora Cristina Veiga Pires, pela amizade, pela simpatia, pela permanente disponibilidade e principalmente pela oportunidade que me foi dada de entrar no projeto NITROLINKS, essencial para a realização do projeto.

A Engenheira Liliana Carvalho, pela amizade, pela permanente disponibilidade de ajuda e principalmente pela formação recebida, essencial para a realização do projeto.

O meu colega Fábio Mota, pela grande amizade, pela ajuda e pelos dias passados na biblioteca.

A Bujinkan Portugal, pelo grande desenvolvimento pessoal que adquiri, pelo conhecimento e pela camaradagem.

Os meus Mestres, Shidoshi Humberto Brito e Shidoshi Telma Guerreiro, por serem os meus Mestres e me iluminarem o caminho.

A Joana Lopes, pelo amor, pela paciência, pelo carinho e por estar ao meu lado nos bons e maus momentos.

E por fim, mas não em último, gostava de salientar os meus pais, Filomena e Hélder, pelo apoio, amor e carinho que sempre me deram, e os meus avós, João Mota e Maria João, por continuarem a estar comigo.

*A todos um Muito Obrigado!*

## RESUMO

*Ulva* e *Enteromorpha* são duas das algas associadas a fenômenos de eutrofização, que ocorrem naturalmente na Ria Formosa, Algarve. Estas macroalgas verdes, normalmente consideradas como problema ambiental, podem ser vistas como uma solução de biorremediação para os problemas causados pelas descargas de resíduos e efluentes provenientes de agroindústrias. Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da capacidade biorremediadora das algas *Ulva* e *Enteromorpha*. A atividade da nitrato redutase (NRA) foi testada experimentalmente nas duas algas, em diferentes condições de temperatura e salinidade. Os valores de NRA foram influenciados pela temperatura e salinidade do meio de incubação, sendo obtidos máximos para a salinidade de 36 g.L<sup>-1</sup> e temperaturas de 30 °C no caso da *Ulva* (2,767±0,148 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e 35 °C no caso da *Enteromorpha* (2,603±0,199 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Estes fatores podem assim ser utilizados para a otimização da assimilação de nitratos, num processo de biorremediação utilizando as duas algas estudadas. Um efluente proveniente de aquacultura foi utilizado para verificar a capacidade biorremediadora das duas algas. *Ulva* e *Enteromorpha* apresentaram eficiências de remoção de nutrientes (NRE) muito elevadas (acima de 95 %) apenas em uma hora de incubação. Durante a remoção de nutrientes ocorreu um período de acumulação interna, seguido de um período de metabolização dos mesmos. A assimilação de nitratos continuou a ser realizada, apesar de as algas apresentarem preferência pela amónia durante o processo de biorremediação. A utilização conjunta de nitratos e amónia, juntamente com a rapidez de remoção e acumulação destes nutrientes, pode significar uma vantagem competitiva destas algas em relação a outros *taxa*. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que *Ulva* e *Enteromorpha* têm capacidade de remover eficazmente os compostos azotados presentes na coluna de água, mostrando-se assim como potenciais candidatas para utilização em processos de biorremediação em efluentes de aquacultura.

**Palavras-chave:** Biorremediação; nitrato redutase; reservas internas de nutrientes; taxa de ingestão de nutrientes; eficácia de remoção de nutrientes; macroalgas verdes.

## ABSTRACT

*Ulva* and *Enteromorpha* are two green macroalgae associated with eutrophication phenomena, which occur naturally in the Ria Formosa, Algarve. These green macroalgae normally considered an environmental problem, may be regarded as a bioremediation solution to the problems caused by the discharge of effluents and wastes from agro-industries. The main objective of this work was to study the bioremediation capacity of the macroalgae *Ulva* and *Enteromorpha*. The nitrate reductase activity (NRA) in the two algae was tested experimentally under different conditions of temperature and salinity. Both *Ulva* and *Enteromorpha* showed higher NRA values when incubated in 36 g.L<sup>-1</sup> medium salinity and at temperatures of 30 °C for *Ulva* (2,767±0,148 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g DW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) and 35 °C for *Enteromorpha* (2,603±0,199 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g DW<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Therefore, temperature and salinity can be used to optimize the assimilation of nitrate, in a bioremediation process using both macroalgae studied. Moreover, a wastewater effluent from an aquaculture facility was used to test the bioremediation capacity of the two algae. *Ulva* and *Enteromorpha* showed high nutrient removal efficiency (over 95 %) in only one hour of incubation. During the bioremediation process it occurred a period of internal accumulation, followed by a metabolizing period. Assimilation of nitrate continued to be carried out, although it was observed that both algae prefer the assimilation of ammonia instead. The combined use of nitrate and ammonia, together with the quick removal and accumulation of these nutrients can create a competitive advantage of these algae in relation to other *taxa*. The results of this study showed that *Ulva* and *Enteromorpha* are capable of efficiently remove nitrogen compounds present in the water column, making them potential candidates for bioremediators in this type of effluents.

**Keywords:** Bioremediation; nitrate reductase; internal pools of nutrients; nutrient uptake rate; nutrient removal efficiency; green macroalgae.

# ÍNDICE DE MATÉRIAS

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Caracterização das indústrias agroalimentares .....	1
1.2. Produção de resíduos e efluentes pelas várias indústrias agroalimentares	1
1.2.1. Agricultura .....	1
1.2.2. Indústria de processamento de frutas e vegetais .....	2
1.2.3. Indústria de produção de azeite .....	3
1.2.4. Indústria de fermentação .....	3
1.2.5. Indústria de laticínios .....	3
1.2.6. Indústria de processamento de carnes .....	4
1.2.7. Aquacultura .....	4
1.3. Eutrofização em sistemas costeiros .....	5
1.4. Possíveis soluções para resolver o problema da eutrofização .....	6
1.5. Processos metabólicos em macroalgas verdes .....	7
1.5.1. Processo de assimilação de azoto inorgânico .....	7
1.5.2. Regulação dos processos de assimilação .....	9
1.6. Objetivos .....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.1. Zona de amostragem .....	12
2.2. Colheita e preparação das amostras de algas .....	13
2.3. Colheita e preparação das amostras de efluente da estação de aquacultura .....	14
2.4. Metodologias de análise .....	15
2.4.1. Determinação do teor de humidade das algas .....	15
2.4.2. Determinação da atividade da nitrato redutase (NRA) em macroalgas verdes .....	16
2.4.3. Determinação das reservas internas de azoto inorgânico (nitratos, nitritos e amónia) nas algas .....	18
2.4.4. Análise de nutrientes (nitratos, nitritos e amónia) no FIA (Flow Injection Analyser) .....	19
2.5. Estratégia experimental .....	22
2.6. Ensaio para a comparação da NRA entre as algas <i>Ulva</i> e <i>Enteromorpha</i>	23

2.7.	Ensaio preliminar de biorremediação.....	25
2.8.	Ensaio para a determinação da capacidade biorremediadora das algas em estudo num efluente de aquacultura .....	29
2.9.	Tratamento de dados .....	31
3.	RESULTADOS.....	32
3.1.	Teor de humidade das algas.....	32
3.2.	Comparação da NRA entre as algas <i>Ulva</i> e <i>Enteromorpha</i> .....	32
3.3.	Estudos preliminares de biorremediação .....	36
3.4.	Estudo das variações do azoto inorgânico durante o processo de biorremediação.....	38
4.	DISCUSSÃO .....	45
4.1.	Teor de humidade das algas.....	45
4.2.	Efeitos da temperatura e salinidade na NRA de <i>Ulva</i> e <i>Enteromorpha</i> ....	46
4.3.	Estudos preliminares de biorremediação. ....	49
4.4.	Vias metabólicas seguidas pelo azoto inorgânico durante o processo de biorremediação.....	52
4.4.1.	Remoção de nutrientes da coluna de água .....	52
4.4.2.	Evolução das reservas internas (RI) de nutrientes e da atividade enzimática da nitrato redutase (NRA) .....	57
5.	CONCLUSÕES .....	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
	ANEXOS .....	67

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Fenómeno de eutrofização no Ramalhete, perto da ilha de Faro.</b> .....	5
<b>Figura 2. Mapa e fotos da localização da zona de amostragem.</b> .....	12
<b>Figura 3. Fotos das algas recolhidas no local de amostragem.</b> .....	13
<b>Figura 4. Instalações do EPPO.</b> .....	15
<b>Figura 5. Amostras preparadas para a determinação da NRA.</b> .....	17
<b>Figura 6. Filtração de amostras para tubos de vácuo.</b> .....	18
<b>Figura 7. Analisador de fluxo contínuo (FIA).</b> .....	19
<b>Figura 8. Esquema genérico de funcionamento do FIA.</b> .....	20
<b>Figura 9. Banho termostatisado VWR®.</b> .....	24
<b>Figura 10. Câmara de incubação.</b> .....	25
<b>Figura 11. Esquema do fluxo de água entre o banho termostatisado e o banho de incubação.</b> .....	26
<b>Figura 12. Interior do Banho de incubação.</b> .....	27
<b>Figura 13. Efeito da temperatura e salinidade na variação da NRA obtida por tipo de alga.</b> .....	33
<b>Figura 14. Variação da concentração de nutrientes (<math>\text{NO}_3^-</math>, <math>\text{NH}_4^+</math> e <math>\text{NO}_2^-</math>) num efluente proveniente de aquacultura ao longo do período de incubação com as algas <i>Ulva</i> e <i>Enteromorpha</i>.</b> .....	39
<b>Figura 15. Taxas de ingestão (NUR) e eficiências de remoção (NRE) dos nutrientes (nitratos e amónia) pelas algas estudadas.</b> .....	40
<b>Figura 16. Variação das reservas internas (RI) de azoto (<math>\text{NO}_3^-</math>, <math>\text{NH}_4^+</math> e <math>\text{NO}_2^-</math>) presentes nas algas, ao longo dos ensaios.</b> .....	43
<b>Figura 17. Variação da actividade da nitrato redutase (NRA) para os dois ensaios.</b> .....	44
<b>Figura 18. Análise de nitritos no FIA</b> .....	69
<b>Figura 19. Análise da soma de nitratos mais nitritos no FIA</b> .....	71
<b>Figura 20. Análise de nitritos no FIA</b> .....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Planejamento da 1ª experiência. ....	24
Tabela 2. Planejamento da 2ª experiência. ....	30
Tabela 3. Teor de humidade em <i>Ulva</i> . ....	32
Tabela 4. Teor de humidade em <i>Enteromorpha</i> . ....	32
Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA por tipo de alga, salinidade do meio reacional e temperatura de incubação. ....	34
Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA para <i>Ulva</i> , por salinidade do meio reacional e temperatura de incubação. ....	35
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA para <i>Enteromorpha</i> , por salinidade do meio reacional e temperatura de incubação. ....	36
Tabela 8. Variação da concentração de nitratos na coluna de água, taxas de ingestão de nitratos (NUR) e eficiências de remoção de nitratos (NRE) para o ensaio de incubação com <i>Ulva</i> , numa solução de KNO <sub>3</sub> de concentração 50 µM, durante 4 horas. ....	37
Tabela 9. Variação da concentração de nitratos na coluna de água, taxas de ingestão de nitratos (NUR) e eficiências de remoção de nitratos (NRE) para o ensaio de incubação com <i>Enteromorpha</i> , numa solução de KNO <sub>3</sub> de concentração 700 µM, durante 8 horas. ....	37

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Caracterização das indústrias agroalimentares**

Quando se fala em indústrias agroalimentares, normalmente, são associadas apenas as atividades agrícolas. Contudo esta indústria é composta por um número muito diversificado de produtos e sectores. A Federação das Indústrias Portuguesas Agroalimentares reconhece os seguintes sectores: indústrias alimentares de produtos cárneos, pesca e aquacultura, frutos e produtos hortícolas, óleos e gorduras, lacticínios, cereais e leguminosas, produtos de padaria, outros produtos alimentares, alimentos compostos para animais, bebidas (FIPA, 2010). As indústrias agroalimentares são inseridas pela Classificação Portuguesa das Atividades Económicas (CAE), na divisão de Agricultura, Produção animal, Caça, Floresta e Pesca. As atividades económicas no âmbito desta divisão encontram-se estruturadas em sete grupos: Agricultura (grupos 011, 012, 013); Produção animal (grupo 014); Agricultura e produção animal combinadas (grupo 015); Atividades dos serviços relacionados com a agricultura e com a produção animal (grupo 016); Caça, repovoamento cinegético e atividades dos serviços relacionados (grupo 017) (INE, 2007).

## **1.2. Produção de resíduos e efluentes pelas várias indústrias agroalimentares**

As indústrias agroalimentares produzem resíduos e efluentes com diversas características. Estes necessitam ser tratados antes de serem descartados, para não causarem sérios problemas ambientais. Esses tratamentos podem ter uma maior ou menor dificuldade, consoante o tipo de resíduo ou efluente. Muitas vezes os custos económicos envolvidos impossibilitam, para os empresários, a viabilidade da realização dos tratamentos. Em seguida é apresentada a caracterização de alguns resíduos e efluentes provenientes de indústrias agroalimentares.

### **1.2.1. Agricultura**

Este sector tem evoluído muito ao longo dos tempos. Com o crescente crescimento da população mundial, as exigências ao sector agrícola são cada vez maiores. Deste modo, para o crescimento das culturas agrícolas é necessário que esteja cada vez mais azoto disponível nos campos. Os agricultores tradicionais tipicamente repunham o azoto

perdido ou assimilado nas suas culturas, enriquecendo os seus campos com os resíduos das colheitas, ou com os resíduos animais e humanos. Porém estes materiais contêm uma baixa concentração de azoto disponível, e os agricultores tinham que aplicar enormes quantidades para fornecer uma carga suficiente (Smil, 1997).

O aparecimento de fertilizantes, com o desenvolvimento do processo de síntese de Haber-Bosh, revolucionou o sector agrícola. Estima-se que os fertilizantes fornecem cerca de 40% do total do azoto assimilado pelas culturas. Também é estimado que cerca de um terço da proteína ingerida na dieta humana está dependente da síntese de fertilizantes (Smil, 1997).

Todos os seres vivos têm as suas necessidades específicas de nutrientes e minerais e embora necessitem de compostos azotados para viver, o excesso de uso de fertilizantes leva a que as quantidades de azoto disponível tenham níveis muito mais elevados que os necessários. O uso excessivo de fertilizantes tem levado a que ocorram contaminações de lençóis freáticos ou mesmo lixiviações dos terrenos agrícolas para rios e oceanos (Grizzetti, 2011).

### **1.2.2. Indústria de processamento de frutas e vegetais**

As indústrias que processam frutas e vegetais são uma parte importante do sector alimentar, especialmente nos países Mediterrânicos onde a agricultura ainda é vista como uma das principais fontes de rendimento. As indústrias de conserva de vegetais e frutos, de vegetais congelados, de vegetais desidratados, de frutos e vegetais secos, de polpa de fruta e de concentrados de tomate pertencem a esta categoria. Estas indústrias podem trabalhar sazonalmente se dependerem da produção de frutos e vegetais que processam. Deste modo, a poluição ambiental por estas provocada, através dos seus resíduos e efluentes, pode também ser sazonal. A composição final destes resíduos e efluentes é variável, dependendo assim dos tipos de detritos produzidos durante as etapas de processamento (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

Os resíduos e efluentes deste tipo de indústrias geralmente contêm grandes quantidades de sólidos em suspensão e teores altos de carência bioquímica de oxigénio (CBO<sup>1</sup>). A sua composição química varia e depende do tipo de fruto ou vegetal a processar. Em geral, os resíduos consistem em açúcares, fibras e quantidades relativamente pequenas de proteínas e gorduras. Os efluentes contêm compostos

---

<sup>1</sup> CBO ou Carência Bioquímica de Oxigénio, é a quantidade de oxigénio necessária para oxidar a matéria orgânica biodegradável presente na água.

dissolvidos, pesticidas, herbicidas e químicos de limpeza (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

### **1.2.3. Indústria de produção de azeite**

Os lagares de azeite representam uma importante indústria nos países do Mediterrâneo, o que os torna automaticamente numa fonte importante de resíduos e efluentes. Estima-se que durante o período de Novembro a Fevereiro cerca de 30 milhões m<sup>3</sup> de efluentes sejam gerados. O efluente é um líquido de cor escura (também chamado de “águas russas”), que contém substâncias orgânicas como os açúcares, ácidos orgânicos, poliálcoois, pectinas, coloides, taninos e lípidos. Este tipo de efluente é de difícil eliminação devido aos altos teores de CBO, CQO<sup>2</sup> e compostos fenólicos (que tornam a degradação uma tarefa complicada e dispendiosa) (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

### **1.2.4. Indústria de fermentação**

As indústrias que se baseiam em processos fermentativos são divididas em três categorias principais: produção de cerveja, produção de bebidas destiladas e produção de vinho. Cada uma destas indústrias produz efluentes com muitas características em comum, como os teores altos em CBO e CQO, mas diferem nas concentrações de compostos orgânicos. Estes efluentes têm também altas concentrações de taninos, fenóis e ácidos orgânicos (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

### **1.2.5. Indústria de lacticínios**

As indústrias de lacticínios contribuem substancialmente para a poluição das águas de superfície e dos solos. Os efluentes provenientes destas indústrias podem conter proteínas, sais, gorduras, lactose e vários tipos de químicos. Os detergentes representam a maior fatia dos químicos utilizados na produção de lacticínios. Estes podem ser alcalinos ou ácidos e são utilizados com objetivos diferentes. Os sais alcalinos são utilizados para dissolver ou remover proteínas, mas também ajudam na eliminação de gorduras através do processo de saponificação. O detergente alcalino mais utilizado é o Hidróxido de Sódio. Os ácidos são utilizados para remover depósitos inorgânicos. O ácido nítrico e o fosfórico são utilizados em separado ou em combinação, para essa

---

<sup>2</sup> CQO ou Carência Química de Oxigénio, é a quantidade de matéria orgânica susceptível de ser oxidada.

finalidade. Os detergentes alcalinos e os ácidos muitas vezes contêm aditivos para melhorar a sua capacidade de limpeza. Estes aditivos podem ser fosfatos, agentes quelantes, surfatantes e alguns componentes minoritários como os agentes dispersantes, anti espuma e inibidores (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

Além da poluição originada diretamente pelos produtos de limpeza, os efluentes contêm fósforo e azoto dos resíduos removidos pelo processo de limpeza. A presença de detergentes e dos seus aditivos influencia fortemente o teor de CQO nos efluentes provenientes das indústrias de laticínios (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

#### **1.2.6. Indústria de processamento de carnes**

As indústrias de processamento de carnes produzem as maiores quantidades de resíduos e efluentes, dentro do sector agroalimentar. Esta indústria contém matadouros e unidades de processamento onde a carne é preparada. Os matadouros são mais importantes que as outras unidades em relação à poluição ambiental. Os detritos provenientes destas unidades contêm várias quantidades de sangue, gorduras, resíduos dos intestinos, restos de comida e fezes. Deste modo, este tipo de detritos são claramente separados em resíduos (detritos sólidos) e efluentes (detritos líquidos). Os efluentes provenientes dos matadouros são tipicamente ricos em humidade (90-95 %) e azoto, têm um nível alto de CBO e têm cheiro (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001).

#### **1.2.7. Aquacultura**

O esgotamento dos recursos naturais marinhos tem levado ao desenvolvimento do sector da aquacultura. A rápida expansão da aquacultura tem contribuído para um aumento excessivo de nutrientes, especialmente azoto e fósforo, em ecossistemas aquáticos. Estes nutrientes são geralmente originados dos restos de alimentação e resíduos metabólicos das espécies cultivadas (Marinho-Soriano et al., 2009a; Yokoyama and Ishihi, 2010). Só aproximadamente 10-30 % do azoto que é fornecido em tanques, sob a forma de alimentação, é recuperado como peixe colhido. Entre 10 % a 40 % desse azoto fornecido é libertado em forma de partículas e, o restante, que é cerca de metade do azoto derivado da alimentação, é excretado sob a forma de azoto inorgânico dissolvido (nitratos, nitritos e amónia) (Yokoyama and Ishihi, 2010). A descarga direta deste tipo de efluentes em águas costeiras é uma das grandes preocupações ambientais (Marinho-Soriano et al., 2011).

### 1.3. Eutrofização em sistemas costeiros

Os ecossistemas estuarinos e lagunares costeiros estão intimamente associados com atividades económicas humanas muito intensas (Fei, 2004). Estes ecossistemas são particularmente expostos à poluição, nomeadamente dos resíduos e efluentes provenientes das indústrias agro-alimentares, ricos em compostos inorgânicos (particularmente azoto e fósforo), orgânicos, cloro (proveniente dos processos de cloração) e alguns metais pesados (Loban and Harrison, 1997). As escorrências terrestres através de rios ou de sistemas de aquíferos são as principais vias de contaminação (Fei, 2004; Loban and Harrison, 1997). O aumento da disponibilidade de nutrientes (azoto e fósforo) tem favorecido a proliferação anormal de exuberâncias (“blooms”) de macroalgas efémeras (Figura 1), nomeadamente espécies de algas verdes dos géneros *Ulva* e *Enteromorpha* e de algas vermelhas do género *Gracilaria* (Morand and Briand, 1996). Este fenómeno é também designado por eutrofização (Loban and Harrison, 1997; Nixon, 1995).



**Figura 1.** Fenómeno de eutrofização no Ramalhete, perto da ilha de Faro.

Estas algas, como espécies oportunistas com ciclos de vida curtos, podem colonizar rapidamente uma área sujeita a um impacto pontual; por outro lado, o seu ciclo de vida rápido permite-lhes desenvolver tolerância a descargas crónicas de nutrientes (Aníbal, 2004). O desaparecimento de outras espécies de algas residentes, juntamente com os herbívoros e predadores, devido à poluição, parece favorecer a proliferação de macroalgas mais efémeras, tais como *Ulva* e *Enteromorpha* (Valiela, 1995). Quando o fenómeno de eutrofização é muito extenso, o grande volume de biomassa de micro- e macroalgas começa rapidamente a decair, fazendo diminuir a concentração de oxigénio

necessária aos animais, e provocando perdas de biodiversidade (Burkholder et al., 2007; Fulweiler et al., 2012; Loban and Harrison, 1997).

#### **1.4. Possíveis soluções para resolver o problema da eutrofização**

Sabendo que os principais fatores envolvidos nos fenômenos de eutrofização provêm das atividades humanas terrestres, uma solução para esses problemas seria o controle dessas atividades na própria fonte. Para isso, a diminuição das descargas de nutrientes (carbono, azoto e fósforo) deveria ser tomada em primeira consideração. Esta não é, no entanto, uma tarefa fácil, porque exige uma grande quantidade de esforço e investimento no desenvolvimento de infraestruturas, investigação, planejamento cuidadoso e coordenação antes que os objetivos possam ser atingidos (Fei, 2004).

As algas, tendo a capacidade de utilizar este tipo de nutrientes para o seu crescimento, podem assim ser vistas como uma solução para o próprio problema com que estão normalmente relacionadas (eutrofização). Existe, portanto, um grande potencial para a remoção de enormes quantidades de nutrientes, com o cultivo extensivo de micro- e macroalgas (Fei, 2004). Neste processo é assim utilizado o conceito de biorremediação. Este é um conceito geral, que inclui todos os processos e ações utilizados para biotransformar um ambiente, já alterado por contaminantes, para as suas condições originais (Thassitou and Arvanitoyannis, 2001). A utilização de algas para a realização de processos de biorremediação é um tema já largamente estudado (Cruz-Suárez et al., 2010; Fei, 2004; He et al., 2008; Hernández et al., 2002; Huo et al., 2012; Jiménez del Río et al., 1996; Jones et al., 2001; Kang et al., 2011; Liu et al., 2010; Luo et al., 2012; Marinho-Soriano et al., 2009a, 2009b, 2011; Markou and Georgakakis, 2011; Nielsen et al., 2011; de Paula Silva et al., 2008; Sivakumar et al., 2012; Skriptsova and Miroshnikova, 2011; Troell et al., 1997; Xu et al., 2011; Yokoyama and Ishihi, 2010).

As algas produzidas neste sistema podem ter muitas aplicações comerciais e industriais. Estas podem ser utilizadas na alimentação humana, em rações animais, como principal matéria-prima para a extração de químicos e fitofarmacêuticos ou como fertilizantes orgânicos. O agar, os alginatos e as carregeninas são exemplos dos principais ficocolóides extraídos das algas. É deste modo possível promover o cultivo a larga escala de espécies com importância comercial. Este não é só um método poderoso

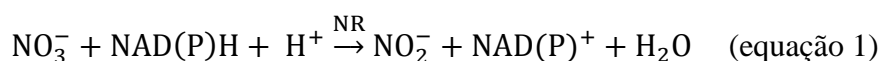
para remover grandes quantidades de nutrientes, tornando-se também um benefício para a economia local, criando empregos e fontes de produtos comercializáveis (Fei, 2004).

## 1.5. Processos metabólicos em macroalgas verdes

### 1.5.1. Processo de assimilação de azoto inorgânico

Estudos preliminares indicam que a assimilação de azoto inorgânico (incorporação de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em aminoácidos e proteínas) em macroalgas é similar ao que acontece nas microalgas, apesar do processo ser mais rápido nesse caso. Como não é conhecida nenhuma macroalga que fixe  $\text{N}_2$  da atmosfera (expecto aquelas que contêm simbioses), as fontes inorgânicas para estes organismos são os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e amónia ( $\text{NH}_4^+$ ). A amónia é a forma iónica mais reduzida de azoto e pode ser diretamente incorporada em aminoácidos. Os outros iões têm que ser primeiro reduzidos (no interior das células) para amónia antes de serem incorporados. Oito elétrões são necessários para reduzir os nitratos (estado de oxidação +5) para amónia (estado oxidação -3), e a redução ocorre em duas etapas principais (Loban and Harrison, 1997). Nestas duas etapas participam duas enzimas, nomeadamente, a nitrato redutase e a nitrito redutase (Barsanti and Gualtieri, 2006).

A primeira etapa é a redução dos nitratos a nitritos, catalisada pela enzima nitrato redutase (equação 1):



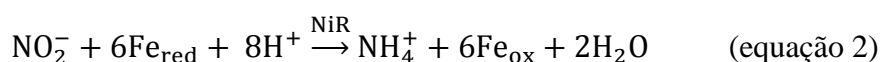
Esta enzima tem sido isolada e purificada a partir de muitas espécies de microalgas, e também está presente em macroalgas e plantas superiores (Berges, 1997; Loban and Harrison, 1997). Tem-se verificado que, nos organismos vivos, são várias as proteínas capazes de reduzir os nitratos a nitritos. Deste modo, todas as enzimas que têm esta função são denominadas nitrato redutase (NR) (Berges, 1997). Estas enzimas são moléculas relativamente grandes ( $2-5 \times 10^5$  Da), sendo-lhes reconhecidas três regiões funcionais: o domínio do NAD(P)H, o domínio do citocromo  $b_5$ , e o domínio da Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Berges, 1997; Loban and Harrison, 1997). O dador de elétrões é normalmente o NADH, apesar de algumas algas utilizarem também o NADPH. A enzima está localizada no citoplasma, apesar de se verificar que poderá também estar associada com as membranas dos cloroplastos. Esta também poderá estar

envolvida no transporte membranar de nitratos, contudo nem todos os autores concordam (Barsanti and Gualtieri, 2006; Loban and Harrison, 1997).

Técnicas para medir a atividade da NR têm sido desenvolvidas, tanto em micro- como em macroalgas. Contudo, definir o tipo de metodologias aplicadas não é fácil. No tipo de técnicas denominadas como *in vitro*, as enzimas são extraídas da célula. Desde modo são levantadas duas questões: 1) será que a enzima foi extraída na totalidade e em boas condições? 2) serão as condições do ensaio ótimas para a determinação máxima da atividade? Estes tipos de medições de atividade da NR em algas são muitas vezes difíceis. Dependendo do tipo de alga, pode-se ter mais ou menos dificuldade na sua homogeneização. A presença de compostos fenólicos nas algas, que podem inativar as enzimas e interferir no processo de determinação da atividade enzimática, também pode ser uma contrariedade na metodologia utilizada. As protéases e iões metálicos também podem ser responsáveis pela inativação da enzima durante o processo de extração (Corzo and Niell, 1991; Loban and Harrison, 1997). Para contrariar as dificuldades têm que ser adicionados vários compostos, ou acrescentadas etapas de purificação das enzimas, tornando as metodologias muito mais complexas. A segunda questão envolve a otimização das condições dos ensaios, que são dependentes do tipo de alga que se estude (Loban and Harrison, 1997).

Nos ensaios nomeados *in vivo* as enzimas não são extraídas, mas deixadas dentro da célula. Este tipo de metodologia envolve a incubação (no escuro) das algas num meio com uma concentração muito alta de nitratos e *n*-propanol (para permeabilizar as membranas das células), medindo depois a concentração de nitritos formada e libertada para o meio. Contudo, como o *n*-propanol causa a rutura das membranas e lípidos, não estamos presentes a uma situação *in vivo* real. Deste modo, tem sido sugerido que este tipo de ensaio seja melhor nomeado como uma situação *in situ* (Berges, 1997; Corzo and Niell, 1991; Loban and Harrison, 1997). Corzo & Niell (1991) tem recomendado a utilização de metodologias *in situ* porque são mantidos todos os sistemas no seu estado natural, podendo-se obter uma estimativa mais realística da atividade da NR.

Depois de os nitratos serem reduzidos a nitritos, estes são transportados para os cloroplastos para serem reduzidos a amónia. A redução é catalisada pela nitrito redutase (NiR), de acordo com a reação expressa na equação 2 (Barsanti and Gualtieri, 2006; Loban and Harrison, 1997):



A enzima utiliza como dador de eletrões uma ferridoxina reduzida ( $\text{Fe}_{\text{red}}$ ) proveniente do processo de fotossíntese (Barsanti and Gualtieri, 2006; Loban and Harrison, 1997).

A amónia produzida pelo processo de redução dos nitratos, ou a amónia diretamente incorporada da coluna de água, é assimilada em aminoácidos por um processo sequencial em que intervêm duas enzimas. Numa primeira fase a glutamina é o primeiro produto da assimilação da amónia. Este processo é mediado pela enzima Glutamina Sintetase (GS), necessitando de glutamato como substrato e ATP (equação 3) (Barsanti and Gualtieri, 2006; Loban and Harrison, 1997):



O grupo amida da glutamina é depois transferido para o ácido 2-oxoglutárico proveniente do ciclo de Krebs, sendo reduzido para formar duas moléculas de glutamato. Esta segunda reação é catalisada pela enzima glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT) (também referida como Glutamato sintetase) (equação 4) (Barsanti and Gualtieri, 2006; Loban and Harrison, 1997):



Tanto a GS como a GOGAT são encontradas nos cloroplastos, embora algumas isoenzimas (múltiplas formas da enzima com a mesma especificidade de substrato, mas com estruturas primárias geneticamente diferentes) possam ser localizadas no citoplasma (Barsanti and Gualtieri, 2006).

Uma alternativa à redução dos nitratos a nitritos no citoplasma é o armazenamento dos nitratos em vacúolos. Quantidades substanciais de nitratos podem ser acumuladas no citoplasma/vacúolos em algumas macroalgas intertidais, especialmente quando a nitrato redutase está relativamente inativa (Loban and Harrison, 1997). Além dos nitratos, também a amónia e aminoácidos livres podem ser acumulados internamente. Estas quantidades acumuladas de azoto podem ser utilizadas pelas algas em períodos de ausência de nutrientes na coluna de água (Thomas and Harrison, 1985).

### 1.5.2. Regulação dos processos de assimilação

A libertação de nitratos na coluna de água é frequentemente episódica, ocorrendo em pulsos de duração e magnitude imprevisíveis. Dependendo do tempo de residência da água no estuário, os nitratos podem estar disponíveis durante poucas horas ou durante vários dias. Consequentemente, as descargas de nutrientes na coluna de água só se

poderão traduzir em produção de biomassa, se as algas forem capazes de remover os nutrientes antes do período de renovação da água (Lartigue and Sherman, 2005).

A atividade da nitrato redutase é largamente regulada pela síntese e degradação da proteína, em que a síntese é induzida pela presença de nitratos, e a degradação pela ausência dos mesmos ou pela presença de formas mais reduzidas de azoto (Berges, 1997; Lartigue and Sherman, 2005; Teichberg et al., 2007). Deste modo, a atividade da nitrato redutase (NRA) pode ser um indicador de uma assimilação prévia de azoto (Teichberg et al., 2007). Contudo, a amónia, a luz, os ritmos circadianos, o ferro, e os metabolitos de carbono e azoto são fatores que controlam a atividade da NR (Berges, 1997; Lartigue and Sherman, 2005). Como a Nitrato Redutase é regulada por ciclos de síntese e degradação e por mecanismos pós-traducionais como a fosforilação, a NRA pode mudar rapidamente em resposta a mudanças na disponibilidade de nitratos e outros fatores de controlo (Lartigue and Sherman, 2005). A NRA é maior em algas expostas em ambientes com altas concentrações de nitratos. Por outro lado a NRA pode ser suprimida pela presença de amónia. Nas micro- e macroalgas, a amónia pode inibir a ingestão<sup>3</sup> de nitratos, inativar o sistema da NR, ou parar ou abrandar a síntese da enzima. A alga tem preferência à assimilação de amónia por não necessitar de gastar energia na sua redução, ao contrário do que acontece com os nitratos. Contudo tem sido observada proliferação de macroalgas em estuários que recebem descargas ricas em nitratos e amónia. Deste modo tanto os nitratos como a amónia podem suportar os *Blooms* de macroalgas (Teichberg et al., 2007). A amónia é assimilada pelas algas através da enzima glutamina sintetase. Deste modo, a atividade da glutamina sintetase (GSA) poderá estar envolvida no processo de assimilação de amónia reduzida intracelularmente (dos nitratos a amónia) ou naquela retirada diretamente da coluna de água (Teichberg et al., 2007). Com a medição da NRA e da GSA consegue-se medir a ingestão total de azoto inorgânico ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) (Thompson and Valiela, 1999). Contudo, a NRA e a GSA poderão não estar diretamente relacionadas com a quantidade de nutrientes existentes no exterior, mas sim dependentes das reservas internas de azoto inorgânico nas células (Teichberg et al., 2007; Thompson and Valiela, 1999). Embora as algas tenham a capacidade de armazenar azoto inorgânico, essa capacidade é finita. Deste modo, assim que as reservas estão preenchidas, a ingestão de nutrientes poderá

---

<sup>3</sup> Remoção de nutrientes do meio ambiente e transporte físico para o interior da alga (Berges, 1997).

estar dependente da taxa de assimilação<sup>4</sup> dos nutrientes acumulados. Quanto maior for a taxa de assimilação, maior vai ser a ingestão de nutrientes (Lartigue and Sherman, 2005).

## 1.6. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da capacidade biorremediadora de duas macroalgas verdes (*Ulva* e *Enteromorpha*), vistas como uma possível solução aos problemas ambientais provocados pela descarga de resíduos e efluentes, provenientes de agro-indústrias. Para concretizar o objetivo principal, foram delineados alguns objetivos específicos, nomeadamente:

- 1) Verificar o efeito da temperatura e da salinidade no processo de assimilação de nitratos de *Ulva* e *Enteromorpha*;
- 2) Verificar a capacidade de biorremediação de *Ulva* e *Enteromorpha* em relação a um efluente de uma aquacultura;
- 3) Estudar as vias metabólicas seguidas pelas formas de azoto inorgânico durante o processo de biorremediação.

---

<sup>4</sup> Processo de utilização dos nutrientes para formar moléculas orgânicas pequenas como os aminoácidos (Berges, 1997).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Zona de amostragem

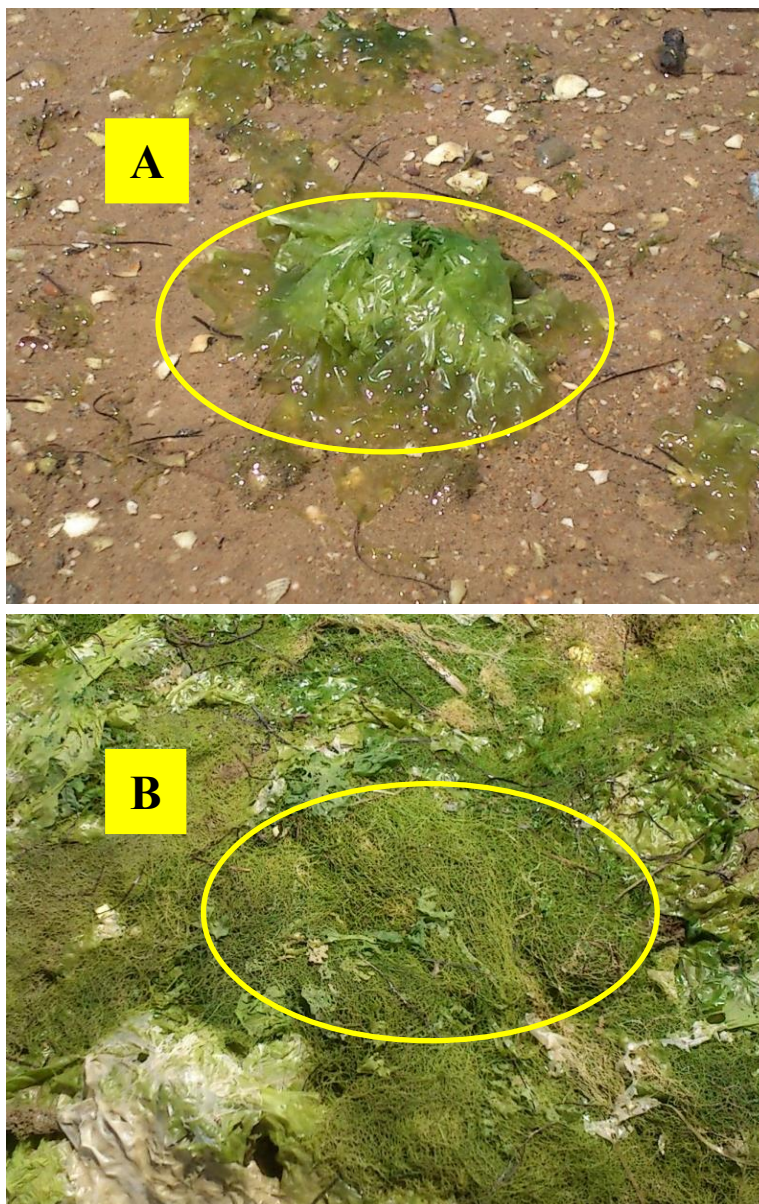
A praia de Faro localiza-se no sul de Portugal, a 8 km da cidade de Faro, na direção do aeroporto. A zona de amostragem localizou-se na praia de Faro, no interior da Ria Formosa (Figura 2). O local da amostragem das algas (*Ulva* e *Enteromorpha*) tem as coordenadas GPS 37°0'1.09"N (latitude) e 7°58'52.33"W (longitude). Por um lado, a densidade e diversidade de macroalgas neste local é elevada. Por outro lado, a distância entre a zona de amostragem e o laboratório é curta, aproximadamente 4 km. Deste modo decidiu-se escolher este local, para recolher as amostras das algas utilizadas nos ensaios efetuados neste trabalho.



**Figura 2.** Mapa e fotos da localização da zona de amostragem. Mapa retirado do Google Earth©. As algas estudadas estão presentes na mancha verde de biomassa observada nas fotografias.

## 2.2. Colheita e preparação das amostras de algas

As amostras de *Ulva* e *Enteromorpha* foram recolhidas no mesmo local (zona de amostragem, Figura 2), sempre um dia antes de cada experiência realizada. Na Figura 3 podem ser observadas as algas estudadas neste trabalho.



**Figura 3.** Fotos das algas recolhidas no local de amostragem. **A:** *Ulva*; **B:** *Enteromorpha*.

As amostras foram recolhidas e colocadas num recipiente térmico com água salgada, proveniente do local de amostragem. Algas em decomposição ou com muitas partes danificadas não foram colhidas. Após a colheita, as amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório. O percurso entre a zona de amostragem e o

laboratório não durou mais do que 10 minutos. No laboratório, as amostras foram lavadas, passando por vários recipientes com água salgada filtrada e esterilizada. Geralmente as amostras continham fragmentos agarrados de outros tipos de algas e/ou plantas superiores, ainda vivas ou já mortas (secas). Além disso, muitos organismos vivos, que se alimentam das algas e/ou se fixam nelas, estavam presentes nas amostras. Também foi necessário retirar as conchas e pedras onde estas se fixam, e a areia e lodo presente, característico da zona de amostragem. As partes danificadas das algas foram eliminadas, de modo a só se ficar com as zonas mais saudáveis (muito verdes). Depois de limpas, as algas foram colocadas em recipientes previamente descontaminados, com aproximadamente 2 L de água salgada filtrada e esterilizada, e arejamento. Os vários *taxa* estudados foram separados em diferentes recipientes.

### **2.3. Colheita e preparação das amostras de efluente da estação de aquacultura**

Para estudar o efeito biorremediador de algas em efluentes de agroindústrias, foi escolhido um efluente proveniente de uma estação de aquacultura em Olhão (Algarve, Portugal). Este tipo de efluente foi escolhido após a análise dos resultados obtidos da primeira experiência deste trabalho (v. adiante). A Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) onde foram recolhidas as amostras pertence ao Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (IPIMAR, atual IPMA). O IPMA desenvolve estudos sobre o mar e os seus recursos vivos desde 1919, quando foi criada a estação de Biologia Marítima, com a sede no Aquário Vasco da Gama. A EPPO é uma estrutura de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico, dimensionada de modo a realizar, à escala pré-industrial, ensaios de produção de espécies com atual ou potencial interesse aquícola para a aquacultura nacional. A estação ocupa uma área de cerca de 7 ha, em terrenos do Parque Natural da Ria Formosa, e é composta por uma maternidade, uma zona de pré-engorda intensiva, uma zona de engorda semi-intensiva em tanques de terra e áreas destinadas a estudos de âmbito ambiental.

As amostras foram recolhidas de um tanque (J4), pertencente à zona de pré-engorda intensiva (Figura 4), construído em fibra de vidro e com capacidade de 9 m<sup>3</sup>. A espécie cultivada neste tanque é a corvina (*Argyrosomus regius*). A carga de peixe neste tanque, em Maio de 2012, foi de 1,1 kg/m<sup>3</sup>. Em Julho de 2012, altura em que foram realizadas as amostragens, a carga de peixe estava nos 3,6 kg/m<sup>3</sup>. Nesta zona, os tanques são

purgados 2 vezes por dia (de manhã e ao fim da tarde) para retirar os restos de comida. Em cada purga são retirados cerca de 0,5 m<sup>3</sup> de água. Os tanques têm volume constante (9 m<sup>3</sup>), embora esteja sempre a sair (por baixo) e a entrar (por cima) água salgada. O fluxo de saída/entrada, determinado por volumetria, foi cerca de 1 L/s. A salinidade da água presente nos tanques é cerca de 35 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 4.** Instalações do EPPO. Zona de pré-engorda intensiva de onde foram recolhidas as amostras de efluente (IPIMAR, 2013).

As amostragens foram realizadas mergulhando recipientes descontaminados de 5 L no tanque, até estarem cheios. Os recipientes foram transportados de imediato (<20 minutos) para o laboratório. No laboratório, as amostras foram imediatamente filtradas através de um filtro de acetato de celulose (Millipore,  $\phi$  0,45  $\mu$ m), montado num funil de Büchner conectado a um Kitasato e a uma bomba de vácuo. Com a filtração foram eliminadas as impurezas existentes nas amostras e que poderiam comprometer as metodologias de análise utilizadas. As amostras filtradas foram transferidas para novos recipientes descontaminados de 5 L e logo utilizadas nas experiências.

## **2.4. Metodologias de análise**

### **2.4.1. Determinação do teor de humidade das algas**

Os cálculos efetuados neste trabalho foram efetuados com a massa de alga seca (PS). Para isso foi necessário determinar o teor de humidade das algas em estudo. Porções de 1-3 g de cada alga foram pesadas (em triplicado) em cadinhos e colocadas numa estufa a 60 °C. Após um período de 24 h, os cadinhos foram retirados da estufa e colocados

num exsiccador até atingir a temperatura ambiente. Foram realizadas experiências prévias que garantem que 24 horas são suficientes para garantir a secagem completa das amostras de algas. Os cadinhos foram de novo pesados e foi calculado o teor de humidade das amostras:

$$\%H = \frac{(m_H - m_s)}{m_H} \times 100$$

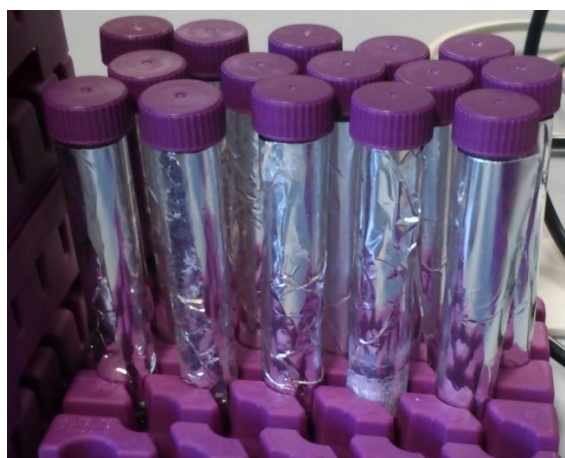
em que %H é o teor de humidade das algas em estudo (%);  $m_H$  é a massa de alga húmida (g); e  $m_s$  é a massa de alga seca (g).

#### **2.4.2. Determinação da atividade da nitrato redutase (NRA) em macroalgas verdes**

Neste trabalho foi verificada a atividade enzimática da nitrato redutase (*nitrate reductase activity*, NRA). Para determinar a NRA foi utilizado o método *in situ*, descrito por Corzo and Niell (1991). O método escolhido não utiliza técnicas de extração da enzima, que exigem a destruição dos tecidos celulares. Ao invés disso, a enzima é mantida no interior da célula viva, sendo a parede celular permeabilizada para poderem ser medidos os produtos da reação. Esta metodologia além de ser uma alternativa aos métodos *in vitro*, é uma aproximação experimental muito interessante do estudo dos sistemas de redução de  $\text{NO}_3^-$  (nitratos), em condições próximas do que acontece na Natureza (*in vivo*) (Berges, 1997; Corzo and Niell, 1991). O método original foi ligeiramente adaptado para as condições de trabalho existentes. A metodologia foi originalmente desenvolvida para trabalhar com *Ulva rígida* (Corzo and Niell, 1991). Neste trabalho foi utilizada esta metodologia para determinar a NRA em *Ulva* e em *Enteromorpha*.

Para a execução da técnica foram pesadas porções de 0,25-0,30 g de alga. As amostras foram cortadas em pequenas parcelas (para aumentar a homogeneidade da amostra durante o período de incubação) e introduzidas em tubos Falcon contendo 10 mL de um meio de incubação. Este meio tem na sua constituição uma solução tampão, um composto capaz de permeabilizar a membrana celular da alga (1-propanol), uma fonte de nitratos ( $\text{KNO}_3$ ) e uma fonte de poder redutor (glucose). A constituição do meio de incubação utilizado correspondeu ao descrito no método *in situ* original (Corzo and Niell, 1991). O meio foi composto por uma solução tampão fosfato 0,1 M pH 8, com:  $\text{KNO}_3$  30 mM, glucose 10  $\mu\text{M}$ , 0,1 % 1-propanol e Na-EDTA 0,05 mM. Os tubos com as amostras foram selados e cobertos com papel de alumínio, antes de serem

colocados num banho termostatzado durante um período de incubação de 1 h (Figura 5).

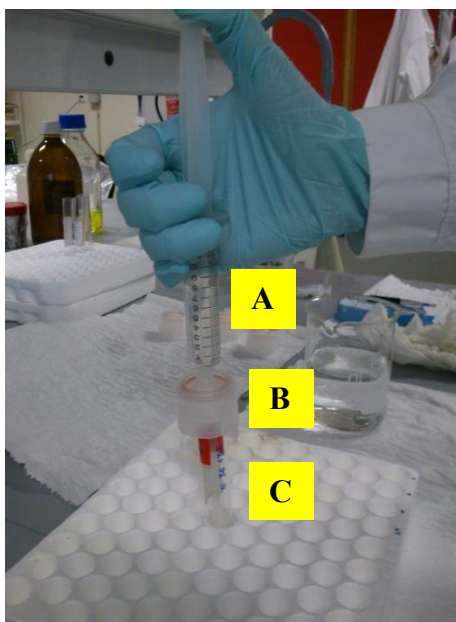


**Figura 5.** Amostras preparadas para a determinação da NRA.

Na metodologia original a temperatura utilizada no banho de incubação foi de 30 °C (Corzo and Niell, 1991). Neste trabalho, a temperatura do banho variou de acordo com a experiência em causa (v. adiante). Os ensaios foram realizados no escuro para evitar a redução de  $\text{NO}_2^-$  mediada pela nitrito redutase, através de mecanismos associados à fotossíntese. No final do período de incubação, os tubos foram colocados num banho de água quente (>80 °C) durante 3 min. Esta etapa garantiu a inativação enzimática do sistema celular das amostras. Os tubos foram arrefecidos até à temperatura ambiente, antes de serem vertidos para seringas acopladas a filtros de acetato de celulose (Whatman GF/C,  $\phi$  0,45  $\mu\text{m}$ ) para realizar a filtração. No sistema de filtração foi conectada uma agulha para injetar as amostras filtradas em tubos de vácuo (Figura 6). As amostras filtradas foram armazenadas num frigorífico (<5 °C) até à sua análise. Estas foram analisadas por espectrofotometria de absorção molecular, num analisador de fluxo contínuo (*Flow Injection Analyser*). A concentração de nitritos presente nas amostras foi quantificada. A atividade enzimática da nitrato redutase foi calculada:

$$\text{NRA} = \frac{C \times V}{m_s \times t}$$

onde NRA é a atividade enzimática da nitrato redutase ( $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ); C é a concentração de nitritos na amostra ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); V é o volume de incubação (L);  $m_s$  é a massa de alga seca (g PS); e t é o tempo de incubação da amostra (h).



**Figura 6.** Filtração de amostras para tubos de vácuo. **A:** seringa; **B:** equipamento de filtração; **C:** tubo de vácuo.

#### **2.4.3. Determinação das reservas internas de azoto inorgânico (nitratos, nitritos e amónia) nas algas**

Neste trabalho foi necessário determinar as reservas internas de azoto inorgânico (nitratos, nitritos e amónia) nas algas em estudo (v. adiante). A metodologia de análise utilizada foi a descrita inicialmente por Young et al. (2009).

Amostras com cerca de 0,05-0,07 g de alga foram trituradas num cadinho até à homogeneização total. O homogeneizado foi recolhido fazendo passar no interior do cadinho quatro frações de 5 mL de água desionizada. Cada fração da mistura foi recolhida para um tubo Falcon de 50 mL, obtendo-se no final a amostra homogeneizada num volume de 20 mL de água desionizada. Os tubos Falcon com as amostras foram colocados num banho de água quente ( $>80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 45 min, para desnaturar os processos biológicos das algas e diluir os nutrientes no meio. Os tubos foram arrefecidos até à temperatura ambiente antes de serem centrifugados a 3500 rpm durante 8 min, para reduzir os sólidos em suspensão e facilitar a filtração. A fração sobrenadante foi retirada (com uma pipeta automática) e transferida para uma seringa acoplada a um filtro de acetato de celulose (Whatman GF/C,  $\phi$  45  $\mu\text{m}$ ). As amostras foram filtradas para tubos em vácuo de 12 mL (cada amostra originou dois tubos) e posteriormente armazenadas num frigorífico ( $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até à sua análise. A concentração de nitratos, nitritos e amónia presente nas amostras foi quantificada por espectrofotometria de

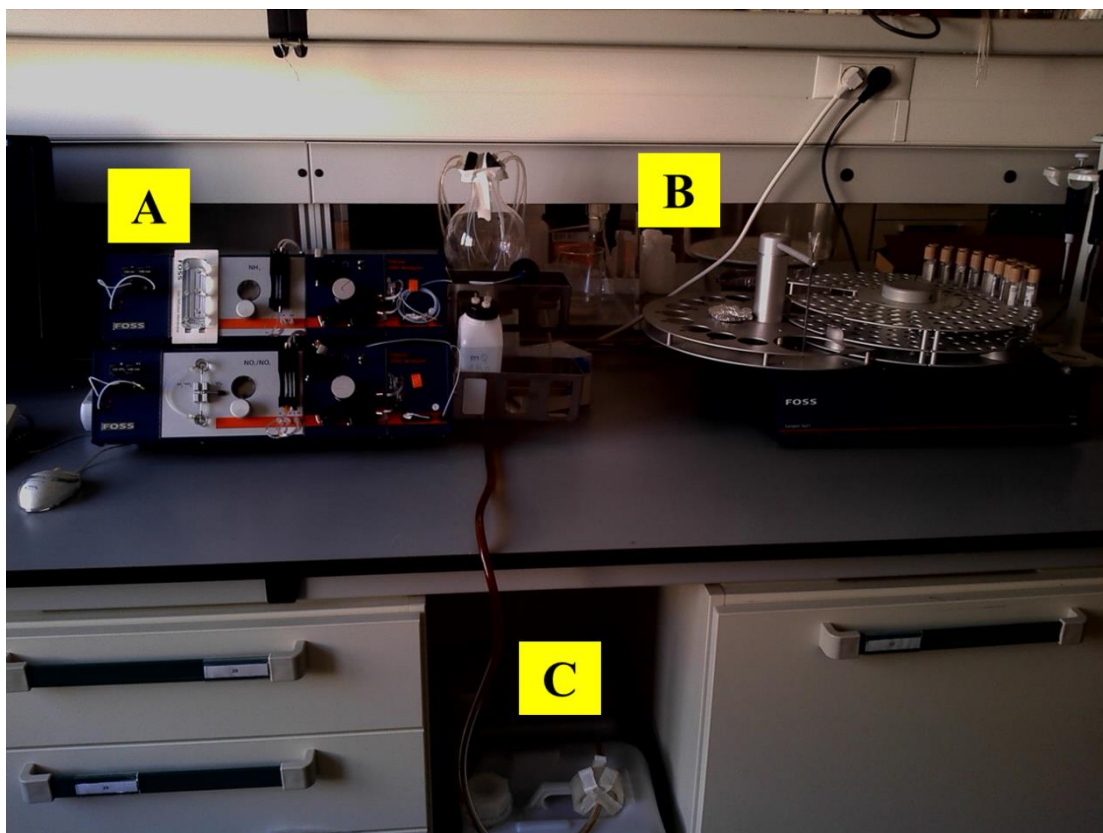
absorção molecular, num analisador de fluxo contínuo (*Flow Injection Analyser*). As reservas internas de cada forma de azoto inorgânico ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) foram calculadas:

$$\text{RI}_i = \frac{C_i \times V}{m_s}$$

onde  $\text{RI}_i$  é a reserva interna de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) ou amónia ( $\text{NH}_4^+$ ) ( $\mu\text{mol nutriente.g PS}^{-1}$ );  $C_i$  é a concentração de nitratos, nitritos ou amónia presente nas amostras ( $\mu\text{mol nutriente.L}^{-1}$ );  $V$  é o volume de incubação; e  $m_s$  é a massa de alga seca (g PS).

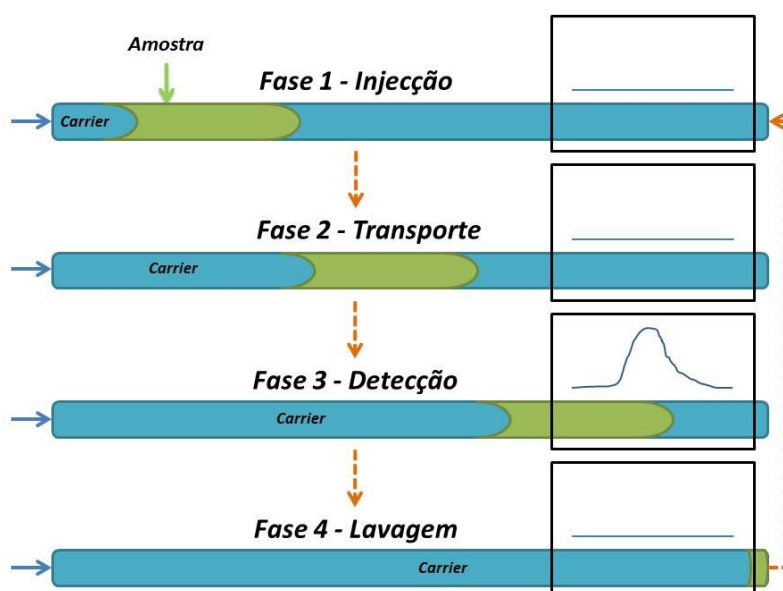
#### 2.4.4. Análise de nutrientes (nitratos, nitritos e amónia) no FIA (*Flow Injection Analyser*)

As amostras resultantes das experiências descritas adiante foram analisadas por espectrofotometria de absorção molecular, utilizando um analisador de fluxo contínuo (*Flow Injection Analyser* – FIA; Figura 7).



**Figura 7.** Analisador de fluxo contínuo (FIA). **A:** FIA; **B:** *auto-sampler*; **C:** saída do sistema.

O princípio de funcionamento deste equipamento baseia-se na injeção de uma amostra líquida numa corrente contínua de um líquido de transporte adequado (*carrier*). A amostra injetada forma uma zona, que é transportada pelo *carrier* em direção a um detetor, que mede continuamente as mudanças de absorvância ao longo da corrente. Este processo divide-se em quatro fases principais: 1) injeção da amostra; 2) transporte da amostra pelo *carrier* até ao detetor; 3) deteção da mudança de absorvância na corrente, provocada pela passagem da amostra pelo detetor; 4) lavagem do sistema para remover a amostra. Após a última fase, o sistema está imediatamente pronto para receber a amostra seguinte e repetir-se o ciclo de análise (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema genérico de funcionamento do FIA.

O analisador utilizado foi o *FIAstar 5000* da FOSS® (Figura 7) e o *software* de recolha e leitura dos resultados foi o *soFIA*®. Este equipamento contém dois módulos de análise: um para a determinação da concentração de nitritos ou da soma de nitratos e nitritos (analisador 1); e outro para a análise de amónia (analisador 2). O equipamento tem também acoplado um sistema de autoanálise (*auto-sampler*), que permite a autonomização da injeção das amostras. Os parâmetros das amostras analisados neste equipamento foram: 1) concentração de nitritos ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); 2) concentração da soma de nitratos e nitritos ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ); e 3) concentração de amónia ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).

A metodologia de análise neste tipo de equipamento é muito sensível e são necessárias várias etapas até se obterem os resultados finais. Os procedimentos

utilizados para a determinação da concentração da soma de nitratos e nitritos e da concentração de nitritos, foram os descritos nos manuais da FOSS® (*Application Note 5201* e *5200*, respetivamente), que estão de acordo com a norma ISO 13395(1996). A metodologia utilizada para determinação da concentração de amónia também foi a descrita nos manuais da FOSS® (*Application Note 5220*), de acordo com a norma ISO 11732(2005). O resumo da metodologia utilizada encontra-se descrito no Anexo I do presente documento.

### **Nitritos**

A quantificação da concentração de nitritos foi realizada através da adição de uma solução ácida de sulfanilamida e uma solução de N-(1-naftil)-etileno diamina dicloridrato (NED). Estes compostos reagem com os nitritos formando um composto azotado de cor roxa, o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente a 540 nm (manual FOSS® - *Application Note 5200*). Estes princípios de método são descritos por Grasshoff et al. (1983). O limite de deteção do equipamento para a determinação da concentração de nitritos é cerca de  $0,007 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### **Nitratos**

A amostra contendo nitratos e nitritos foi misturada com uma solução tampão (pH 8,5; v. Anexo I). Os nitratos presentes na amostra são reduzidos a nitritos numa coluna redutora de cádmio. Os nitritos provenientes da coluna de redução, e os já existentes inicialmente na amostra, reagem com uma solução ácida de sulfanilamida e com uma solução de NED, para formar um composto azotado de cor roxa, o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente a 540 nm (manual FOSS® - *Application Note 5201*). Estes princípios de método são descritos por Grasshoff et al. (1983). O limite de deteção do equipamento para a determinação da concentração de nitratos mais nitritos é de  $0,036 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A concentração de nitratos calcula-se através da diferença entre a concentração de nitratos mais nitritos e a concentração de nitritos.

### **Amónia**

A quantificação da concentração de amónia foi realizada através da adição de uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH). Desta mistura alcalina forma-se amoníaco, que pode ser difundido através de uma membrana permeável a gás, para uma corrente de solução indicadora. A solução indicadora compreende uma mistura de indicadores

ácido-base, que vão reagir com o gás de amónia. A mudança de cor resultante pode ser quantificada espectrofotometricamente a 590 nm (manual FOSS® - *Application Note 5220*). Estes princípios de método são descritos por Grasshoff et al. (1983). O limite de deteção do equipamento para a determinação da concentração de amónia é de 0,071  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

## 2.5. Estratégia experimental

A nitrato redutase é um grupo de enzimas associadas ao processo de assimilação de nitratos em macroalgas verdes (Berges, 1997). A medição da sua atividade permite monitorizar o processo de assimilação de nitratos pela alga numa coluna de água. Esta atividade enzimática, a uma concentração conhecida de nutrientes, pode variar tendo em conta o tipo de alga e as condições de temperatura e salinidade. De modo a analisar o efeito da variação de temperatura e salinidade na atividade enzimática da nitrato redutase (NRA), foi planeada uma experiência inicial onde foram testados em simultâneo os seguintes fatores: tipo de alga (*Ulva* ou *Enteromorpha*), temperatura de incubação (10, 20, 30, 35 e 40 °C) e salinidade do meio de incubação (0, 15 e 36  $\text{g.L}^{-1}$ ).

As algas podem ser utilizadas como agentes biorremediadores em efluentes provenientes de agroindústrias. No contexto dos estudos de biorremediação, é importante a determinação de dois parâmetros: 1) a eficácia de remoção dos nutrientes (*Nutrient removal efficiency*, NRE); 2) e a taxa de ingestão de nutrientes (*Nutrient uptake rate*, NUR). Antes de se realizar uma experiência de biorremediação mais complexa, foram planeados dois ensaios mais simples com a macroalga verde *Ulva*, de forma a verificar o comportamento da alga perante a disponibilidade de diferentes concentrações de nitratos. No primeiro ensaio a alga foi incubada numa solução de  $\text{KNO}_3$  50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , durante 4 h. No segundo ensaio a alga foi incubada numa solução de  $\text{KNO}_3$  700  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , durante 8 h. Os parâmetros NRE e NUR foram determinados ao longo do período de incubação.

Num processo de biorremediação as algas captam o azoto inorgânico proveniente de um efluente, e incorporam-no nas suas estruturas moleculares. O percurso do azoto inorgânico, desde a sua captação até à incorporação, pode seguir diferentes caminhos. Para estudar um tratamento real de biorremediação aplicando as duas algas em estudo, foram planeadas duas experiências adicionais. As experiências foram semelhantes, tendo sido só variado o tipo de alga utilizada (*Ulva* ou *Enteromorpha*). As vias

metabólicas seguidas pelas formas de azoto inorgânico, durante o processo de incubação, também foram controladas. No processo de biorremediação estudado, foi utilizado um efluente proveniente de aquacultura (v. acima). As algas foram incubadas no efluente durante 4 h e foram definidos sete momentos de amostragem (0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3h e 4 h). Em cada momento de amostragem foram analisados os seguintes parâmetros: 1) concentração dos nutrientes na coluna de água (CA); 2) parâmetros de biorremediação das algas (NRE e NUR); 3) atividade enzimática da nitrato redutase (NRA); e reservas internas de azoto inorgânico (RI).

## **2.6. Ensaio para a comparação da NRA entre as algas *Ulva* e *Enteromorpha***

Este ensaio foi realizado no dia seguinte à colheita e preparação das amostras. Durante este período de tempo, as algas foram mantidas em recipientes descontaminados à temperatura ambiente e expostas à radiação solar (v. secção 2.2.). Esta etapa teve como objetivo a aclimatização das amostras, na tentativa de esgotamento das reservas internas de nutrientes nas algas.

Nesta experiência foram comparadas as NRA entre as espécies de algas em estudo (*Ulva* e *Enteromorpha*), variando mais dois fatores: a temperatura (10, 20, 30, 35 e 40 °C) e a salinidade (0, 15 e 36 g.L<sup>-1</sup>) do meio de incubação da experiência. O banho termostatisado (VWR©; Figura 9) onde decorreram os ensaios foi ligado cerca de 30 minutos antes de se iniciar a experiência. Enquanto se aguardou pela estabilização da temperatura do banho, as algas foram preparadas i.e. removeu-se o excesso de água com o auxílio de uma centrifugadora manual e papel adsorvente. Porções de 0,25-0,30 g de algas foram pesadas, colocadas em tubos com meio de incubação (com diferentes salinidades) e incubadas durante 1 hora (v. secção 2.4.2.) à temperatura pré-definida para o ensaio. Para o meio de incubação de salinidade 0 g.L<sup>-1</sup> foi utilizada água desionizada (Elix®) para a preparação dos reagentes. Para os meios de incubação de salinidades 15 g.L<sup>-1</sup> e 36 g.L<sup>-1</sup>, foram utilizadas soluções de NaCl de concentrações 15 g.L<sup>-1</sup> e 36 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente.

Para cada alga testaram-se todas as 15 combinações de 5 temperaturas e 3 salinidades – plano experimental completamente aleatorizado –, em triplicado. Adicionalmente realizaram-se 2 ensaios “brancos” i.e. tubo sem alga, só com meio de incubação (Tabela 1).



**Figura 9.** Banho termostatisado VWR©.

**Tabela 1.** Planejamento da 1ª experiência. Ensaios realizados na experiência para a comparação das NRA entre as duas espécies em estudo, variando a temperatura de incubação e o meio reacional.

	Salinidade do meio de incubação			<i>Total</i>	
	<i>0 g.L<sup>-1</sup></i>	<i>15 g.L<sup>-1</sup></i>	<i>36 g.L<sup>-1</sup></i>		
<b>Temperatura de incubação</b>	<b>10 °C</b>	3U + 2B	3U + 2B	3U + 2B	30 Amostras
		3E + 2B	3E + 2B	3E + 2B	
	<b>20 °C</b>	3U + 2B	3U + 2B	3U + 2B	30 Amostras
		3E + 2B	3E + 2B	3E + 2B	
	<b>30 °C</b>	3U + 2B	3U + 2B	3U + 2B	30 Amostras
		3E + 2B	3E + 2B	3E + 2B	
	<b>35 °C</b>	3U + 2B	3U + 2B	3U + 2B	30 Amostras
		3E + 2B	3E + 2B	3E + 2B	
	<b>40 °C</b>	3U + 2B	3U + 2B	3U + 2B	30 Amostras
		3E + 2B	3E + 2B	3E + 2B	
	<b>Total</b>	50 Amostras	50 Amostras	50 Amostras	<b>150 Amostras</b>

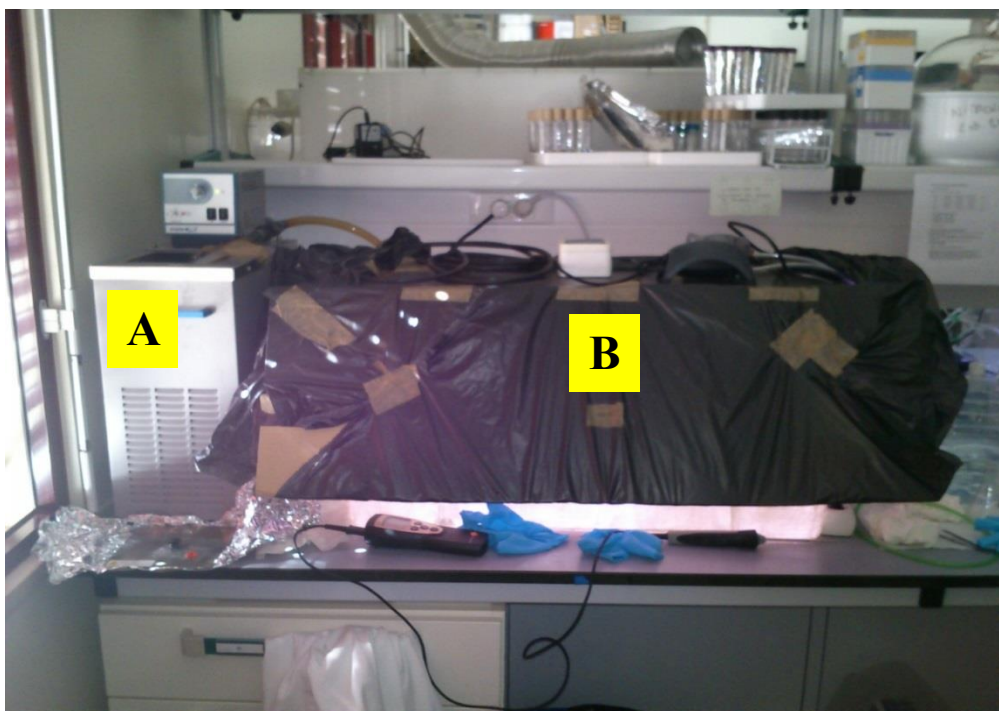
**Legenda:** U – *Ulva*; E – *Enteromorpha*; B – Branco.

No final dos ensaios as amostras processadas foram armazenadas no frigorífico (<5 °C). As amostras foram analisadas por espectrofotometria de absorção molecular, utilizando um analisador de fluxo contínuo (*Flow Injection Analyser – FIA*) (v. secção 2.4.4.). A concentração de nitritos presente nas amostras foi quantificada para a determinação da NRA.

## 2.7. Ensaios preliminares de biorremediação

Para preparar o estudo mais complexo do efeito biorremediador de macroalgas verdes, julgou-se necessário planear dois ensaios preliminares mais simples. Nas duas experiências foi utilizada *Ulva*. Esta escolha esteve relacionada com a sua abundância no local de amostragem e pela sua facilidade de manuseamento.

Antes de se iniciarem as experiências foi necessário construir uma câmara de incubação (Figura 10), para criar condições controladas de temperatura e luminosidade nos estudos de biorremediação.

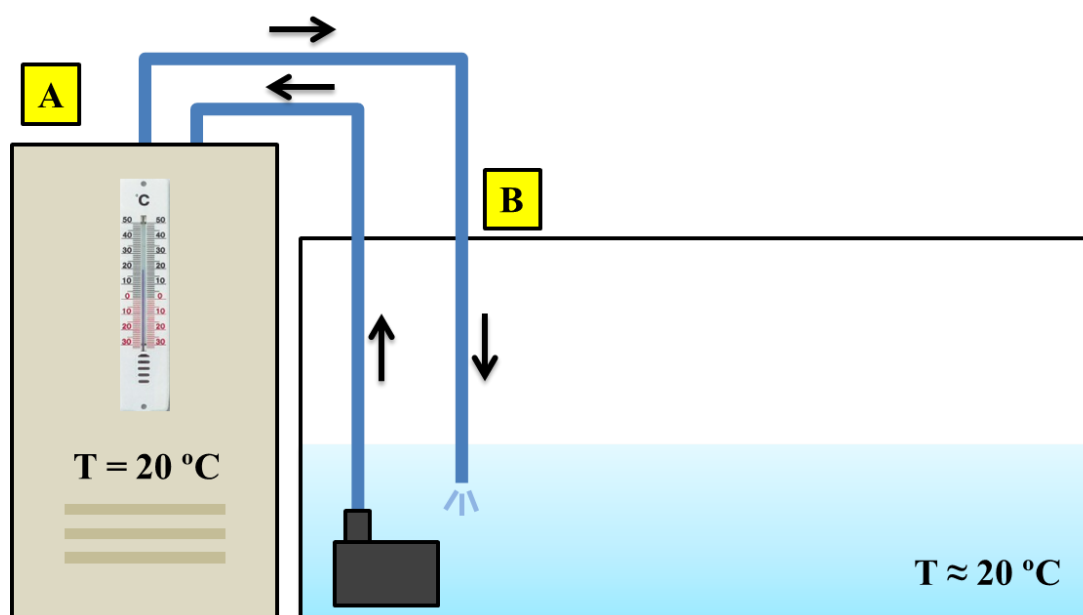


**Figura 10.** Câmara de incubação. **A:** Banho termostaticado; **B:** Banho de incubação com sistema de iluminação.

A câmara foi constituída por dois blocos principais: A) um banho termostaticado (VWR©), com um reservatório de 6 L e com um fluxo máximo de  $15 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; e B) um

banho de incubação com sistema de iluminação, com uma capacidade máxima de 65 L. A capacidade prática deste banho foi de 12 L. O banho foi construído a partir de uma caixa de material plástico transparente (polipropileno, PP). A caixa foi pintada de branco para ficar completamente opaca, de modo a que a única luz refletida no banho fosse a do seu próprio sistema de iluminação. Para suportar o sistema de iluminação foi construído um suporte em madeira. No sistema de iluminação foram utilizadas duas lâmpadas OSRAM® (L 18W/77) Fluora®, específicas para a estimulação dos processos de fotossíntese. O regime de intensidade luminosa aplicado neste ensaio, e nos outros doravante explicados, esteve entre 30 e 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . O sistema foi coberto com um saco de plástico preto para diminuir a interferência da iluminação exterior (Figura 10B).

Entre os dois banhos (termostatizado e de incubação) foi criado um fluxo de água (Figura 11), através de um sistema de tubagens.

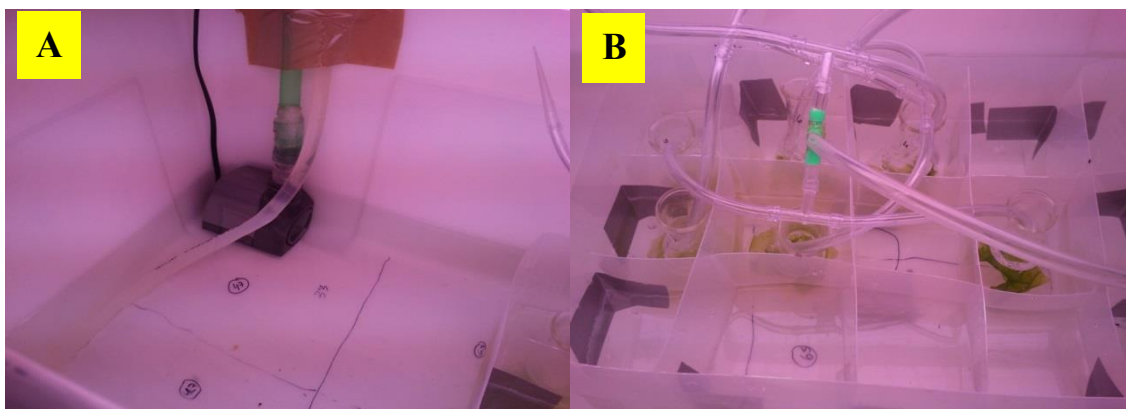


**Figura 11.** Esquema do fluxo de água entre o banho termostático e o banho de incubação. **A:** Banho termostático; **B:** Banho de incubação.

O banho termostático regulou a temperatura do banho de incubação (Figura 11A), circulando a água por diferença de altura. Como o banho de incubação (Figura 11B) estava a uma altura mais baixa, fez-se o refluxo para o banho termostático com o auxílio de uma bomba de água (Figura 12A). O caudal foi aproximadamente igual nos dois sentidos, tendo em conta que à saída da bomba de água se encontrava uma válvula para controlar o caudal. O sistema era ligado aproximadamente meia hora antes do início dos ensaios, de modo a atingir a temperatura desejada. A temperatura utilizada

nas experiências de biorremediação foi de 20 °C. Esta temperatura foi escolhida por se considerar um valor próximo da média das águas na Ria Formosa ao longo do ano (Aníbal, 2004).

Uma grelha de suporte em plástico, com capacidade para 18 balões Erlenmeyers de 100 mL, foi também criada, para colocar dentro do banho de incubação durante as experiências (Figura 12B).



**Figura 12.** Interior do Banho de incubação. **A:** bomba de recirculação da água; **B:** grelha de suporte.

Nesta experiência preliminar, o efeito biorremediador de *Ulva* foi estudado com base na dinâmica temporal da concentração de nitratos no meio. As experiências foram realizadas com um dia de diferença. Cada ensaio foi realizado no dia seguinte à recolha e preparação das amostras. Durante este período, as algas foram mantidas (à temperatura ambiente) no banho de incubação (com a iluminação ligada) – processo de pré-incubação – com o objetivo da aclimatização das amostras, na tentativa de esgotamento das reservas internas de azoto inorgânico das algas.

No dia da experiência, as algas foram retiradas da câmara de incubação e colocadas numa centrifugadora manual e depois em papel adsorvente para remover o excesso de água. Na câmara de incubação foram colocados balões Erlenmeyer de 100 mL com 100 mL de uma solução de  $\text{KNO}_3$  (fonte de nitratos) de concentração conhecida. A temperatura nos balões Erlenmeyer foi deixada estabilizar à temperatura do banho de incubação (20 °C). No início dos ensaios, porções de 0,4 g de amostra foram colocadas no interior dos balões. As amostras receberam arejamento através de um sistema de tubagens ligado a bombas de ar.

No primeiro ensaio as amostras foram incubadas numa solução de  $\text{KNO}_3$  de concentração  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e salinidade  $36 \text{ g.L}^{-1}$ . O ensaio foi realizado em triplicado, existindo três amostras por cada momento de amostragem. As amostragens foram realizadas às 0 h, 1 h, 3 h e 4 h. No segundo ensaio as amostras foram incubadas numa solução de  $\text{KNO}_3$  de concentração  $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e salinidade  $36 \text{ g.L}^{-1}$ . Neste caso, o ensaio foi realizado em duplicado, existindo duas amostras por cada momento de amostragem. As amostragens foram realizadas às 0 h, 1 h, 4 h e 8 h.

Em cada momento de amostragem, os balões Erlenmeyer foram retirados do banho de incubação. Nesse momento, as algas foram imediatamente removidas do interior dos balões, de modo a terminar o processo de biorremediação. De cada balão, filtrou-se uma amostra da coluna de água com uma seringa, através de um filtro de acetato de celulose (WHATTMAN GF/C,  $\phi 0,45\mu\text{m}$ ), para tubos de 12 mL em vácuo. No final de cada ensaio as amostras processadas foram armazenadas no frigorífico ( $<5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) até à determinação da concentração de nitratos utilizando o FIA (cf. secção 2.4.4.).

As taxas de ingestão de nutrientes a cada momento de amostragem foram calculadas da seguinte forma (Xu et al., 2011):

$$\text{NUR} = \frac{(C_0 - C_t) \times V}{m_s \times \Delta t}$$

onde NUR (*Nutrient uptake rate*) é a taxa de ingestão de nutrientes ( $\mu\text{mol nutriente.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ );  $C_0$  e  $C_t$  são as concentrações dos nutrientes no início ( $t = 0 \text{ h}$ ) e fim da experiência (momento de amostragem), respetivamente ( $\mu\text{mol nutriente.L}^{-1}$ );  $V$  é o volume de incubação (L);  $m_s$  é a massa de alga seca (g PS); e  $\Delta t$  é o intervalo de tempo entre o início e fim da experiência (h).

Por outro lado, a eficiência de remoção dos nutrientes da coluna de água a cada momento de amostragem foi calculada através de (Xu et al., 2011):

$$\text{NRE} = 100 - \left( \frac{C_t}{C_0} \times 100 \right)$$

em que NRE (*Nutrient removal efficiency*) é a eficiência de remoção dos nutrientes (%), e  $C_0$  e  $C_t$  são as concentrações dos nutrientes no início e fim da experiência, respetivamente.

## **2.8. Ensaio para a determinação da capacidade biorremediadora das algas em estudo num efluente de aquacultura**

De modo a estudar a capacidade biorremediadora das algas em estudo (*Ulva* e *Enteromorpha*) num efluente real, foram planeadas duas experiências. Para isso estudou-se a dinâmica temporal da concentração de nitratos e amónia num efluente proveniente de aquacultura, durante um período de incubação. Também foram estudados as diferentes vias metabólicas seguidas pelo azoto inorgânico, durante o processo de biorremediação.

Os ensaios com *Ulva* e *Enteromorpha* foram realizados com uma semana de diferença. As algas foram recolhidas e preparadas utilizando a metodologia descrita na secção 2.2. As amostras foram colhidas num dia e a experiência foi realizada no dia seguinte. Durante esse intervalo de tempo, as amostras foram colocadas na câmara de incubação para um período de pré-incubação. Esta metodologia inicial foi em tudo semelhante àquela utilizada nos ensaios preliminares (v. secção 2.7). O efluente utilizado foi recolhido e preparado de acordo com a metodologia descrita na secção 2.3. A recolha de efluente foi efetuada no próprio dia de cada ensaio realizado.

Depois do período de pré-incubação as amostras foram retiradas da câmara de incubação, tendo sido retirado o excesso de água com o auxílio de uma centrifugadora manual e papel adsorvente. Na câmara de incubação foram colocados balões Erlenmeyers de 100 mL com 100 mL de efluente proveniente de aquacultura, assim como 3 *gobelets* com 500 mL de efluente, que permitiram perceber se existiram oscilações na concentração dos nutrientes durante a experiência. Após a estabilização da temperatura do banho de incubação (20 °C), as porções de alga (0,4 g) foram introduzidas rapidamente nos balões. As amostras foram incubadas com arejamento durante um período de 4 horas. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Definiram-se sete momentos de amostragem: 0 h; 15 min; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h; e 4 h. Em cada momento de amostragem, os Erlenmeyers foram retirados rapidamente da câmara de incubação, e as algas retiradas imediatamente de dentro dos mesmos, para garantir a interrupção dos processos. O excesso de efluente das algas foi removido com papel adsorvente. De cada porção de alga pesou-se 0,05-0,07 g para determinação das reservas internas de azoto (RI), e 0,25-0,30 g para a determinação da atividade da nitrato redutase (NRA). Para a determinação da NRA foi utilizada uma salinidade do meio reacional de 36 g.L<sup>-1</sup>, tendo em conta os resultados obtidos na experiência descrita

na secção 2.6 deste trabalho – a esta salinidade foram obtidos valores superiores de NRA para as duas algas em estudo. De cada balão com efluente, onde esteve contida uma porção de alga, filtraram-se duas amostras de água com uma seringa, através de um filtro de acetato de celulose (WHATTMAN GF/C,  $\phi$  0,45 $\mu$ m), para tubos de 12 mL em vácuo. Uma das amostras foi destinada à análise da concentração de nitratos presente na coluna de água (CA). A outra foi destinada à análise de nitritos e amónia presentes na CA. De igual forma se procedeu à recolha de amostras de água provenientes dos *gobelets* de controlo (com efluente mas sem alga). Na Tabela 2 apresentam-se de forma resumida o número e tipo de amostras em cada momento de amostragem.

**Tabela 2.** Planeamento da 2ª experiência. Resumo do número e tipo de amostras em cada ponto de amostragem.

	Metodologia		
	NRA	RI	CA
<i>0 min</i>	3U/E	(3U/E+3B) <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	(3U/E+3B) <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>15 min</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>30 min</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>1 h</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>2 h</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>3 h</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>4 h</i>	3U/E	3U/E <sup>1</sup>	(3U/E+3C) <sup>1</sup>
	3B	3U/E <sup>2</sup>	(3U/E+3C) <sup>2</sup>
<i>Total</i>	21 U/E	21 U/E <sup>1</sup> + 3B <sup>1</sup>	21 U/E <sup>1</sup> + 21B <sup>1</sup>
<i>amostras</i>	21 B	21 U/E <sup>2</sup> + 3B <sup>2</sup>	21 U/E <sup>2</sup> + 21B <sup>2</sup>

**Legenda:** NRA – nitrato redutase; RI – reservas internas de azoto; CA – coluna de água; U – *Ulva*; E – *Enteromorpha*; B – ensaio em “branco”; C – ensaio controlo; <sup>1</sup> – amostras destinadas à análise de nitratos; <sup>2</sup> – amostras destinadas à análise de nitritos e amónia.

No final das experiências as amostras processadas foram armazenadas no frigorífico (<5 °C) até à sua análise no analisador de fluxo contínuo (FIA). No FIA foram determinadas as concentrações de nitratos, nitritos e amónia presentes nas amostras (cf. secção 2.4.4.). Para o controlo do processo de biorremediação, foram calculados os valores de NUR e NRE em cada momento de amostragem. Os valores de NRA e RI das amostras também foram determinados, para estudar as vias metabólicas seguidas pelas formas de azoto inorgânico, após a sua absorção pelas algas.

## **2.9. Tratamento de dados**

Os dados das experiências efetuadas no presente trabalho foram inseridos na folha de cálculo *Microsoft Office Excel*®, no qual foram calculadas as médias aritméticas respetivos erros-padrão dos resultados obtidos em cada momento de amostragem. A representação gráfica dos resultados também recorreu ao *Microsoft Office Excel*®.

Na primeira experiência (v. secção 2.6), os efeitos dos fatores tipo de alga (*Ulva* e *Enteromorpha*), temperatura (10, 20, 30, 35 e 40 °C) e salinidade (0, 15 e 36 g.L<sup>-1</sup>), sobre a NRA foram testados, através da análise de variâncias usando o módulo GLM (*General Linear Model*) do PASW® Statistics 18 (IBM Co). A análise foi realizada com 95 % de confiança i.e. os resultados são considerados significativos quando valor-P < 0,05.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Teor de humidade das algas

De forma a uniformizar os cálculos efetuados neste trabalho foi necessário determinar o teor de humidade das algas. A determinação do teor de humidade em *Ulva* (Tabela 3) apresentou um valor médio de 74%. No caso de *Enteromorpha* (Tabela 4) o teor médio de humidade foi 86 %.

**Tabela 3.** Teor de humidade em *Ulva*.

Amostras	Peso húmido (g)	Peso seco (g)	Humidade (%)	Média±DP (%)
1	0,8601	0,2288	73,40	
2	0,9502	0,2474	73,96	74,06±0,72
3	0,9191	0,2314	74,82	

**Tabela 4.** Teor de humidade em *Enteromorpha*.

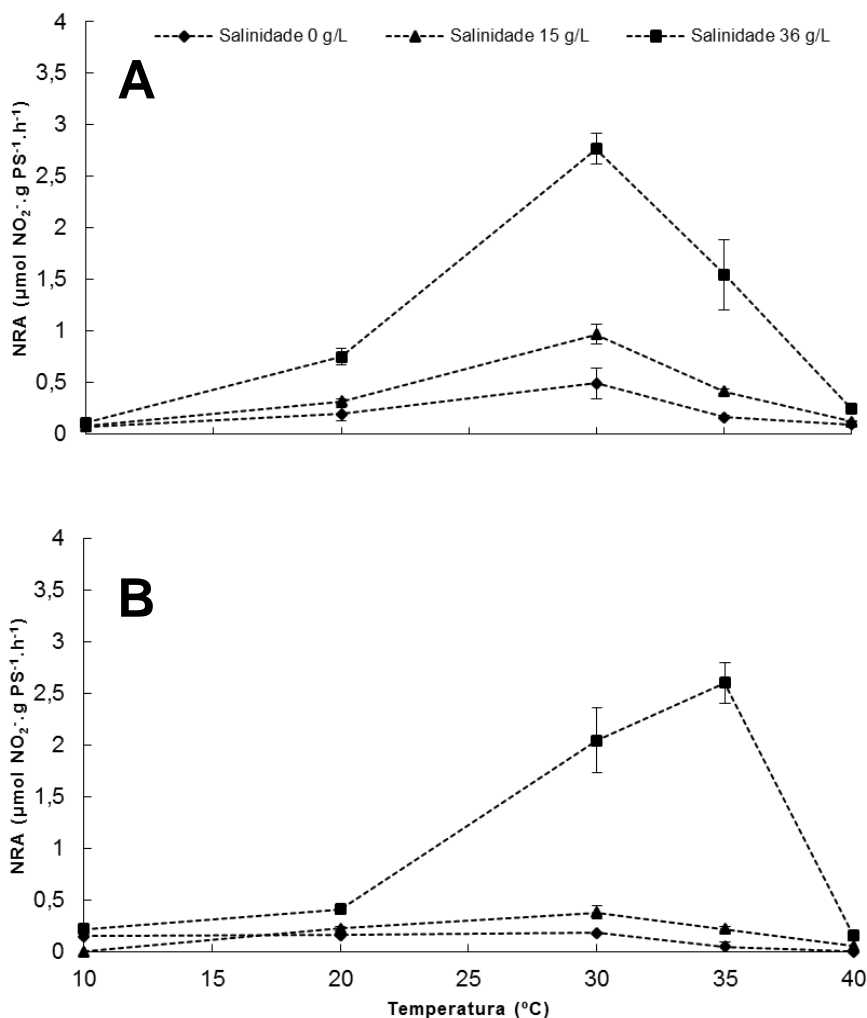
Amostras	Peso húmido (g)	Peso seco (g)	Humidade (%)	Média±DP (%)
1	2,4717	0,3304	86,63	
2	2,0604	0,2656	87,11	86,48±0,71
3	1,7369	0,2483	85,70	

*Enteromorpha* obteve um maior teor de humidade que *Ulva*. *Enteromorpha*, caracterizada pela sua estrutura filamentosa, também apresentou maior dificuldade no processo de eliminação do excesso de humidade, antes de ser colocada na estufa para o processo de secagem. Devido às diferenças verificadas, foi decidido utilizar o peso seco das algas, nos parâmetros doravante determinados.

#### 3.2. Comparação da NRA entre as algas *Ulva* e *Enteromorpha*

A influência da salinidade e temperatura sobre as algas (Figura 13) evidenciou a tendência de variação da atividade da nitrato redutase (NRA). Comparando diretamente as duas algas há a salientar que o valor máximo de NRA em *Ulva* foi aos 30 °C, para

todas as salinidades, enquanto que no caso de *Enteromorpha* o máximo de NRA situou-se aos 35 °C, na incubação com maior salinidade do meio reacional.



**Figura 13.** Efeito da temperatura e salinidade na variação da NRA obtida por tipo de alga. (A): *Ulva*; (B): *Enteromorpha*. Os valores apresentados correspondem às médias aritméticas com os respetivos erros-padrão.

A NRA variou significativamente ( $p < 0,001$ ) entre as duas algas (*Ulva* ou *Enteromorpha*), as temperaturas de incubação (10 – 40 °C) e as salinidades dos meios de incubação (0 – 36 g.L<sup>-1</sup>) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA por tipo de alga, salinidade do meio reacional e temperatura de incubação.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>
<b>Modelo corrigido</b>	48,297 <sup>a</sup>	29	1,665	49,501	0,000
<b>Interceção</b>	22,893	1	22,893	680,434	0,000
<b>Alga</b>	0,202	1	0,202	6,013	0,017
<b>Salinidade</b>	15,319	2	7,660	227,668	0,000
<b>Temperatura</b>	15,347	4	3,837	114,037	0,000
<b>Alga x Salinidade</b>	0,163	2	0,081	2,417	0,098
<b>Alga x Temperatura</b>	1,522	4	0,380	11,309	0,000
<b>Salinidade x Temperatura</b>	14,199	8	1,775	52,754	0,000
<b>Alga x Salinidade x Temperatura</b>	1,545	8	0,193	5,741	0,000
<b>Erro</b>	2,019	60	0,034		
<b>Total</b>	73,209	90			
<b>Modelo corrigido</b>	50,316	89			

a.  $R^2 = 0,960$  ( $R^2_{\text{ajust}} = 0,940$ )

No caso dos ensaios realizados com *Ulva* (Figura 13A), a maior NRA ( $2,767 \pm 0,148$   $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) foi observada nas amostras incubadas a 30 °C, num meio de salinidade 36  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nos ensaios com temperatura de 30 °C, foram também registados os valores máximos de NRA para salinidades de 0 e 15  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respetivamente,  $0,489 \pm 0,151$  e  $0,964 \pm 0,099$   $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Nas incubações realizadas a 10 e a 40 °C, foram obtidos os valores de NRA mais baixos, praticamente nulos, para todas as salinidades testadas. Observou-se uma dinâmica semelhante da NRA (Figura 13A) para as temperaturas e salinidades de incubação estudadas. Essa dinâmica traduziu-se num aumento significativo (ANOVA,  $p < 0,001$ ; Tabela 6) da atividade enzimática até à temperatura para a qual o valor de NRA é máximo (30 °C), seguida de uma diminuição de valores com o aumento da temperatura de incubação. Na Figura 13A também se verifica que, quanto mais elevada foi a salinidade do meio de incubação, maiores (ANOVA,  $p < 0,001$ ; Tabela 6) foram os valores de NRA registados para uma dada temperatura de incubação. Todavia, esta última observação não se verifica para todas as temperaturas, daí a significância estatística ( $p < 0,001$ ) da interação entre os fatores temperatura e salinidade (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA para *Ulva*, por salinidade do meio reacional e temperatura de incubação.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>
<b>Modelo corrigido</b>	22,891 <sup>a</sup>	14	1,635	44,625	0,000
<b>Interceção</b>	13,700	1	13,700	373,894	0,000
<b>Salinidade</b>	6,506	2	3,253	88,778	0,000
<b>Temperatura</b>	10,403	4	2,601	70,983	0,000
<b>Salinidade x Temperatura</b>	5,982	8	0,748	20,407	0,000
<b>Erro</b>	1,099	30	0,037		
<b>Total</b>	37,689	45			
<b>Modelo corrigido</b>	23,990	44			

a.  $R^2 = 0,954$  ( $R^2_{\text{ajust}} = 0,933$ )

Na Figura 13B apresentam-se graficamente os resultados obtidos para a NRA nos ensaios realizados com *Enteromorpha*. O valor mais elevado de NRA foi obtido na incubação realizada à temperatura de 35 °C num meio de salinidade 36 g.L<sup>-1</sup>. O valor obtido para essas condições foi de 2,603±0,199 µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Este valor máximo é semelhante ao obtido com *Ulva* para a mesma salinidade mas com uma temperatura de incubação de 30 °C (2,767±0,148 µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Na salinidade de 36 g.L<sup>-1</sup>, mas à temperatura de incubação de 30 °C, obteve-se o segundo maior valor de NRA para *Enteromorpha* (2,046 ± 0,317 µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (Figura 13B). Este valor continua a ser bastante diferente dos restantes. Nos ensaios realizados com salinidades de 0 e 15 g/L, os valores mais elevados de NRA observados ocorreram nas situações em que se incubaram as amostras a 30 °C, respetivamente 0,182±0,011 e 0,380±0,060 µmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Ainda assim, estes pontos não são muito diferentes dos resultados obtidos para as outras temperaturas, nas mesmas salinidades. Tal como foi observado nos ensaios realizados com *Ulva* (Figura 13A), também foram obtidos valores praticamente nulos de NRA nas temperaturas de incubação de 0 e 40 °C (Figura 13B). Nos ensaios realizados com *Enteromorpha* foi observada uma dinâmica de variação de NRA, em relação ao aumento da temperatura, semelhante à que se observou nos ensaios com *Ulva*. Neste caso, a variação da temperatura de incubação parece também afetar significativamente a NRA (ANOVA, p<0,001). Esta suposição é

confirmada estatisticamente se se analisar a Tabela 7. A salinidade do meio de incubação também afeta significativamente (ANOVA,  $p < 0,001$ ) o valor da NRA (Tabela 7). Quanto maior foi a salinidade (0, 15 e 36 g/L), maiores foram os valores de atividade enzimática observados (Figura 13B). À semelhança do que se obteve para *Ulva*, as diferenças das NRA entre salinidades do meio reacional são estatisticamente significativas apenas para algumas temperaturas de incubação, daí a interação temperatura x salinidade ser significativa (ANOVA,  $p < 0,001$ ; Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise de variância (ANOVA) relativa à NRA para *Enteromorpha*, por salinidade do meio reacional e temperatura de incubação.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>
<b>Modelo corrigido</b>	25,204 <sup>a</sup>	14	1,800	58,740	0,000
<b>Intercepção</b>	9,395	1	9,395	306,557	0,000
<b>Salinidade</b>	8,976	2	4,488	146,442	0,000
<b>Temperatura</b>	6,465	4	1,616	52,738	0,000
<b>Salinidade x Temperatura</b>	9,762	8	1,220	39,816	0,000
<b>Erro</b>	0,919	30	0,031		
<b>Total</b>	35,519	45			
<b>Modelo corrigido</b>	26,124	44			

a.  $R^2 = 0,965$  ( $R^2_{\text{ajust}} = 0,948$ )

### 3.3. Estudos preliminares de biorremediação

De forma a verificar o comportamento de *Ulva* em função da disponibilidade de diferentes concentrações de nitratos, ensaiou-se duas incubações com 50 e 700  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ). Os resultados obtidos para a incubação de *Ulva* com 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ , durante 4 horas, estão apresentados na Tabela 8. Após uma hora de incubação, a alga reduziu a concentração inicial de nitratos para  $18,217 \pm 3,955 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Esta redução corresponde a uma eficiência de remoção (NRE) de 62,2%, i.e. a alga removeu 62% da concentração inicial de nitratos. Durante esse período de incubação, *Ulva* removeu os nutrientes a uma taxa de ingestão (NUR) de  $28,865 \pm 3,803 \mu\text{mol NO}_3^- .\text{g PS}^{-1} .\text{h}^{-1}$ . Com três horas de incubação, a concentração de nitratos medida foi de  $0,233 \pm 0,233 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Nesse período de incubação a alga teve um NRE de 99,5%. Na Tabela 8, também se pode observar que o valor de NUR foi superior com uma hora de incubação, e inferior nos tempos de incubação seguintes.

**Tabela 8.** Variação da concentração de nitratos na coluna de água, taxas de ingestão de nitratos (NUR) e eficiências de remoção de nitratos (NRE) para o ensaio de incubação com *Ulva*, numa solução de KNO<sub>3</sub> de concentração 50 μM, durante 4 horas. Os valores apresentados correspondem às médias e respetivos erros-padrão.

<b>Tempo</b> <b>(h)</b>	<b>[Nitratos]</b> <b>(μmol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NRE</b> <b>(%)</b>	<b>NUR</b> <b>(μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>
<b>0</b>	48,236 ± 0,109	-	-
<b>1</b>	18,217 ± 3,955	62,2	28,865 ± 3,803
<b>3</b>	0,233 ± 0,233	99,5	15,389 ± 0,072
<b>4</b>	0,202 ± 0,202	99,6	11,547 ± 0,049

Os resultados obtidos para a incubação com *Ulva* numa solução de KNO<sub>3</sub> de concentração 700 μmol.L<sup>-1</sup> durante 8 horas estão compilados na Tabela 9. Com uma hora de incubação, a alga reduziu a concentração inicial de nitratos para 610,178±9,639 μmol.L<sup>-1</sup>. Esta redução corresponde a um valor de NRE de 12,9%. Durante este período de incubação a alga apresentou um NUR de 86,984±9,268 μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Este valor corresponde ao máximo NUR obtido ao longo do ensaio. Com quatro horas de incubação, *Ulva* reduziu a concentração de nitratos para 498,950±1,000 μmol.L<sup>-1</sup>. Esta diferença de concentrações observada (≈ 200 μmol.L<sup>-1</sup>) corresponde apenas ao dobro (aproximadamente) da redução obtida com uma hora de incubação (≈ 110 μmol.L<sup>-1</sup>).

**Tabela 9.** Variação da concentração de nitratos na coluna de água, taxas de ingestão de nitratos (NUR) e eficiências de remoção de nitratos (NRE) para o ensaio de incubação com *Enteromorpha*, numa solução de KNO<sub>3</sub> de concentração 700 μM, durante 8 horas. Os valores apresentados correspondem às médias e respetivos erros-padrão.

<b>Tempo</b> <b>(h)</b>	<b>[Nitratos]</b> <b>(μmol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>NRE</b> <b>(%)</b>	<b>NUR</b> <b>(μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.g PS<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>
<b>0</b>	700,642 ± 18,603	-	-
<b>1</b>	610,178 ± 9,639	12,9	86,984 ± 9,268
<b>4</b>	498,950 ± 1,000	28,8	48,484 ± 0,241
<b>8</b>	484,983 ± 17,466	30,8	25,921 ± 2,099

A redução obtida em 4 h de incubação correspondeu a uma eficiência de remoção de 28,8%. Também pode ser observada uma redução de quase metade no valor de NUR. Em 8 horas de incubação, a concentração de nitratos medida foi equivalente à observada

no ponto de amostragem anterior (4 horas). Neste ensaio, a alga atingiu a sua eficiência máxima de remoção de nitratos (aproximadamente 30%), a partir das 4 horas de incubação.

### **3.4. Estudo das variações do azoto inorgânico durante o processo de biorremediação**

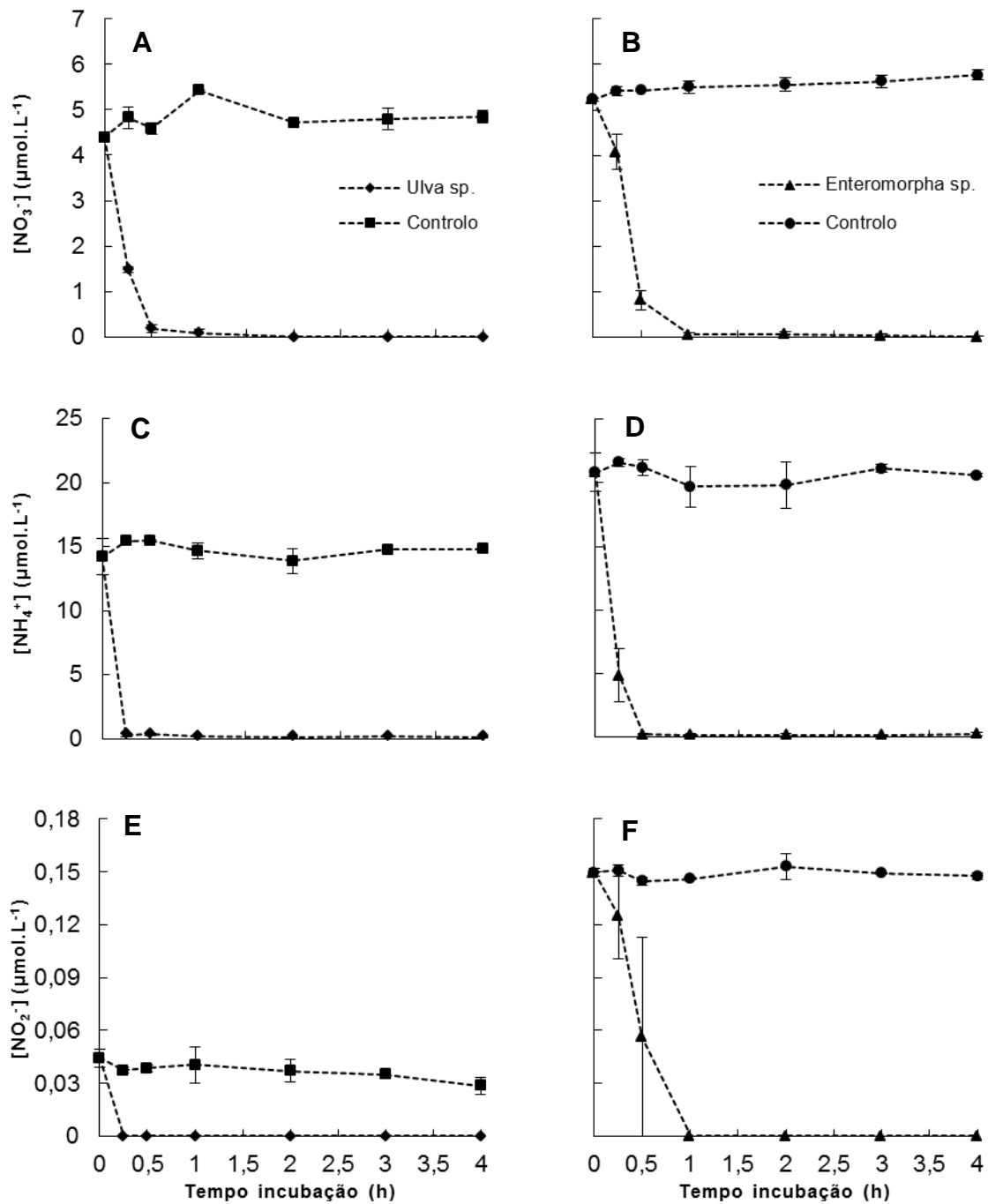
Antes de se iniciar a apresentação e descrição deste conjunto de resultados, é necessário relembrar que as experiências para cada alga foram realizadas em semanas diferentes, e que a recolha do efluente utilizado foi realizada no próprio dia de cada ensaio (v. secção 2.8).

De forma a verificar a capacidade biorremediadora das algas em estudo, foi estudada a variação da concentração dos nutrientes (nitratos, amónia e nitritos) presentes na coluna de água, durante incubações efetuadas com *Ulva* (Figura 14A, C e E) e *Enteromorpha* (Figura 14B, D e F) utilizando um efluente proveniente de aquacultura.

Ao longo das duas experiências, as leituras controlo mantiveram os seus valores relativamente constantes para todos os nutrientes (Figura 14). Com a análise da Figura 14, verifica-se que a concentração inicial de cada nutriente variou ligeiramente entre cada ensaio, mesmo sabendo que o efluente utilizado em cada incubação provém da mesma fonte. Nos dois ensaios realizados, a concentração inicial de amónia foi superior à concentração de nitratos (v. Figura 14).

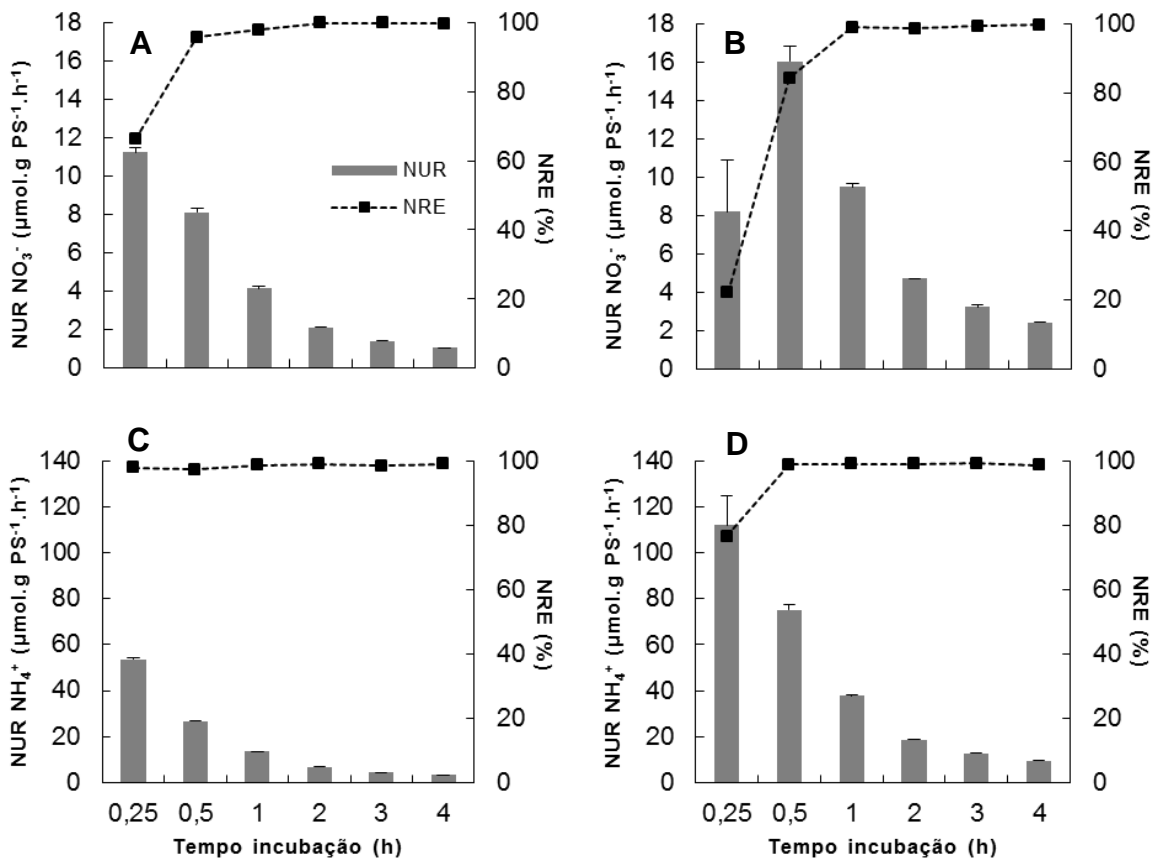
No ensaio realizado com *Ulva*, a concentração inicial de nitratos foi  $4,399 \pm 0,118 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 14A). Esta concentração diminuiu rapidamente para  $1,483 \pm 0,058 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em 15 minutos de incubação. No ponto de amostragem seguinte (30 minutos), a concentração estava em  $0,186 \pm 0,095 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Com 1 hora de experiência, a alga conseguiu “captar” por completo os nitratos presentes no efluente. As taxas de ingestão e eficiência de remoção dos nutrientes (NUR e NRE, respetivamente), foram calculadas para cada momento de amostragem (Figura 15). Para a diminuição da concentração de nitratos verificada nos primeiros 15 minutos, obteve-se uma taxa de ingestão (NUR) de  $11,243 \pm 0,222 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (v. Figura 15A). Durante esse intervalo de tempo, *Ulva* tem uma eficiência de remoção (NRE) de nitratos presentes no efluente de 66 %. No ponto de amostragem seguinte (30 minutos), o valor de NUR obtido foi menor ( $8,120 \pm 0,183 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Com 30 minutos de incubação, a alga foi capaz de

remover quase a totalidade dos nitratos presentes, obtendo-se um valor de NRE de 96 %.



**Figura 14.** Variação da concentração de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$ ) num efluente proveniente de aquacultura ao longo do período de incubação com as algas *Ulva* e *Enteromorpha*. **A**, **C** e **E** representam o ensaio com *Ulva*. **B**, **D** e **F** representam o ensaio com *Enteromorpha*. Os valores correspondem às médias e respectivos erros-padrão.

No caso da amônia, a sua concentração inicial medida no efluente foi de  $14,226 \pm 1,386 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 14C). Este valor “desaparece” quase na totalidade em 15 minutos de incubação, registrando-se nesse momento um valor de  $0,309 \pm 0,168 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Essa descida representou um NUR de  $53,650 \pm 0,647 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (v. Figura 15C). A alga necessitou apenas de 15 minutos de incubação, para apresentar um NRE de amônia de 98 %. Na Figura 14E apresentam-se graficamente os resultados obtidos para a evolução da concentração de nitritos, ao longo do período de incubação. Na figura pode ser observado que a concentração inicial de nitritos, embora se apresente em valor residual, é consumida na totalidade por *Ulva*, em 15 minutos de incubação. Estes resultados estão, no entanto, 1-2 ordens de grandeza abaixo das concentrações iniciais de nitratos e amônia, não sendo assim considerados tão importantes como os outros.



**Figura 15.** Taxas de ingestão (NUR) e eficiências de remoção (NRE) dos nutrientes (nitratos e amônia) pelas algas estudadas. **A** e **C** representam o ensaio com *Ulva*. **B** e **D** representam o ensaio com *Enteromorpha*. As barras representam as médias dos valores de NUR e respectivos erros-padrão. Os pontos representam os valores de NRE dos nutrientes.

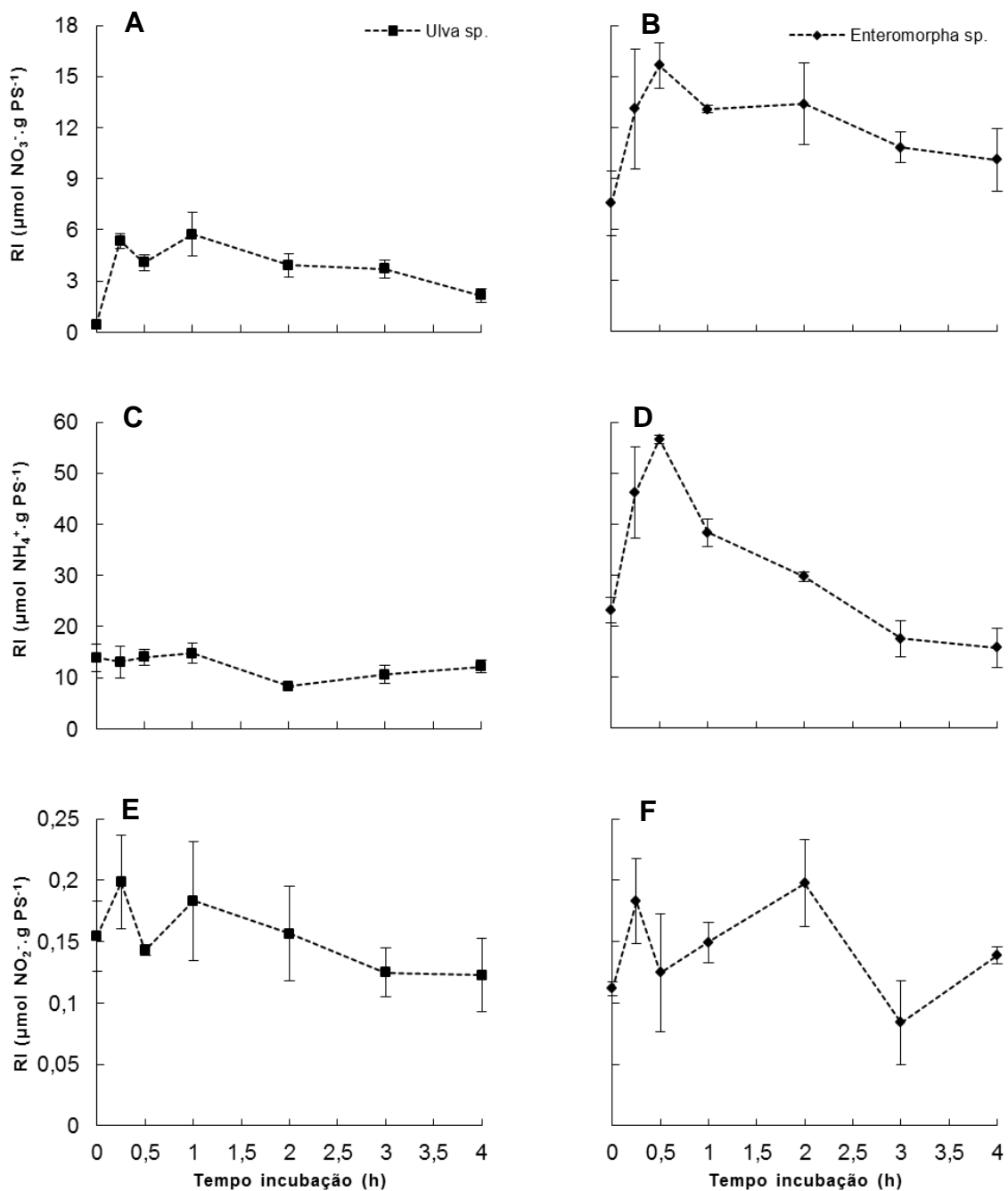
No ensaio realizado com *Enteromorpha*, a concentração inicial de nitratos no efluente foi de  $5,231 \pm 0,034 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (v. Figura 14B). Este valor diminuiu para  $4,075 \pm 0,378 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em 15 minutos de incubação. No ponto de amostragem seguinte (30 minutos), a concentração de nitratos desceu rapidamente para  $0,828 \pm 0,213 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A alga necessitou de 1 hora de experiência para reduzir a concentração inicial de nitratos a valores mais próximos de zero. As NUR correspondentes à dinâmica descrita acima foram (Figura 15B):  $8,202 \pm 2,709 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para os 15 minutos iniciais;  $16,039 \pm 0,772 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para 30 minutos de incubação; e  $9,488 \pm 0,185 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para 1 hora de incubação. Nos primeiros 15 minutos do ensaio, *Enteromorpha* apresentou uma eficiência de remoção de apenas 22 % da concentração inicial de nitratos no efluente (Figura 15B). Com 30 minutos de incubação, determinou-se o valor máximo de NUR, conseguindo a alga atingir um NRE de 84 % da concentração inicial de nitratos. A alga conseguiu atingir um NRE de 99 % em 1 hora de incubação. No caso da amónia, a concentração inicial no efluente foi  $20,819 \pm 1,500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figura 14D). Esta concentração inicial de amónia diminuiu rapidamente para  $4,868 \pm 2,052 \mu\text{mol.L}^{-1}$  após 15 minutos de incubação. Este comportamento correspondeu a um NUR de  $112,024 \pm 12,881 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  e a um NRE de 77 % da concentração inicial da amónia no efluente (Figura 15D). Após 30 minutos de incubação, a concentração de amónia diminuiu para valores próximos de zero ( $0,234 \pm 0,021 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (Figura 14D), obtendo-se para este período de tempo um NUR de  $75,043 \pm 2,469 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (Figura 15D). Durante este período de incubação, a alga atingiu um NRE de 99 % da concentração inicial de amónia. Na Figura 14F apresentam-se os resultados obtidos para a evolução da concentração de nitritos, ao longo do período de incubação. No gráfico pode-se observar uma concentração inicial residual de nitritos ( $0,149 \pm 0,002 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), que é consumida completamente em uma hora de incubação. Tal como foi verificado para *Ulva*, estes resultados apresentam-se 1-2 ordens de grandeza abaixo das concentrações iniciais de nitratos e amónia, não sendo assim considerados tão importantes.

Nos dois ensaios, a amónia presente no efluente, mesmo estando em maior concentração, foi consumida mais rapidamente que os nitratos. As duas algas necessitaram de 30 minutos de incubação para remover a totalidade da amónia presente. *Ulva* e *Enteromorpha* necessitaram de 1 hora de incubação para remover a totalidade dos nutrientes presentes no meio.

A dinâmica das reservas internas (RI) de azoto inorgânico (nitratos, amónia e nitritos) foi verificada no ensaio efetuado com *Ulva* (Figura 16A, C e E) e no ensaio com *Enteromorpha* (Figura 16B, D e F). No início do ensaio com *Ulva* (Figura 16A), verificou-se que a alga contém uma quantidade acumulada de nitratos muito próxima de zero. Em 15 minutos de incubação, a alga acumula rapidamente nitratos, atingindo o valor de  $5,350 \pm 0,423 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ . Com 30 minutos de experiência, esse valor é ligeiramente inferior, voltando a ser superior com 1 hora de incubação, observando-se mesmo um valor máximo ( $5,736 \pm 1,284 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ ). A partir desse momento, a quantidade de nitratos acumulados por *Ulva* começa a diminuir progressivamente até a um valor de  $2,140 \pm 0,409 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ , no final de 4 h de incubação. No início do ensaio realizado com *Enteromorpha* (Figura 16B), a alga tem uma quantidade de nitratos de  $7,539 \pm 1,904 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$  que aumenta, até a um valor máximo de  $15,654 \pm 1,351 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ , após 30 minutos de incubação. O valor máximo diminui para  $13,073 \pm 0,211 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ , no ponto de amostragem seguinte (1 h). A partir desse ponto, a quantidade acumulada de nitratos diminui para um valor de  $10,119 \pm 1,840 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ , no final das 4 h de incubação. A variabilidade dos resultados obtidos (Figura 16B) pode, em certa medida, fazer com que as diferenças observadas não sejam muito significativas.

No caso da amónia, *Ulva* apresentou uma quantidade inicial acumulada de  $13,895 \pm 2,717 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$  (Figura 16C). Este valor mantém-se relativamente constante em todas as leituras efetuadas até à primeira hora de incubação. Com 2 h de incubação, esse resultado é inferior, observando-se um valor mínimo de  $8,291 \pm 0,271 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ . Nos pontos de amostragem seguintes, a quantidade de amónia acumulada aumenta progressivamente até valores próximos dos observados inicialmente. No ensaio realizado com *Enteromorpha*, a alga apresenta uma quantidade inicial de amónia de  $23,139 \pm 2,481 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$  (Figura 16D). Com meia hora de incubação, os valores das reservas internas de amónia aumentam até uma quantidade de  $56,665 \pm 0,809 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ . No ponto de amostragem seguinte (1 h), a quantidade de amónia acumulada é inferior, registando-se um valor de  $38,343 \pm 2,694 \mu\text{mol.g PS}^{-1}$ . A partir deste ponto, e até ao final do ensaio, a quantidade de amónia acumulada pela *Enteromorpha* diminui, até valores ligeiramente mais baixos àqueles observados inicialmente.

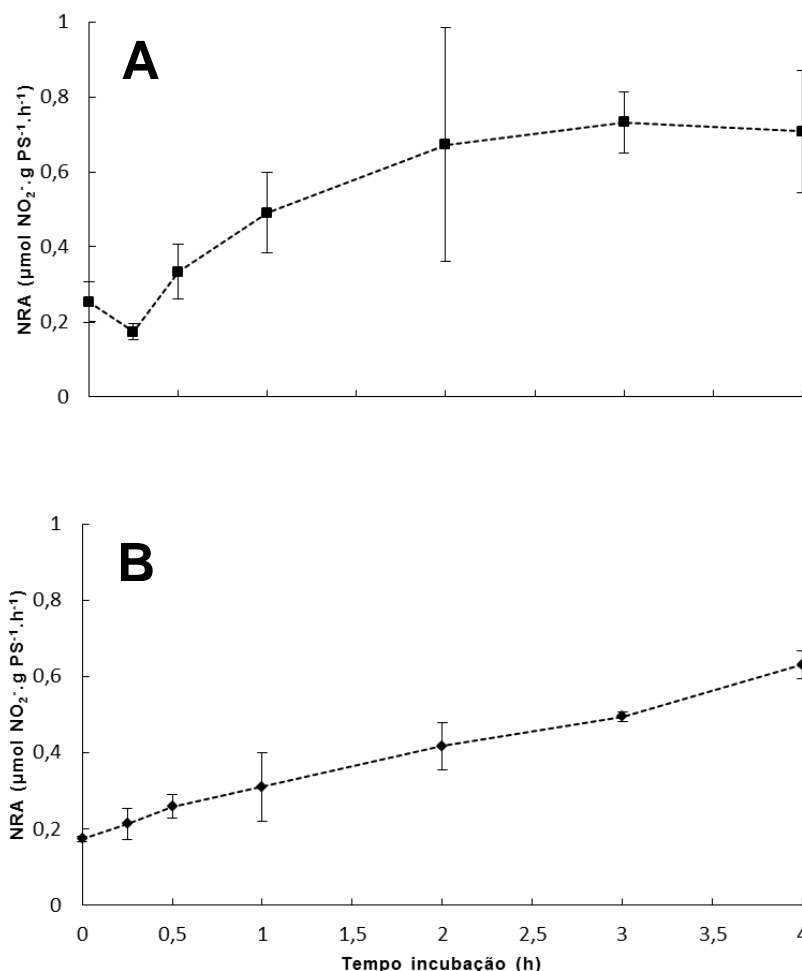
No caso dos nitritos, as leituras obtidas nos dois ensaios (Figura 16E e F) são muito próximas de zero, e apresentam muita variabilidade. As tendências observadas ao longo das 4 horas de incubação, para a variação da quantidade de nitritos acumulada internamente, não podem ser deste modo consideradas conclusivas.



**Figura 16.** Variação das reservas internas (RI) de azoto (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) presentes nas algas, ao longo dos ensaios. **A**, **C** e **E** representam o ensaio com *Ulva*. **B**, **D** e **F** representam o ensaio com *Enteromorpha*. Os valores apresentados correspondem às médias aritméticas com os respectivos erros-padrão.

A assimilação de nitratos nas duas algas também foi controlada, através da verificação dos valores de NRA ao longo dos ensaios efetuados (Figura 17). Na Figura 17A pode-se verificar que *Ulva* apresenta uma NRA inicial de  $0,253 \pm 0,055 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . O valor de NRA é inferior no final de 15 minutos de incubação ( $0,171 \pm 0,022$

$\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). A partir desse ponto, a atividade enzimática da nitrato redutase na alga aumenta gradualmente, até estabilizar num patamar aproximado de  $0,7 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Os resultados obtidos apresentam muita variabilidade, fazendo com que as diferenças entre os valores não sejam muito significativas.



**Figura 17.** Variação da actividade da nitrato redutase (NRA) para os dois ensaios. **A** representa o ensaio com *Ulva*. **B** representa o ensaio com *Enteromorpha*. Os valores apresentados correspondem às médias aritméticas com os respectivos erros-padrão.

No ensaio realizado com *Enteromorpha*, a alga apresentou um valor inicial de NRA de  $0,174 \pm 0,007 \mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Figura 17B) que aumentou linearmente ao longo dos períodos de incubação. O valor máximo obtido para a NRA neste ensaio foi de  $0,631 \pm 0,037 \mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , após 4 horas de incubação (correspondente ao final da experiência). As gamas de valores de NRA em cada momento de amostragem obtidas para os dois ensaios, não são muito diferentes entre si. Os próprios valores máximos atingidos pelas algas, no final dos ensaios, são muito próximos.

## 4. DISCUSSÃO

*Ulva* e *Enteromorpha* são duas das algas associadas a fenómenos de eutrofização, que ocorrem naturalmente na Ria Formosa, Algarve (Aníbal and Sprung, 1997; Sprung, 1994). Estas macroalgas verdes, normalmente consideradas como problema ambiental, podem ser vistas como uma solução para os problemas causados pelas descargas de resíduos e efluentes provenientes de agroindústrias. As algas passam então a ter uma função de biorremediação. Para que sejam consideradas um bom agente biorremediador para um determinado efluente, é importante estudar um conjunto de vários fatores. A salinidade e temperatura ótimas de funcionamento, as vias metabólicas de absorção do azoto inorgânico e as eficiências de remoção dos nutrientes, são exemplos de alguns fatores importantes para o estudo. Com este trabalho pretendeu-se estudar alguns desses fatores, e criar uma sequência lógica de procedimentos de análise, para a utilização de macroalgas verdes com potencial biorremediador.

### 4.1. Teor de humidade das algas

*Enteromorpha* apresentou um teor de humidade superior a *Ulva* (86% e 74%, respetivamente). Os resultados apresentados neste ensaio foram próximos aos obtidos por Lartigue and Sherman (2002), tendo sido verificadas humidades de 88% para *Enteromorpha*, e 76,9% para *Ulva*. Em todos os ensaios realizados, *Enteromorpha* também apresentou uma maior dificuldade no processo preparatório de eliminação do excesso de humidade. A maior ou menor dificuldade na remoção desse excesso de água pode incrementar erro nos cálculos e colocar em causa comparações diretas entre as duas algas. A morfologia característica desta alga, em forma de “fios de cabelo”, e o facto de se agrupar em aglomerados, é muito provavelmente o motivo da dificuldade em extrair o excesso de água. Pequenas porções de água ficam aprisionadas no interior do aglomerado da alga, tornando difícil a sua remoção. Este motivo pode ser a justificação para a diferença observada, entre os teores de humidade das duas algas. Para eliminar este tipo de erro foi decidido utilizar o peso seco das amostras, no cálculo dos valores doravante discutidos. No contexto da biorremediação, *Enteromorpha* ter um peso seco inferior a *Ulva* poderá ser vantajoso. *Enteromorpha* necessitaria assim de menos quantidade de alga para produzir um resultado final semelhante a *Ulva*. Esta suposição pode ser confirmada com a análise da discussão de resultados adiante apresentada.

## 4.2. Efeitos da temperatura e salinidade na NRA de *Ulva* e *Enteromorpha*

Antes do ensaio de verificação do efeito da temperatura e salinidade na NRA ter iniciado, foi aplicado às duas algas um período de aclimatização, na tentativa de esgotamento dos nutrientes (nitratos e amónia) existentes no interior das suas células. Este período de privação de nutrientes também foi realizado nos outros estudos efetuados neste trabalho. Neste tipo de ensaio, o processo de pré-tratamento é uma etapa importante porque as reservas de nutrientes nas algas podem influenciar a NRA (Corzo and Niell, 1994). Alguns autores utilizam este tipo de procedimento nas suas experiências (Corzo and Niell, 1991, 1994; Lartigue and Sherman, 2005). Nesses estudos são realizados períodos de pré-tratamentos com durações de 1-9 dias com exposições das amostras a radiações intensas ( $120 - 300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Corzo and Niell (1994) esgotaram as reservas internas de nitratos mantendo a alga (*Ulva rigida*) num meio sem fonte de azoto inorgânico, e com uma exposição a luz branca de radiação  $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , durante um período máximo de 9 dias. O pré-tratamento aplicado no presente ensaio durou aproximadamente 24 h. Não foi possível expor as algas a radiações controladas, mas houve no entanto a preocupação de permitir a exposição solar das amostras. Não foi, no entanto, verificado o estado das reservas internas no momento anterior ao início das incubações. As algas estudadas são originárias do mesmo local de amostragem, tendo à partida as mesmas condições de RI. O período de pré-tratamento dado aos dois tipos de alga estudados foi equivalente, julgando-se suficiente para que (pelo menos) grande parte das reservas fosse consumida.

Neste ensaio foi estudada a atividade da nitrato redutase (NRA), através dum plano experimental fatorial que incluiu o tipo de alga, a temperatura e a salinidade do meio de incubação. Este tipo de abordagem experimental permite não só observar a influência de cada fator na resposta final (NRA), mas também analisar as suas interações. Noutros trabalhos, também têm sido testados outros fatores, como por exemplo: pH do meio de incubação; tipos e concentrações de agentes permeabilizadores de membrana; tipo e concentrações de soluções tampão; concentrações de  $\text{KNO}_3$  e glucose na solução de incubação; tempo de incubação; condições de anaerobiose; intensidade luminosa; e tipos e concentrações de inibidores de protéases (Corzo and Niell, 1991, 1994; Hurd et al., 1995; Lartigue and Sherman, 2002). Contudo, os autores testam normalmente este

tipo de fatores de forma individual. A metodologia aplicada no presente ensaio, permite também obter uma logística mais simples, obtendo-se assim mais resultados com realização de menos ensaios. Os fatores testados neste ensaio julgaram-se os mais importantes, no âmbito do estudo da utilização de macroalgas verdes como biorremediadores de efluentes provenientes de agroindústrias.

Com a análise dos resultados obtidos, foi possível verificar que a NRA variou significativamente quando se testa em simultâneo, i.e., a interação entre, o tipo de alga utilizado, a salinidade do meio reacional e a temperatura de incubação. *Ulva* e *Enteromorpha* apresentaram dinâmica semelhante na NRA com a alteração da temperatura de incubação. Com o aumento da temperatura, os valores de NRA subiram até a um valor máximo de funcionamento. A partir desse ponto verificou-se uma descida de valores que pode ser explicada por uma desnaturação progressiva das moléculas de nitrato redutase (Loban and Harrison, 1997; McKee and McKee, 2003). O mesmo tipo de dinâmica (em temperaturas semelhantes) foi observado no trabalho desenvolvido por Lartigue and Sherman (2002), para *Enteromorpha*. A dependência da NRA (determinada *in situ*) pela temperatura, indica que a temperatura a que as macroalgas estão sujeitas em meio natural, pode influenciar substancialmente a atividade enzimática da nitrato redutase (no campo) (Lartigue and Sherman, 2002). Durante os meses de verão (Junho – Setembro), na Ria Formosa (Algarve), as temperaturas máximas do ar variam entre 25 – 35 °C (Alexandre et al., 2004; Aníbal, 2004; Massa et al., 2009; Newton and Mudge, 2003). Nesses mesmos meses as temperaturas máximas da água variam entre 22,5 – 27,5 °C (Aníbal, 2004; Brito et al., 2010; Cravo et al., 2012). Neste ensaio as duas algas atingiram um valor máximo de NRA a temperaturas entre 30-35 °C. Estes resultados estão de acordo com o observado na natureza nas primeiras semanas de verão (entre Junho e Julho), quando as temperaturas sentidas são já muito próximas destas, e se pode localizar no local de amostragem, a maior concentração (*bloom*) das algas em estudo observada durante o ano (observações realizadas *in situ*, durante a recolha de amostras). À medida que o clima vai aquecendo durante o verão, também se pode observar uma diminuição da concentração das algas em estudo no local de amostragem, sendo *Ulva* a primeira alga a desaparecer (Aníbal, 2004). Este comportamento pode estar relacionado com um *stress* de temperatura (Lartigue and Sherman, 2002). O facto de *Enteromorpha* apresentar um valor máximo de NRA a uma temperatura superior à de *Ulva*, pode justificar esse comportamento. Lartigue and Sherman (2002) otimizaram um método de determinação

*in situ* da NRA semelhante ao utilizado neste ensaio, e determinaram para *Enteromorpha* um valor máximo de NRA por volta dos 32 °C (aproximadamente 65  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). A temperatura no local de amostragem do trabalho de Lartigue and Sherman (2002) variou anualmente entre os 4 e os 34 °C. Chow et al. (2004) reportaram uma NRA máxima (aproximadamente 5,4  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a uma temperatura inferior (15 °C), num estudo realizado com *Gracilaria chilensis*.

Além da temperatura, a salinidade do meio reacional também influenciou significativamente os valores de NRA determinados neste ensaio. Os valores de NRA, para as duas algas, foram superiores no caso dos ensaios realizados com a solução de incubação de salinidade 36  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Este comportamento não é estranho porque este tipo de algas ocorre essencialmente em ambientes marinhos. Na zona de amostragem (Ria Formosa), as salinidades da água variam entre 34,5 – 38 psu ao longo do ano (Brito et al., 2010; Cravo et al., 2012). No trabalho desenvolvido por Lartigue and Sherman (2002), foram obtidos valores ótimos de NRA para *Ulva* e *Enteromorpha* (9,35 e 18  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , respetivamente), quando os autores realizaram as incubações numa solução de salinidade 20 psu (aproximadamente 20  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A salinidade no local de amostragem definido nesse estudo, no ano que foi realizado o ensaio, foi de 21,5±6,9 psu. No presente ensaio, na salinidade de 15  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , foram obtidos valores máximos para a NRA de 0,964  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para *Ulva*, e 0,380  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para *Enteromorpha*. A grande diferença observada entre estes valores e os resultados obtidos por Lartigue & Sherman (2002) pode estar relacionada com as diferenças entre as metodologias aplicadas nos dois ensaios. Nas salinidades mais baixas testadas (0 e 15  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), *Ulva* obteve valores de NRA superiores aos obtidos para *Enteromorpha*. Com estas observações poder-se-á dizer que *Ulva* consegue assimilar nitratos a salinidades mais baixas, mesmo apresentando uma capacidade superior de assimilação (valores superiores de NRA) em salinidades semelhantes às existentes no local de amostragem.

A interação entre a temperatura e salinidade do meio teve um efeito significativo (sinérgico) na atividade enzimática da nitrato redutase. Os valores mais altos de NRA foram obtidos na salinidade mais alta testada e para temperaturas entre os 30-35 °C para as duas algas. Desta forma poder-se-á dizer que as algas estudadas assimilam mais rapidamente uma fonte de nitratos, se se verificarem as condições ótimas de funcionamento da NRA obtidas neste ensaio. A metodologia desenvolvida neste ensaio foi importante, pois não teria sido possível observar esta interação de fatores, se estes tivessem sido testados individualmente.

Os resultados obtidos permitem também realizar um melhoramento ao método de determinação da NRA original (Corzo and Niell, 1991), que não contempla o ajuste da temperatura e salinidade que se verificam no meio natural, onde estão localizadas as algas em estudo. Em Corzo and Niell (1991), os valores máximos de NRA não ultrapassam o patamar dos  $1,08 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , enquanto neste ensaio o valor máximo obtido foi de  $2,767 \pm 0,148 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para *Ulva*, e  $2,603 \pm 0,199 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para *Enteromorpha*. Outra otimização importante, que poderá ser testada no futuro, será o ajuste do meio de incubação com uma solução de água do mar artificial. Lartigue and Sherman (2002) testou essa possibilidade e obteve melhores resultados. É difícil comparar os resultados de NRA reportados na literatura, tendo em conta que os investigadores utilizam diferentes métodos de determinação (*in vivo* ou *in vitro*), amostragens realizadas em diferentes alturas do ano, entre outros fatores que têm influência na NRA (Alexandre et al., 2004).

A metodologia experimental aplicada neste trabalho pode ser implementada com outros tipos de macroalgas verdes, podendo também ser estudada a influência de outros fatores. No decorrer deste tipo de estudos vão sendo adquiridas informações úteis sobre as características de assimilação de nitratos, dos vários tipos de macroalgas verdes. O conhecimento obtido é muito importante, devendo ser tido em conta em futuras implementações e/ou otimizações de processos de biorremediação. As informações obtidas nesta parte do trabalho foram utilizadas no planeamento dos ensaios laboratoriais de biorremediação que se apresentam a seguir. A temperatura e a salinidade poderão assim ser utilizadas para otimizar a assimilação de nitratos, num processo de biorremediação utilizando as algas estudadas neste trabalho.

### **4.3. Estudos preliminares de biorremediação.**

Um dos objetivos desta componente do trabalho foi o desenvolvimento de um sistema eficaz que permitisse realizar experiências de biorremediação em laboratório. O sistema desenvolvido permitiu realizar esses ensaios, tendo ocorrido poucas dificuldades técnicas. Um dos aspetos onde deve ser melhorado é no controlo do fluxo de água entre o banho termostatisado e o banho de incubação. A dificuldade em regular o fluxo impede que o sistema funcione por várias horas, sem que esteja a ser controlado de forma permanente. Outro aspeto importante a melhorar, é o desenvolvimento de um sistema de iluminação que permita a variação da intensidade luminosa aplicada. Desta

forma seria possível estudar a influência da intensidade luminosa na capacidade de assimilação de nutrientes pelas algas. Neste ensaio controlou-se a intensidade luminosa, contudo tecnicamente não foi possível (nem pretendido) verificar o efeito da sua variação. Vários autores (Cabello-Pasini et al., 2010; Chow et al., 2004; Corzo and Niell, 1994) já estudaram este fator importante e confirmaram a sua influência. A eficiência de remoção de nutrientes pelas macroalgas pode ser melhorada com o aumento da intensidade luminosa, particularmente na ingestão de nitratos (Jones et al., 2001), estando este processo relacionado com a indução da atividade da nitrato redutase (Corzo and Niell, 1994). Intensidades luminosas muito elevadas podem, também, provocar danos no DNA das algas, e inibir os processos fotossintéticos e enzimas relacionadas com a assimilação de azoto inorgânico (Cabello-Pasini et al., 2010), ocorrendo assim um fenómeno de fotoinibição (Loban and Harrison, 1997).

No ensaio preliminar de biorremediação, além do desenvolvimento de um sistema de incubação em laboratório, também foi pretendido verificar o comportamento de *Ulva* em função da disponibilidade de duas soluções com uma concentração conhecida de nitratos ( $\text{KNO}_3$ ). Não se julgou necessária a utilização dos dois tipos de alga por este ensaio se apresentar apenas como um estudo preliminar de biorremediação. A escolha de *Ulva* esteve relacionada com a sua abundância no local de amostragem e pela facilidade do seu manuseamento. A escolha de uma gama de concentrações de  $\text{KNO}_3$  tão distinta ( $50$  e  $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) foi propositada, de modo a estudar a capacidade de assimilação de nitratos em duas situações opostas, e para verificar o tempo necessário para a alga efetuar o tratamento. Valores próximos da primeira concentração testada ( $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) podem ocorrer facilmente em sistemas de aquacultura (Kang et al., 2011; Liu et al., 2010), ou em zonas costeiras que sofrem de forte influência antropogénica (He et al., 2008). A segunda concentração testada ( $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) pode resultar em cinéticas de saturação de assimilação de nutrientes (Abreu et al., 2011), e a sua ocorrência na natureza pode indicar um grave problema ambiental.

Na incubação da solução de  $\text{KNO}_3$   $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , *Ulva* apresentou uma grande capacidade de remoção de nitratos, necessitando apenas de 3 horas para atingir um NRE de 99,5%. Durante este período de tempo a alga apresentou uma taxa de ingestão (NUR) de nitratos de  $15,389 \pm 0,072 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Este valor foi praticamente duas vezes superior, durante a primeira hora de incubação ( $28,865 \pm 3,803 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Num estudo efetuado com *Ulva prolifera* e *Ulva linza* (Luo et al., 2012), também foi

verificado que as taxas de ingestão de nitratos foram superiores nos instantes iniciais de incubação (0 – 30 minutos).

Na incubação realizada com uma solução de  $\text{KNO}_3$   $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , a alga não removeu a totalidade dos nitratos disponíveis no meio. *Ulva* apresentou uma eficácia de remoção de apenas 28,8%, sendo a concentração inicial de nitratos reduzida de  $700,642 \pm 18,603 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para  $498,950 \pm 1,000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em 4 horas de incubação. Este valor não se alterou significativamente em 8 horas de incubação, representando desta forma o máximo NRE atingido (cerca de 30 %) para a concentração de  $700 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . A ingestão de nitratos apresenta tipicamente cinéticas de saturação, o que significa que com o aumento da concentração de substrato, a capacidade de ingestão atinge um valor máximo (Abreu et al., 2011). Ainda assim, a alga conseguiu fazer remover uma grande quantidade de nitratos do meio (cerca de 200  $\mu\text{mol}$  por cada litro de meio de incubação). *Ulva*, tal como outras macroalgas marinhas, consegue armazenar grandes quantidades deste nutriente (Corzo and Niell, 1994). Tal como aconteceu na incubação anterior, *Ulva* apresentou uma taxa de ingestão de nitratos superior, na primeira hora de incubação ( $86,984 \pm 9,268 \mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). O mesmo tipo comportamento foi verificado em ensaios efetuados com *Laminaria japonica* (Xu et al., 2011).

A presente experiência permitiu também verificar que quanto maior foi a concentração inicial de nitratos, maiores foram os valores de NUR, e menores foram os de NRE. Esta dinâmica é observada devido à própria origem matemática do cálculo destes parâmetros. Enquanto o cálculo de NRE representa uma percentagem de eficiência de remoção que depende só da variação de concentrações, NUR é uma taxa de ingestão que também tem em conta o intervalo de tempo em que decorre cada experiência. Abreu et al. (2011) e Xu et al. (2011) também verificaram a mesma dinâmica em estudos realizados com *Gracilaria vermiculophylla* e *Laminaria japonica*, respetivamente. É na fase inicial de incubação que *Ulva* parece ingerir mais rapidamente os nitratos disponíveis no meio, depois de um período de ausência de nutrientes. Num ensaio realizado com a mesma alga, Corzo and Niell (1994) também verificaram o rápido esgotamento de uma fonte de nitratos, depois de um período de esgotamento de nutrientes.

Os resultados da presente experiência foram superiores aos obtidos por Xu et al. (2011), num estudo semelhante realizado com a alga castanha *Laminaria japonica*. Nesse trabalho, para uma incubação da alga numa solução de  $\text{NaNO}_3$   $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , foi obtido um NRE de 42%, em 36 horas de incubação. Ainda no mesmo estudo, para uma

solução de  $\text{NaNO}_3$   $240 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , foi obtido um NRE de 44%, também em 36 horas de incubação. Numa incubação (2 horas) com *Gracilaria vermiculophylla* (Abreu et al., 2011) foi obtida uma eficiência de remoção de aproximadamente 38 % para uma solução de  $\text{NaNO}_3$   $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Este resultado é também inferior aos valores obtidos neste trabalho. Adicionalmente, o período de incubação aplicado na presente experiência foi inferior comparativamente a outros estudos (Hernández et al., 2002; Huo et al., 2012; Kang et al., 2011; Liu et al., 2010; Marinho-Soriano et al., 2009b, 2011; Skriptsova and Miroshnikova, 2011; Xu et al., 2011). *Ulva* pode ser assim vista como um agente biorremediador muito eficiente, em meios com concentrações de nitratos muito elevadas.

#### **4.4. Vias metabólicas seguidas pelo azoto inorgânico durante o processo de biorremediação.**

Como já foi observado e discutido nas secções anteriores, *Ulva* e *Enteromorpha* assimilam nitratos preferencialmente em meios com salinidades próximas de  $36 \text{ g.L}^{-1}$ . Na secção anterior também foi verificada a elevada eficiência e capacidade de remoção de nitratos por parte de *Ulva*. Este ensaio teve como objetivo a verificação da capacidade biorremediadora de *Ulva* e *Enteromorpha* num efluente real. Também foi objetivo neste ensaio, perceber qual a resposta fisiológica das algas perante a presença de uma fonte de nutrientes azotados.

##### **4.4.1. Remoção de nutrientes da coluna de água**

O efluente utilizado, foi escolhido de forma a proporcionar às algas em estudo as melhores condições de assimilação de nutrientes, tendo em conta as informações obtidas nos ensaios anteriores, nomeadamente a otimização da assimilação de nitratos em meios com salinidades próximas de  $35 \text{ g.L}^{-1}$  e a capacidade de *Ulva* remover grandes quantidades deste nutriente. A especificidade de uma alga para remover eficientemente um tipo de nutriente e as diferentes condições experimentais testadas, são as principais razões contabilizadas para a diversidade de performances verificadas dentre os vários *taxa* (Xu et al., 2011). A escolha de um tipo de alga, otimizado para o tratamento de um sistema de aquacultura, torna-se um processo muito importante, para proporcionar a sustentabilidade ambiental de uma exploração (Kang et al., 2011). O efluente utilizado

foi originário de um tanque de pré-engorda intensiva, onde é cultivada a espécie *Argyrosomus regius* (Corvina). A salinidade medida no tanque foi de 35 g.L<sup>-1</sup>. Este tipo de efluente tem como característica a presença de nitratos, nitritos e amónia, além de outros nutrientes como o fósforo (Kang et al., 2011; Shu et al., 2004; Xu et al., 2011). Estes tipos de nutrientes são originados pela remineralização da matéria orgânica gerada pelos restos da alimentação e pelos resíduos metabólicos dos animais cultivados (Huo et al., 2012; Jones et al., 2001; Marinho-Soriano et al., 2011; Skriptsova and Miroshnikova, 2011). Estes nutrientes quando libertados podem provocar problemas ambientais como fenómenos de eutrofização, esgotamento de oxigénio, mudanças de biodiversidade e poluição das zonas costeiras (Troell et al., 2003). As algas têm então sido largamente utilizadas em conjunto com explorações de aquacultura (Cruz-Suárez et al., 2010; Hernández et al., 2002; Huo et al., 2012; Jiménez del Río et al., 1996; Jones et al., 2001; Kang et al., 2011; Liu et al., 2010; Marinho-Soriano et al., 2011, 2009a, 2009b; de Paula Silva et al., 2008; Skriptsova and Miroshnikova, 2011; Troell et al., 1997; Yokoyama and Ishihi, 2010), para remover a carga de nutrientes em excesso e prevenir assim estas ameaças. A este tipo de processo dá-se o nome de biorremediação.

Ao longo das duas incubações realizadas (*Ulva* e *Enteromorpha*), as concentrações dos nutrientes presentes no ensaio controlo mantiveram-se relativamente constantes. Desta forma a diminuição das concentrações de nutrientes verificada ocorreu devido à presença das macroalgas (Fei, 2004), e não por outros tipos de organismos como bactérias e fitoplâncton (Jones et al., 2001). Estes organismos podem utilizar os nutrientes disponíveis, reduzindo a sua concentração na coluna de água (Jones et al., 2001). A etapa de filtração do efluente, antes da sua utilização na experiência, mostra-se assim muito importante, pois permite a retenção no filtro da maioria das impurezas que poderiam prejudicar os ensaios.

A concentração inicial de cada nutriente variou entre ensaios. Este facto ocorreu por as recolhas do efluente terem sido realizadas com uma semana de diferença, devido ao planeamento deste ensaio. Ainda assim, as diferenças observadas não foram muito acentuadas. As concentrações de nitritos obtidas neste trabalho foram muito baixas (próximas de zero), não sendo assim consideradas importantes para discussão neste trabalho. No entanto, não seria de esperar uma concentração muito elevada deste nutriente devido à toxicidade que pode provocar no interior das algas (Vennesland and Guerrero, 1979). No caso dos nitratos, a concentração inicial nos dois ensaios foi semelhante (aproximadamente 5 µmol.L<sup>-1</sup>). Na incubação com *Enteromorpha*, a

concentração inicial de amónia foi ligeiramente superior ao observado com a *Ulva* ( $20,819 \pm 1,500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $14,226 \pm 1,386 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respetivamente). Noutro estudo semelhante (Skriptsova and Miroshnikova, 2011), efluentes provenientes da cultura de mexilhão tiveram uma carga inicial de amónia e nitratos de  $57\text{-}64 \mu\text{M}$  e  $7,4 \mu\text{M}$ , respetivamente. Em viveiros de camarão (*Litopenaeus vannamei*) a concentração inicial de amónia e nitratos foi de  $7,8\text{-}8,04 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $0,44\text{-}6,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respetivamente (Marinho-Soriano et al., 2009a, 2009b). No tratamento de efluentes utilizando culturas mistas de *Gracilaria caudata* e artémia (*Artemia franciscana*), foi obtida uma concentração de amónia de  $11,84 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , e uma concentração de nitratos de  $6,16 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Marinho-Soriano et al., 2011).

*Ulva* mostrou uma eficácia de remoção de nitratos superior a *Enteromorpha*. Com 30 minutos de incubação, a *Ulva* apresentou um NRE de 96 %, enquanto a *Enteromorpha* 84 %. Algumas algas podem apresentar uma maior especificidade na remoção de um nutriente do que outras (He et al., 2008; Jones et al., 2001; Skriptsova and Miroshnikova, 2011; Xu et al., 2011). *Ulva* apresenta assim uma maior especificidade para remover nitratos do que *Enteromorpha*. Ainda assim, as duas algas apresentaram uma eficácia de remoção de nitratos elevada, já que com apenas 30 minutos de incubação são atingidas eficiências superiores a 80%. Dentro deste intervalo de tempo, *Ulva* em 15 minutos de incubação, ingeriu nitratos a uma taxa mais elevada do que *Enteromorpha*. Com 30 minutos de incubação essa situação reverteu-se. O facto de as algas apresentarem NUR superiores nos momentos iniciais de incubação, pode inferir uma estratégia competitiva para a assimilação de nutrientes em relação a outros *taxa* (Abreu et al., 2011; Thomas and Harrison, 1985; Young et al., 2009). A partir desse ponto, os valores de NUR observados justificam-se pela forma como foram realizados os cálculos. Cada amostragem efetuada foi independente das restantes, não existindo qualquer tipo de relação entre amostras. No contexto do planeamento experimental dos ensaios, os valores de NUR representaram então as velocidades médias de absorção, durante o período de incubação de cada momento de amostragem. Mesmo tendo sido verificadas algumas diferenças, as duas algas conseguiram remover quase a totalidade dos nitratos presentes em 1 hora de incubação (98 % para *Ulva*; 99 % para *Enteromorpha*).

A amónia, mesmo presente em maior concentração, foi removida do meio mais rapidamente que os nitratos, nos dois ensaios. O mesmo tipo de comportamento foi verificado por Liu et al. (2010). As algas necessitaram de apenas 30 minutos, para

reduzir a concentração inicial de amónia para valores próximos de zero. As duas algas parecem desta forma dar preferência à assimilação de amónia, se estiver presente no meio. Esta observação pode ser justificada pelo facto de esta forma de azoto inorgânico se encontrar no seu estado iónico mais reduzido, não necessitando as algas de gastar tanta energia na redução dos nitratos a amónia antes do processo de incorporação (He et al., 2008; Hurd et al., 1995; Jones et al., 2001; Liu et al., 2010; Luo et al., 2012; Teichberg et al., 2007). A preferência pela amónia pode explicar a taxa de ingestão de nitratos mais baixa (He et al., 2008), verificada nos primeiros 15 minutos de incubação do ensaio com *Enteromorpha*. Mesmo apresentando maior especificidade na assimilação de amónia, as duas algas continuaram a remover nitratos do meio, embora que a taxas de ingestão mais baixas. Vários autores também observaram esta dinâmica (Kang et al., 2011; Marinho-Soriano et al., 2009b; Teichberg et al., 2007; Thompson and Valiela, 1999). De facto a eficácia de remoção de amónia é muito elevada para as duas algas. Com 30 minutos de incubação, a *Ulva* apresentou um NRE de 97 %, e a *Enteromorpha* 99 %.

As taxas de ingestão de nutrientes calculadas na incubação com *Enteromorpha* foram superiores às observadas em *Ulva*, com exceção do resultado obtido para os nitratos, nos primeiros 15 minutos de incubação. Esta observação poder-se-á explicar pelo facto de *Enteromorpha* apresentar uma maior superfície específica de contacto em relação a *Ulva*, devido à sua estrutura filamentosa (Luo et al., 2012). Deste modo, a alga está em maior contacto com a coluna de água, podendo assim remover nutrientes a uma taxa superior (Kim et al., 2007). Luo et al. (2012) demonstraram nos seus estudos, que a alga filamentosa *Ulva prolifera* obteve um maior crescimento, e uma maior capacidade de ingestão de nutrientes, do que *Ulva linza* (estrutura foliácea).

Os resultados obtidos para os dois ensaios permitiram verificar que as algas necessitaram apenas de 1 hora de incubação, para reduzir as concentrações iniciais de cada nutriente, para valores próximos de zero. O género *Ulva* tem a capacidade de absorver e metabolizar azoto inorgânico rapidamente (Jiménez del Río et al., 1996). *Ulva* e *Enteromorpha* apresentam-se assim como bons agentes biorremediadores, para efluentes com as características verificadas. Estes resultados foram tão ou mais satisfatórios, tanto em valores absolutos, como em termos relativos, i.e., quando comparados com outros estudos de biorremediação. A comparação direta entre estudos não é, no entanto, fácil, pelas muitas variáveis existentes entre os trabalhos: tipos de algas e efluentes utilizados, metodologias de análise, influências de fatores testadas, etc.

Liu et al. (2010) realizaram incubações com *Ulva pertusa* num efluente proveniente do cultivo de pregado (*Scophthalmus maximus*) e, em 7 horas, cerca de 80 % de azoto inorgânico dissolvido (nitratos, nitritos e amónia) foram removidos de uma concentração inicial de 34,3  $\mu\text{M}$ . Kang et al. (2011) incubaram a mesma alga num efluente de peixes da espécie *Sebastes schlegeli* durante 7 dias, obtendo eficiências de remoção de 83,9 % e 22 % para as concentrações iniciais de amónia (75,6  $\mu\text{M}$ ) e nitratos mais nitritos (70,8  $\mu\text{M}$ ), respetivamente. Estudos realizados com algas vermelhas (*Gracilaria vermiculophylla*) e com algas castanhas (*Undaria pinnatifida*), em efluentes provenientes da cultura de mexilhões, mostraram uma alta eficiência na remoção de amónia (entre 70-90%) (Skriptsova and Miroshnikova, 2011). Nesse trabalho foram testados dois tipos de incubação: sem circulação de efluente (6 h) e com circulação de efluente (8 dias). As taxas de ingestão para a amónia foram  $13,1 \pm 0,4 \mu\text{mol.g}^{-1}(\text{PS}).\text{h}^{-1}$  (sem circulação) e  $29,1 \pm 2,1 \mu\text{mol.g}^{-1}(\text{PS}).\text{h}^{-1}$  (com circulação). Em ensaios com efluentes provenientes da cultura de camarão, incubando *Gracilaria caudata* (Rhodophyta) durante 72 h, foram obtidos valores inferiores aos obtidos na presente experiência (Marinho-Soriano et al., 2011). Nesse trabalho (Marinho-Soriano et al., 2011), as concentrações iniciais de amónia e nitratos foram semelhantes às obtidas no efluente testado do presente ensaio ( $11,84 \pm 0,54 \mu\text{M}$  e  $6,16 \pm 0,30 \mu\text{M}$ , respetivamente), sendo obtidas eficiências de remoção de 23% para a amónia, nas primeiras 48 horas, e 71% para os nitratos, em 72 h de incubação. Marinho-Soriano et al. (2009b) já tinha realizado um ensaio semelhante ao efetuado no presente trabalho, utilizando o mesmo tipo de alga e efluente descritos anteriormente. Nesse ensaio laboratorial as eficiências de remoção também foram inferiores às obtidas no presente trabalho. Os resultados mostraram uma capacidade de biorremediação de 59,5% para amónia (52,05-18,33  $\mu\text{M}$ ) e 49,6% para nitratos, em 4 horas de incubação. Hernández et al. (2002) realizaram estudos com três algas estuarinas em efluentes de cultura de robalo (*Dicentrarchus labrax*) e, em 7 horas de incubação, foram obtidas eficiências de remoção de 97,7 % (*Ulva rotundata* e *Enteromorpha intestinalis*) e 93,2 % (*Gracilaria gracilis*) para amónia (para concentrações iniciais de 34-62  $\mu\text{M}$ ). A alga vermelha *Gracilaria verrucosa* foi cultivada numa exploração de peixes da espécie *Pseudosciaena crocea* durante perto de 2 meses, sendo removidas 61 % e 47 % das concentrações iniciais de amónia e nitratos, respetivamente (Huo et al., 2012).

#### **4.4.2. Evolução das reservas internas (RI) de nutrientes e da atividade enzimática da nitrato redutase (NRA)**

As vias metabólicas seguidas pelas formas de azoto inorgânico, após a remoção de nutrientes pelas algas, também foram estudadas. No ensaio com *Ulva*, foi verificada uma quantidade inicial de RI de nitratos próxima de zero. Neste caso, a etapa de pré-incubação mostrou-se um processo eficaz para o esgotamento das reservas acumuladas internamente pela alga. Este processo mostrou-se, no entanto, menos eficaz no esgotamento da amónia. Da mesma forma, no ensaio com *Enteromorpha*, as RI de nitratos e amónia não foram completamente gastas antes de a incubação iniciar. Para que as RI de nutrientes tivessem sido completamente esgotadas, talvez teria sido necessário um período de pré-incubação mais alargado, e condições de luminosidade diferentes (Cabello-Pasini et al., 2010; Chow et al., 2004; Corzo and Niell, 1991, 1994; Young et al., 2009).

Mesmo tendo sido observadas diferenças entre as algas, foram verificados aumentos nos valores de RI para os primeiros minutos de incubação. No ensaio com *Ulva*, ocorreu uma acumulação de nitratos até aos 30 minutos de incubação, que coincidiu com a remoção da maioria deste nutriente do efluente. Corzo and Niell (1994) também verificaram esta dinâmica entre a remoção e acumulação de nitratos do meio. O mesmo tipo de comportamento foi observado no ensaio com *Enteromorpha*. Esta alga apresentou uma capacidade de acumulação interna de nitratos superior a *Ulva*. Nos ensaios preliminares de biorremediação, *Ulva* removeu grandes quantidades de nitratos da coluna de água. Essas quantidades removidas podem ter sido primeiro acumuladas internamente (Kang et al., 2011; Yokoyama and Ishihi, 2010). As algas estudadas pertencem ao mesmo género (*Ulva*) (Hayden et al., 2003), e parecem, também, ter uma característica comum de armazenamento de grandes quantidades de nitratos. Corzo and Niell (1994) verificaram que *Ulva rigida* tem capacidade para armazenar grandes quantidades de nitratos (aproximadamente  $70 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g PS}^{-1}$ ). Após o período de acumulação de nitratos verificado, as RI das duas algas começaram a diminuir progressivamente até ao final do período de incubação. O consumo destas RI está relacionado com o processo de assimilação de nitratos, catalisado pela nitrato redutase (Berges, 1997; Chow et al., 2004; Corzo and Niell, 1991, 1994; Hurd et al., 1995; Lartigue and Sherman, 2002; Liu et al., 2010).

No ensaio com *Ulva*, não foi verificada acumulação de amónia, ao contrário do que aconteceu com os nitratos, observando-se até uma diminuição de valores entre a

primeira e segunda horas de incubação. A quantidade de amónia absorvida do efluente, ao longo do período de incubação, poderá ter sido de imediato utilizada no processo de incorporação na alga (Teichberg et al., 2007), sem existir tempo para ser acumulada. A confirmação desta suposição só poderia ser realizada com o controlo dos processos metabólicos relacionados com a atividade da glutamina sintetase e da glutamato sintetase (Guerrero et al., 1981; Pregnall et al., 1987; Teichberg et al., 2007). Considera-se que a amónia é fixada nas algas e nas plantas superiores através desta via metabólica (Corzo and Niell, 1994). No caso da incubação realizada com *Enteromorpha*, observou-se um período de acumulação de amónia (30 minutos), equivalente ao que se verificou no caso dos nitratos. Esta acumulação coincidiu com a remoção de amónia no efluente. A quantidade de amónia acumulada por *Enteromorpha* foi superior daquela que se determinou para os nitratos, o que pode ser explicado pelo facto de a concentração inicial de amónia presente no efluente ter sido superior à concentração de nitratos. Após o período de acumulação, *Enteromorpha* consumiu mais rapidamente a amónia armazenada do que os nitratos. Estas observações reforçam a ideia de que as duas algas estudadas têm preferência para a utilização de amónia (He et al., 2008; Jones et al., 2001; Liu et al., 2010; Loban and Harrison, 1997; Luo et al., 2012; Teichberg et al., 2007). Apesar da preferência pela amónia, a metabolização dos nitratos continuou a ser realizada. A utilização simultânea de nitratos e amónia pode ser uma estratégia das macroalgas para obterem maiores quantidades de azoto inorgânico por unidade de tempo (Kang et al., 2011; Kim et al., 2007; Marinho-Soriano et al., 2009b).

Com os resultados obtidos poder-se-á dizer que as duas algas estudadas, ao serem incubadas com o efluente, assimilaram imediatamente os nutrientes presentes, acumulando-os internamente (com exceção da amónia no caso de *Ulva*), para serem depois metabolizados. O período em que as algas acumulam os nutrientes poderá ser útil para a indução das principais enzimas participantes no processo de metabolização de azoto inorgânico (nitrato redutase, nitrito redutase e glutamina sintetase) (Corzo and Niell, 1994; Guerrero et al., 1981; Hong et al., 2011; Lartigue and Sherman, 2005; Pregnall et al., 1987). A rapidez de remoção e acumulação de nutrientes pode, também, beneficiar as algas, fazendo com que estas possam utilizar fontes pontuais de nutrientes, que ocorram na coluna de água (Troell et al., 1997). Em *Enteromorpha*, a metabolização dos nutrientes acumulados tende a atingir um valor patamar, próximo dos valores medidos inicialmente, no final das incubações. As algas estudadas parecem não utilizar a totalidade do azoto acumulado, de modo a ser possível a utilização em

épocas de maior ausência de nutrientes (Bird et al., 1982; Teichberg et al., 2007; Troell et al., 1997; Young et al., 2009). Para analisar esta suposição seria necessário prolongar o estudo aumentando o tempo de incubação aplicado.

Os valores máximos de NRA observados nas experiências realizadas com efluente de aquacultura estão entre 0,6-0,7  $\mu\text{mol.g PS}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Estes valores são próximos daqueles obtidos para uma das combinações realizadas na primeira experiência, utilizando uma solução de salinidade 36  $\text{g.L}^{-1}$  e uma temperatura de incubação de 20 °C. Nos dois ensaios os valores iniciais de NRA não foram nulos, mas muito próximos de zero. As algas, quando não estão “em contacto” com nutrientes, não suprimem por completo a atividade da nitrato redutase, mantendo um valor mínimo para puderem reagir de imediato a um pulso de nutrientes (Corzo and Niell, 1994; Lartigue and Sherman, 2002, 2005; Thomas and Harrison, 1985; Young et al., 2009). Lartigue and Sherman (2005) também detetaram valores residuais de NRA em pré-tratamentos sem adição de uma fonte de nitratos, em ensaios realizados com *Enteromorpha*. Comparando os resultados da NRA e das RI de nitratos das duas algas, constata-se que nos dois casos a NRA atinge valores máximos após as RI acumuladas começarem a ser consumidas. Young et al. (2009) também verificaram nos seus ensaios um aumento da NRA depois de um período de acumulação de nitratos. Os nitratos que não são reduzidos de imediato são acumulados, induzindo a formação de mais enzima (NRA) para que possam ser metabolizados progressivamente (Berges, 1997; Corzo and Niell, 1994; Lartigue and Sherman, 2005). No caso de *Ulva*, o valor máximo de NRA corresponde, na prática, a um patamar. Esse patamar pode corresponder à capacidade máxima da alga para transformar os nitratos a nitritos ou, então, resultou da inibição da enzima devido à presença de amónia (Berges, 1997; Corzo and Niell, 1994; Hurd et al., 1995; Lartigue and Sherman, 2002, 2005; Loban and Harrison, 1997; Teichberg et al., 2007; Thomas and Harrison, 1985; Xu et al., 2011; Young et al., 2009). Corzo and Niell (1994) verificaram que o aumento da NRA saturou com o tempo de incubação (depois da adição de um pulso de nitratos de 300  $\mu\text{M}$ ). Nesse estudo, aqueles autores também verificaram que, apesar de a amónia ser considerada um repressor da NRA, essa influência não foi sentida. Não se observou um valor assintótico no ensaio realizado com *Enteromorpha*. Para verificar se a NRA nesta alga atinge também um valor patamar, seria necessário prolongar o tempo de incubação.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho visou estudar a capacidade biorremediadora das macroalgas verdes *Ulva* e *Enteromorpha*, vistas como uma possível solução para os problemas ambientais provocados pela descarga de resíduos e efluentes, provenientes de agro-indústrias. Após a análise e discussão dos resultados foram estabelecidas as seguintes conclusões:

- 1) A temperatura e a salinidade afetaram o processo de assimilação de nitratos em *Ulva* e *Enteromorpha*. Este trabalho mostrou que as duas algas apresentaram valores máximos de atividade da nitrato redutase, em salinidades próximas das verificadas no local de amostragem. A salinidades mais baixas, a assimilação de nitratos também ocorre, embora que a taxas mais reduzidas. Nestas salinidades, *Ulva* mostrou maior capacidade de assimilação de nitratos que *Enteromorpha*. A NRA também é afetada pela temperatura do meio onde estão presentes as algas, sendo que *Enteromorpha* apresentou um NRA máximo a uma temperatura superior a *Ulva*. A temperatura e a salinidade poderão assim ser utilizadas para otimizar a assimilação de nitratos, num processo de biorremediação utilizando as algas estudadas neste trabalho;
- 2) Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que *Ulva* e *Enteromorpha* têm capacidade de remover eficazmente os nutrientes azotados presentes num efluente de aquacultura. Estas algas conseguem remover rapidamente grandes quantidades de azoto inorgânico do meio, mostrando uma maior especificidade para a ingestão de amónia. *Ulva* e *Enteromorpha* apresentam-se assim como potenciais candidatas para utilização em processos de biorremediação de efluentes com características próximas do estudado neste trabalho;
- 3) Durante o processo de biorremediação, as formas de azoto inorgânico ingeridas pelas algas seguem diferentes vias metabólicas. Os nutrientes azotados são primeiro acumulados internamente depois de removidos da coluna de água, com exceção da amónia no caso de *Ulva*. Neste caso, a amónia é utilizada diretamente no processo de incorporação de azoto inorgânico. Depois do período de acumulação, as algas metabolizam esses nutrientes, mostrando maior especificidade para a utilização de amónia. A assimilação de nitratos ocorre mesmo sendo verificada a preferência metabólica pela amónia. Deste modo, *Ulva* e *Enteromorpha* utilizam simultaneamente nitratos e amónia, o que pode significar, juntamente com a rapidez

de remoção e acumulação de nutrientes, uma vantagem competitiva em relação a outros *taxa*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, M.H., Pereira, R., Buschmann, A.H., Sousa-Pinto, I., and Yarish, C. (2011). Nitrogen uptake responses of *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss under combined and single addition of nitrate and ammonium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407, 190–199.
- Alexandre, A., Silva, J., and Santos, R. (2004). The maximum nitrate reductase activity of the seagrass *Zostera noltii* (Hornem.) varies along its vertical distribution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 307, 127–135.
- Aníbal, J.M.C. (2004). Processos ecológicos que controlam a dinâmica das macroalgas Ulvales (Chlorophyta) na Ria Formosa. Universidade do Algarve.
- Aníbal, J.M.C., and Sprung, M. (1997). Dinâmica das Ulvales (Chlorophyta) na Ria Formosa. In 2º Encontro Nacional De Ecologia, (Coimbra, Portugal), p. 118.
- Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology* (Boca Raton: CRC Press).
- Berges, J.A. (1997). Miniview: algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology* 32, 3–8.
- Bird, K.T., Habig, C., and DeBusk, T. (1982). Nitrogen allocation and storage patterns in *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 18, 344–348.
- Brito, A., Newton, A., Tett, P., and Fernandes, T.F. (2010). Sediment and water nutrients and microalgae in a coastal shallow lagoon, Ria Formosa (Portugal): implications for the Water Framework Directive. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 318–328.
- Burkholder, J.M., Tomasko, D. a., and Touchette, B.W. (2007). Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350, 46–72.
- Cabello-Pasini, A., Macías-Carranza, V., Abdala, R., Korbee, N., and Figueroa, F.L. (2010). Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 23, 363–369.
- Chow, F., De Oliveira, M.C., and Pedersén, M. (2004). In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*. *Journal of Plant Physiology* 161, 769–776.
- Corzo, A., and Niell, F.X. (1991). Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. Agardh by the in situ method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 146, 181–191.

- Corzo, A., and Niell, F.X. (1994). Nitrate-reductase activity and in vivo nitrate-reduction rate in *Ulva rigida* illuminated by blue light. *Marine Biology* 120, 17–23.
- Cravo, A., Pereira, C., Gomes, T., Cardoso, C., Serafim, A., Almeida, C., Rocha, T., Lopes, B., Company, R., Medeiros, A., et al. (2012). A multibiomarker approach in the clam *Ruditapes decussatus* to assess the impact of pollution in the Ria Formosa lagoon, South Coast of Portugal. *Marine Environmental Research* 75, 23–34.
- Cruz-Suárez, L.E., León, A., Peña-Rodríguez, A., Rodríguez-Peña, G., Moll, B., and Ricque-Marie, D. (2010). Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301, 64–68.
- Fei, X. (2004). Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation. *Hydrobiologia* 512, 145–151.
- FIPA (2010). Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares.
- Fulweiler, R.W., Rabalais, N.N., and Heiskanen, a S. (2012). The eutrophication commandments. *Marine Pollution Bulletin* 64, 1997–1999.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., and Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis* (Weinheim: Verlag Chemie).
- Grizzetti, B. (2011). Nitrogen as a threat to European water quality. *The European Nitrogen Assessment* 379–404.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M., and Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate- reducing system and its regulations. *Annu Rev Plant Physiol* 32, 169–204.
- Hayden, H.S., Blomster, J., Maggs, C.A., Silva, P.C., Stanhope, M.J., and Waaland, J.R. (2003). Linnaeus was right all along : *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera  
Linnaeus was right all along : *Viva* and *Ellterolnorplla* are not distinct genera. *European Journal of Phycology* 38, 37–41.
- He, P., Xu, S., Zhang, H., Wen, S., Dai, Y., Lin, S., and Yarish, C. (2008). Bioremediation efficiency in the removal of dissolved inorganic nutrients by the red seaweed, *Porphyra yezoensis*, cultivated in the open sea. *Water Research* 42, 1281–1289.
- Hernández, I., Tovar, A., and Vergara, J.J. (2002). Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass ( *Dicentrarchus labrax* ) waste waters 2 . Ammonium. *Journal of Applied Phycology* 14, 375–384.
- Hong, H.-S., Wang, Y.-J., and Wang, D.-Z. (2011). Response of phytoplankton to nitrogen addition in the Taiwan strait upwelling region: Nitrate reductase and glutamine synthetase activities. *Continental Shelf Research* 31, S57–S66.

Huo, Y., Wu, H., Chai, Z., Xu, S., Han, F., Dong, L., and He, P. (2012). Bioremediation efficiency of *Gracilaria verrucosa* for an integrated multi-trophic aquaculture system with *Pseudosciaena crocea* in Xiangshan harbor, China. *Aquaculture* 326-329, 99–105.

Hurd, C.L., Berges, J.A., Osborne, J., and Harrison, P.J. (1995). An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *fucus gardneri* (phaeophyta). *Journal of Phycology* 31, 835–843.

INE, I.N. de E. (2007). Classificação Portuguesa das Actividades Económicas.

IPIMAR (2013). Instituto de Investigação das Pescas e do Mar.

Jiménez del Río, M., Ramazanov, Z., and García-Reina, G. (1996). *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. *Hydrobiologia* 326/327, 61–66.

Jones, A.B., Dennison, W.C., and Preston, N.P. (2001). Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture* 193, 155–178.

Kang, Y.H., Park, S.R., and Chung, I.K. (2011). Biofiltration efficiency and biochemical composition of three seaweed species cultivated in a fish-seaweed integrated culture. *Algae* 26, 97–108.

Kim, J.K., Kraemer, G.P., Neefus, C.D., Chung, I.K., and Yarish, C. (2007). Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. *Journal of Applied Phycology* 19, 431–440.

Lartigue, J., and Sherman, T.D. (2002). Field assays for measuring nitrate reductase activity in *Enteromorpha* sp. *Journal of Phycology* 38, 971–982.

Lartigue, J., and Sherman, T.D. (2005). Response of *Enteromorpha* sp. (Chlorophyceae) to a nitrate pulse: nitrate uptake, inorganic nitrogen storage and nitrate reductase activity. *Marine Ecology Progress Series* 292, 147–157.

Liu, J., Wang, Z., and Lin, W. (2010). De-eutrophication of effluent wastewater from fish aquaculture by using marine green alga *Ulva pertusa*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28, 201–208.

Loban, C.S., and Harrison, P.J. (1997). *Seaweed Ecology and Physiology* (New York: Cambridge University Press).

Luo, M.B., Liu, F., and Xu, Z.L. (2012). Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquatic Botany* 100, 18–24.

Marinho-Soriano, E., Nunes, S.O., Carneiro, M.A.A., and Pereira, D.C. (2009a). Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*. *Biomass and Bioenergy* 33, 327–331.

- Marinho-Soriano, E., Panucci, R.A., Carneiro, M.A.A., and Pereira, D.C. (2009b). Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bioresource Technology* 100, 6192–6198.
- Marinho-Soriano, E., Azevedo, C.A.A., Trigueiro, T.G., Pereira, D.C., Carneiro, M.A.A., and Camara, M.R. (2011). Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 253–257.
- Markou, G., and Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88, 3389–3401.
- Massa, S.I., Arnaud-Haond, S., Pearson, G.A., and Serrão, E.A. (2009). Temperature tolerance and survival of intertidal populations of the seagrass *Zostera noltii* (Hornemann) in Southern Europe (Ria Formosa, Portugal). *Hydrobiologia* 619, 195–201.
- McKee, T., and McKee, J.R. (2003). *Biochemistry - The Molecular Basis of Life* (New York: McGraw-Hill).
- Morand, P., and Briand, X. (1996). Excessive growth of macroalgae: a symptom of environmental disturbance. *Botanica Marina* 39, 491–516.
- Newton, A., and Mudge, S.M. (2003). Temperature and salinity regimes in a shallow, mesotidal lagoon, the Ria Formosa, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57, 73–85.
- Nielsen, M.M., Bruhn, A., Rasmussen, M.B., Olesen, B., Larsen, M.M., and Møller, H.B. (2011). Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *Journal of Applied Phycology* 24, 449–458.
- Nixon, S.W. (1995). Coastal Marine Eutrophication: A Definition, Social Causes, and Future Concerns. *Ophelia* 41, 199–219.
- De Paula Silva, P.H., McBride, S., De Nys, R., and Paul, N. a. (2008). Integrating filamentous “green tide” algae into tropical pond-based aquaculture. *Aquaculture* 284, 74–80.
- Pregnall, A.M., Smith, R.D., and Alberte, R.S. (1987). Glutamine synthetase activity and free amino acid pools of eelgrass (*Zostera marina* L.) roots. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 106, 211–228.
- Shu, T.F., Wen, Y.M., Jia, H.L., Xu, X.R., Wang, W.Q., and Yang, L. (2004). Influence of cage culture in Yaling Bay on water environment. *Environmental Sciences* 25, 97–101.
- Sivakumar, G., Xu, J., Thompson, R.W., Yang, Y., Randol-Smith, P., and Weathers, P.J. (2012). Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology* 107, 1–9.

- Skriptsova, A. V., and Miroshnikova, N. V. (2011). Laboratory experiment to determine the potential of two macroalgae from the Russian Far-East as biofilters for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Bioresource Technology* 102, 3149–3154.
- Smil, V. (1997). Global Population and Nitrogen Cycle. *Scientific American Julho*.
- Sprung, M. (1994). Macrobenthic secondary production in the intertidal zone of the Ria Formosa - a lagoon in southern Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 38, 539–558.
- Teichberg, M., Heffner, L.R., Fox, S., and Valiela, I. (2007). Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term N supply. *Marine Biology* 151, 1249–1259.
- Thassitou, P.K., and Arvanitoyannis, I.S. (2001). Bioremediation : a novel approach to food waste management. *Trends in Food Science & Technology* 12, 185–196.
- Thomas, T.E., and Harrison, P.J. (1985). Effect of nitrogen supply on nitrogen uptake, accumulation and assimilation in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). *Marine Biology* 85, 269–278.
- Thompson, S.M., and Valiela, I. (1999). Effect of Nitrogen Loading on Enzyme Activity of Macroalgae in Estuaries in Waquoit Bay. *Botanica Marina* 42, 519–529.
- Troell, M., Halling, C., Nilsson, A., Buschmann, A.H., Kautsky, N., and Kautsky, L. (1997). Integrated marine cultivation of *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output. *Aquaculture* 156, 45–61.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A.H., Kautsky, N., and Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226, 69–90.
- Valiela, I. (1995). *Marine ecological processes* (New York: Springer-Verlag).
- Vennesland, B., and Guerrero, M.G. (1979). Reduction of nitrate and nitrite. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, M. Gibbs, and E. Latzko, eds. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag), pp. 425–444.
- Xu, D., Gao, Z., Zhang, X., Qi, Z., Meng, C., Zhuang, Z., and Ye, N. (2011). Evaluation of the potential role of the macroalga *Laminaria japonica* for alleviating coastal eutrophication. *Bioresource Technology* 102, 9912–9918.
- Yokoyama, H., and Ishihi, Y. (2010). Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm — potential role in integrated multi-trophic aquaculture. *Aquaculture* 310, 74–83.
- Young, E.B., Berges, J.A., and Dring, M.J. (2009). Physiological responses of intertidal marine brown algae to nitrogen deprivation and resupply of nitrate and ammonium. *Physiologia Plantarum* 135, 400–411.

## ANEXOS

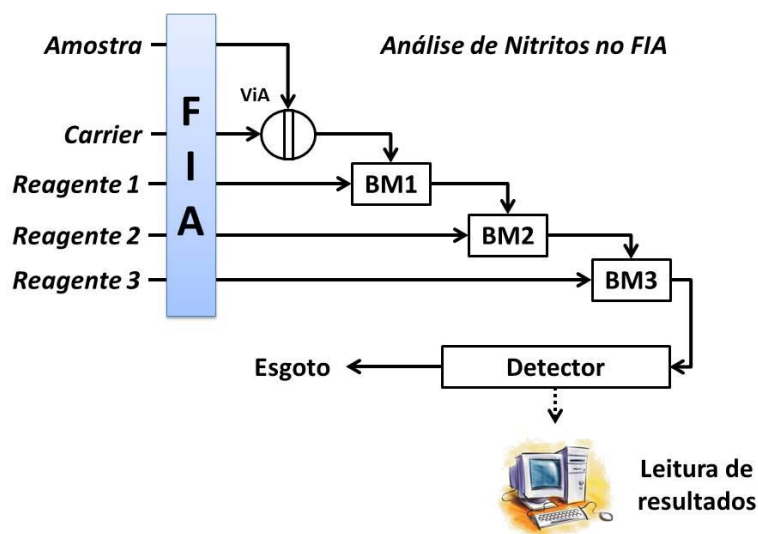
### Anexo I – Metodologia de análise de nutrientes (nitratos, nitritos e amónia) no FIA

#### Preparação dos padrões de calibração

Esta metodologia de análise requer a construção de uma reta de calibração. Os padrões de calibração foram preparados com base nos manuais fornecidos pela marca. Os reagentes utilizados para a preparação dos padrões de calibração foram: 1) nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) para o método de determinação da soma de nitratos e nitritos; 2) nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) para o método de determinação dos nitritos; e 3) cloreto de amónia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) para o método de determinação da amónia. A metodologia apresentada pelos manuais da marca foi ligeiramente alterada, de modo a otimizar as condições de trabalho. Desta forma, foram preparadas 2 soluções padrão *stock* concentradas (72 mM), de modo a que os 2 módulos de análise do equipamento pudessem trabalhar em simultâneo. Ou seja, uma das soluções padrão *stock* foi composta por  $\text{NaNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (para analisar a soma de nitratos e nitritos, e amónia), e a outra por  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (para determinar a concentração de nitritos e amónia nas amostras). Estas soluções *stock*, de concentração 72 mM, foram padrões de armazenamento com uma validade média de 3 meses (baseada na observação da qualidade de resultados ao longo do tempo). Para as análises, cada padrão de armazenamento foi diluído em dois padrões de trabalho, *Standard I* e *Standard II*, de concentrações 720  $\mu\text{M}$  e 144  $\mu\text{M}$ , respetivamente. A partir destes padrões de trabalho foram preparadas 8 soluções de calibração, fazendo diluições sucessivas, para um volume final de 20 mL. As concentrações dos padrões de calibração foram as seguintes: 72  $\mu\text{M}$  para S8, 36  $\mu\text{M}$  para S7, 18  $\mu\text{M}$  para S6, 9  $\mu\text{M}$  para S5, 4,5  $\mu\text{M}$  para S4, 2,25  $\mu\text{M}$  para S3, 1,125  $\mu\text{M}$  para S2 e 0  $\mu\text{M}$  para S1. A solução padrão *Stock* foi preparada com água desionizada Elix®. Os padrões de trabalho e de calibração foram preparados com água desionizada Elix® (no caso de se analisarem amostras de água doce), ou com uma solução de NaCl de concentração ajustada à salinidade das amostras.

## Determinação da concentração de nitritos

Para a determinação de nitritos foi necessário preparar 2 reagentes: uma solução de sulfanilamida, acidificada com ácido clorídrico concentrado; e uma solução de N-(1-naftil)-Etileno Diamina Dicloridrato (NED). Os reagentes foram preparados um dia antes das análises, com água desionizada Elix®, sendo depois transferidos para os respectivos recipientes do FIA, e armazenados no frigorífico (<5 °C) até ao dia da análise das amostras. No dia das análises, os reagentes foram retirados do frigorífico e arrumados nas respetivas posições no analisador 1. Este analisador utiliza um sistema de 3 recipientes, onde são colocados 3 reagentes diferentes. Na análise de nitritos, como só se utilizam dois reagentes, o recipiente correspondente ao reagente 1 foi cheio com água desionizada Elix®. O recipiente do *carrier* também foi cheio com água desionizada Elix® (no caso de amostras de água doce), ou com uma solução de NaCl de concentração ajustada à salinidade das amostras. De igual modo foi cheio o copo de água de lavagem do sistema. O ajuste de salinidade da água a utilizar no sistema é efetuado, para evitar erros de leitura significativos por parte do equipamento. As amostras foram retiradas do frigorífico e colocadas no prato do *auto-sampler*. Os padrões de calibração foram preparados (como foi descrito anteriormente) e colocados nos respetivos copos do *auto-sampler*. Estes foram tapados com papel de alumínio para evitar contaminações do exterior. Após todo o material estar colocado corretamente no analisador 1 e no *auto-sampler*, ligou-se o equipamento e o *software* de recolha de dados, e deu-se início aos procedimentos de arranque do sistema: 1) os tubos dos reagentes foram conectados no recipiente 1, contendo água desionizada; 2) o tubo de injeção de amostra foi conectado na agulha de injeção, e esta mergulhada na água de lavagem do sistema; 3) o tubo do *carrier* foi conectado no respetivo recipiente; 4) o parafuso da cassette de análise do analisador 1 foi apertado; 5) a bomba peristáltica foi montada e deixou-se correr água no sistema. Após todo o sistema estar repleto com água, foi observada a *baseline* da água. Os tubos dos reagentes 2 e 3 foram conectados nos recipientes correspondentes e deixou-se o sistema estabilizar. A *baseline* dos reagentes foi observada. No final dos procedimentos de preparação do sistema deu-se início à leitura da reta de calibração. Depois de terminada e aceite a reta de calibração, criou-se a lista das amostras no *software* e iniciaram-se as análises. Na Figura 18 está representado um esquema de funcionamento do sistema para a análise de nitritos.



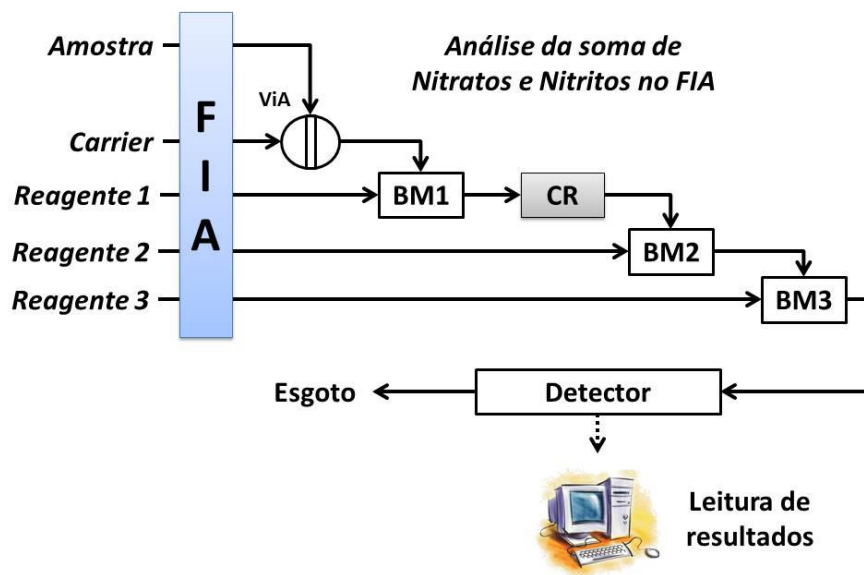
**Figura 18.** Análise de nitritos no FIA (adaptado de FOSS® - *Application Note 5200*).

A amostra é injetada na corrente contínua de *carrier* através de uma válvula de injeção de amostra. A corrente já com a amostra é misturada com o reagente 1 (neste caso água desionizada) na bobina de mistura 1 (BM1). A corrente segue em frente e é de novo misturada, desta vez com o reagente 2 (sulfanilamida), na bobina de mistura 2 (BM2). Por fim o fluxo é misturado com o reagente 3 (NED), na bobina de mistura 3 (BM3), seguindo depois para o detector. A zona da corrente onde está a amostra apresenta uma coloração roxa, que é medida no detector a 540 nm. O *software* do sistema apresenta os resultados no monitor e guarda-os em base de dados, que pode ser acedida posteriormente. Após a passagem da corrente pelo detector, esta sai do sistema para um recipiente de recolha de resíduos, através do tubo de saída do sistema (esgoto). No final das análises, todos os tubos de entrada do equipamento foram conectados em recipientes contendo água desionizada, indicando-se depois ao *software* para iniciar a lavagem do sistema. Depois de esta terminar, todos os tubos foram desconectados, deixando-se passar ar pelo sistema. A bomba peristáltica foi desmontada e desaparafusou-se a cassete de análise. No final destas etapas pôde-se desligar o equipamento.

### **Determinação da concentração da soma de nitratos e nitritos**

Para a determinação da soma de nitratos e nitritos foi necessário preparar 3 reagentes: uma solução tampão de pH 8,5, com cloreto de amónia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e hidróxido de amónia ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ); uma solução de sulfanilamida, acidificada com ácido clorídrico

concentrado; e uma solução de N-(1-naftil)-Etileno Diamina Dicloridrato (NED). Os reagentes foram preparados um dia antes das análises, com água desionizada Elix®, sendo depois transferidos para os respectivos recipientes do FIA, e armazenados no frigorífico (<5 °C) até ao dia de análise das amostras. No dia das análises, os reagentes foram retirados do frigorífico e arrumados nas respetivas posições no analisador 1. Próximo dos reagentes foi colocado um recipiente com água desionizada Elix®. O recipiente do *carrier* também foi cheio com água desionizada Elix® (no caso de amostras de água doce), ou com uma solução de NaCl de concentração ajustada à salinidade das amostras. De igual modo foi cheio o copo da água de lavagem do sistema. As amostras foram retiradas do frigorífico e colocadas no prato do *auto-sampler*. Os padrões de calibração foram preparados (como foi descrito anteriormente) e colocados nos respetivos copos do *auto-sampler*. Os copos foram tapados com papel de alumínio para evitar contaminações do exterior. Após todo o material estar colocado corretamente no analisador 1 e no *auto-sampler*, ligou-se o equipamento e o *software* de recolha de dados, e deu-se início aos procedimentos de arranque do sistema: 1) os tubos dos reagentes foram conectados no recipiente contendo água desionizada; 2) o tubo de injeção de amostra foi conectado na agulha de injeção, e esta mergulhada na água de lavagem do sistema; 3) o tubo do *carrier* foi conectado no respetivo recipiente; 4) o parafuso da cassette de análise do analisador 1 foi apertado; 5) a bomba peristáltica foi montada e deixou-se correr água no sistema. Quando a água corre pelo sistema a patilha de seleção do método deve estar na posição NO<sub>2</sub>. Após todo o sistema estar repleto com água, foi observada a *baseline* da água. Os tubos dos reagentes foram conectados nos recipientes correspondentes e deixou-se o sistema estabilizar. No momento em que o sistema ficou repleto com os reagentes, trocou-se a patilha de seleção para a posição NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>. A bomba peristáltica foi desligada, removendo-se depois o tubo *by-pass* e instalando-se no seu lugar a coluna redutora de cádmio. A coluna não deve ser montada no início dos procedimentos porque o contacto direto com água danifica-a, diminuindo a sua capacidade de redução. A bomba peristáltica voltou a ser ligada, deixando-se o sistema estabilizar. A *baseline* dos reagentes foi observada. Depois verificou-se a eficiência de redução da coluna de cádmio, seguindo as instruções indicadas pelo *software*. No final dos procedimentos de preparação do sistema deu-se início à leitura da reta de calibração. Depois de terminada e aceite a reta de calibração, criou-se a lista das amostras no *software* e iniciaram-se as análises. Na Figura 19 está representado um esquema de funcionamento do sistema para a análise da soma de nitratos e nitritos.



**Figura 19.** Análise da soma de nitratos mais nitritos no FIA (adaptado de FOSS® - *Application Note 5201*).

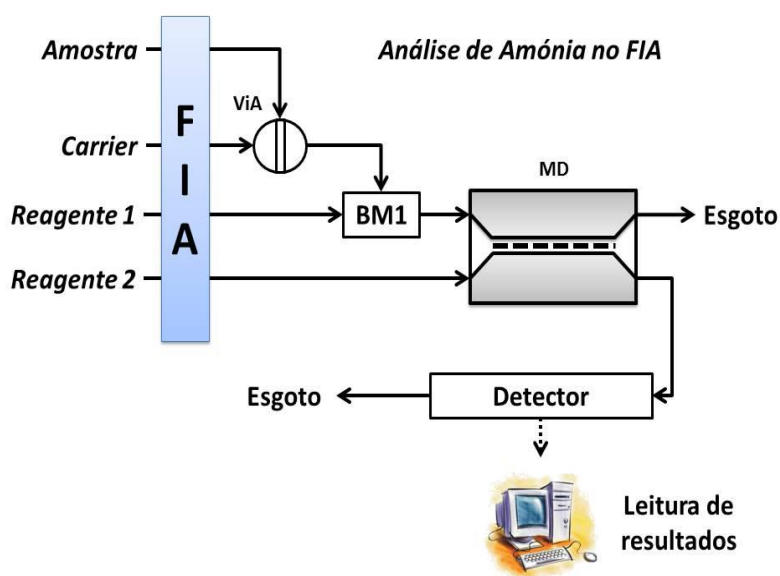
A amostra é injetada na corrente contínua de *carrier* através de uma válvula de injeção de amostra. A corrente já com a amostra é misturada com o reagente 1 (tampão cloreto de amónia) na bobina de mistura 1 (BM1). A mistura passa pela coluna de redução (CR) para reduzir os nitratos a nitritos. A corrente segue em frente e é de novo misturada, desta vez com o reagente 2 (sulfanilamida), na bobina de mistura 2 (BM2). Por fim o fluxo é misturado com o reagente 3 (NED), na bobina de mistura 3 (BM3), seguindo depois para o detetor. A zona da corrente onde está a amostra apresenta uma coloração roxa, que é medida no detetor a 540 nm. O *software* do sistema apresenta os resultados no monitor e guarda-os em base de dados, que pode ser acedida posteriormente. Após a passagem da corrente pelo detetor, esta sai do sistema para um recipiente de recolha de resíduos, através do tubo de esgoto. No final das análises, a patilha de seleção foi novamente colocada na posição  $\text{NO}_2$ . Todos os tubos de entrada do equipamento foram conectados em recipientes contendo água desionizada, deixando-se depois o sistema estabilizar. A bomba peristáltica foi desligada, retirou-se a coluna de cádmio e voltou-se a instalar o tubo *by-pass*. A bomba voltou a ser ligada, trocando-se depois a patilha de seleção para a posição  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ . No final indicou-se ao *software* para iniciar a lavagem do sistema. Depois de esta terminar, todos os tubos foram desconectados, deixando-se passar ar pelo sistema. A bomba peristáltica foi desmontada

e desaparafusou-se a cassette de análise. No final destas etapas pôde-se desligar o equipamento.

### **Determinação da concentração de amónia**

A análise de amónia é realizada num módulo diferente do equipamento (analisador 2), podendo assim ser efetuada em simultâneo com as outras metodologias explicadas anteriormente. Desta forma, quando se analisou amónia, foram também analisados os nitritos na amostra – no caso do processamento de amostras provenientes da determinação das reservas internas de azoto nas algas, ou da análise de nutrientes na coluna de água. A escolha foi feita desta forma, pelo facto da metodologia de análise de nitritos ser menos complexa que a da soma de nitratos e nitritos. Uma metodologia sensível e complexa como a da amónia foi desta forma combinada, com um método mais simples como a determinação de nitritos. Para iniciar as análises foi necessário preparar 2 reagentes. O reagente 1 foi uma solução contendo Hidróxido de Sódio, EDTA e ácido bórico. Quando se analisaram amostras de água salgada este reagente foi modificado, devido ao alto risco de precipitação do cálcio e magnésio na amostra. Nestes casos, o reagente 1 passou a ser uma solução contendo NaOH e Citrato de Sódio. O segundo reagente foi preparado a partir da diluição de uma solução indicadora fornecida pela marca. Os reagentes foram preparados um dia antes das análises, com água desionizada Elix®, sendo depois transferidos para os respetivos recipientes do FIA, e armazenados no frigorífico (<5 °C) até ao dia de análise das amostras. No dia das análises, os reagentes foram retirados do frigorífico e arrumados nas respetivas posições no analisador 2. Por a determinação de amónia em amostras ter sido realizada em simultâneo com a determinação de nitritos, é necessário ter em conta que os procedimentos doravante explicados, foram realizados ao mesmo tempo que os já descritos para a determinação de nitritos. Um recipiente com água desionizada Elix® foi colocado no analisador 2. O recipiente do *carrier* foi também cheio com água desionizada Elix® (no caso de amostras de água doce), ou com uma solução de NaCl de concentração ajustada à salinidade das amostras. De igual modo foi cheio o copo da água de lavagem do sistema. As amostras foram retiradas do frigorífico e colocadas no prato do *auto-sampler*. Os padrões de calibração foram preparados (como foi descrito anteriormente) e colocados nos respetivos copos do *auto-sampler*. Os copos foram tapados com papel de alumínio para evitar contaminações do exterior. Após todo o material estar colocado corretamente no analisador 2 e no *auto-sampler*, ligou-se o

equipamento e o *software* de recolha de dados, e deu-se início aos procedimentos de arranque do sistema: 1) os tubos dos reagentes foram conectados no recipiente contendo água desionizada; 2) o tubo de injeção de amostra foi conectado na agulha de injeção, e esta mergulhada na água de lavagem do sistema; 3) o tubo do *carrier* foi conectado no respetivo recipiente; 4) o parafuso da cassette de análise do analisador 2 foi apertado; 5) a bomba peristáltica foi montada e deixou-se correr água no sistema. Após todo o sistema estar repleto com água, foi observada a *baseline* da água. Depois observou-se a absorvância da solução indicadora, seguindo os procedimentos indicados pelo *software*. A absorvância da solução indicadora deve estar entre 350-375 mAU. Durante a calibração foi utilizado HCl ou NaOH (gota a gota), para acertar a absorvância. Ao longo do ajuste, os tubos dos reagentes 1 e 2 foram conectados nos recipientes correspondentes. A *baseline* dos reagentes foi observada. No final dos procedimentos de preparação do sistema deu-se início à leitura da reta de calibração. Depois de terminada e aceite a reta de calibração, criou-se a lista das amostras no *software* e iniciaram-se as análises. Na Figura 20 está representado um esquema de funcionamento do sistema para a análise de amónia.



**Figura 20.** Análise de nitritos no FIA (adaptado de FOSS® - *Application Note 5220*).

A amostra é injetada na corrente contínua de *carrier* através de uma válvula de injeção de amostra. A corrente já com a amostra é misturada com o reagente 1 na

bobina de mistura 1 (BM1). A corrente segue e entra no dispositivo contendo a membrana de difusão. A amónia existente passa através da membrana e entra em contacto com a corrente do reagente 2 (indicador). A corrente contendo o *carrier*, a amostra e o reagente 1 segue para o esgoto. O indicador muda de cor na zona onde se mistura com a amónia. A corrente com o indicador segue em direção ao detetor. A mudança de cor provocada pela amónia é medida no detetor a 590 nm. O *software* do sistema apresenta os resultados no monitor e guarda-os em base de dados, que pode ser acedida posteriormente. Após a passagem da corrente pelo detetor, esta sai do sistema para um recipiente de recolha de resíduos, através do tubo de esgoto. No final das análises, todos os tubos de entrada do equipamento foram conectados em recipientes contendo água desionizada, indicando-se depois ao *software* para iniciar a lavagem do sistema. Depois de esta terminar, todos os tubos foram desconectados, deixando-se passar ar pelo sistema. A bomba peristáltica foi desmontada e desaparafusou-se a cassete de análise. No final destas etapas pôde-se desligar o equipamento.