

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

Área de concentração: Infraestrutura e Meio Ambiente

Tese de doutorado

Biorremediação de fármacos por microalgas

Alan Rempel

Passo Fundo

2022



CIP – Catalogação na Publicação

R389b Rempel, Alan
Biorremediação de fármacos por microalgas [recurso eletrônico] / Alan Rempel. – 2022.
3 MB ; PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.
Coorientadora: Profa. Dra. Helen Treichel.
Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de
Passo Fundo, 2022.

1. Biorremediação. 2. Alga. 3. Resíduos domésticos.
4. Biocombustíveis. 5. Poluentes. I. Colla, Luciane Maria,
orientadora. II. Treichel, Helen, coorientadora. III. Título.

CDU: 628.5

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Biorremediação de fármacos por microalgas

Alan Rempel

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Passo Fundo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia.

Data da aprovação: 25 de abril de 2022.

Orientadora: Prof. Dr^a Luciane Maria Colla- Universidade de Passo Fundo (UPF)
Co-Orientador: Prof. Dr^a. Helen Treichel- Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Héctor Arturo Ruiz Leza- Autonomous University of Coahuila (UAdeC)
Prof. Dr^a. Eliane Colla- Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)
Prof. Dr^a. Débora de Oliveira- Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Prof. Dr. Jeferson Steffanello Piccin- Universidade de Passo Fundo (UPF)

Passo Fundo
2022

**“Conhecimento não é aquilo que você sabe,
mas o que você faz com aquilo que você sabe.”**
Aldous Huxley

**“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não
sou o que deveria ser, mas não sou o que era
antes”.**
Marthin Luther King

**“Opte por aquilo que faz o seu coração
vibrar...”**
Osho

**Dedico esse trabalho a minha família e a
minha professora Luciane Maria Colla.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e abençoar durante toda essa minha caminhada. Aos meus pais, Juares e Marlene, à minha irmã Aline, que nunca mediram esforços para me proporcionar o melhor possível, sempre me incentivando. Obrigado por todos os abraços, conselhos, consolos, carinhos e sorrisos. A pequena Ayla Vitória que chegou trazendo muita felicidade e luz a todos nós. Amo todos vocês.

A minha orientadora Luciane Maria Colla e a minha co-orientadora Helen Treichel, que nunca mediram esforços para me orientar. Sempre com uma solução para os meus problemas, sempre me incentivando a buscar conhecimento, questionar, aprender, enfim crescer pessoalmente e profissionalmente. Devo a vocês todo esse crescimento profissional e pessoal adquirido neste período.

A pós doutoranda Bárbara Biduski, muito obrigado por todos as orientações, ensinamentos, obrigado por fazer parte deste meu crescimento profissional, devo muito dele a você.

A Gabrielle Biolchi e a Júlia Gutkoski, muito obrigado por tudo, com certeza não teria feito tudo sem o auxílio de vocês. Vocês reforçaram a importância da iniciação científica. Gratidão.

A todos os meus colegas do Laboratório, em especial a Lára, Letícia, Mateus, Gabrielle, Samuel, Júlia Gutkoski, Júlia Braum, Bárbara... enfim a todos muito obrigado pelo convívio diário, trocas de experiências, risadas, chimarrão, café e as cervejadas.

A todos os meus colegas de doutorado em especial a Danúbia, obrigado pela parceria e amizade verdadeira.

Obrigado a Universidade de Passo Fundo, a todos professores, funcionários do PPGeng, obrigado por todo o empenho e dedicação.

Ao Rodrigo Hoff, obrigado por todo e empenho e auxílio no desenvolvimento metodológico da tese.

Enfim, a tudo e a todos que de uma forma ou outra me ajudaram a encerrar mais esta etapa da minha vida. Muito obrigado.

RESUMO

A contaminação das águas por poluentes emergentes (PEs) vem se tornando uma preocupação ambiental, devido aos efeitos de toxicidade ao meio aquático e na saúde humana. Em sua grande maioria, estes micropoluentes não são removidos ou degradados em estações de tratamentos convencionais de água, persistindo mesmo após o tratamento. Nesse contexto, que a biorremediação de PEs via metabolismo microalgal torna-se uma alternativa promissora. Os processos pelos quais as microalgas removem os PEs de águas ou efluentes residuais incluem mecanismos de bioacumulação, bioadsorção e biodegradação. Após os cultivos de biorremediação, a biomassa gerada e as águas residuais destes cultivos podem ser utilizadas em outras aplicações, como por exemplo na produção de biocombustíveis ou em uso de fertirrigação, respectivamente. Objetivou-se realizar a biorremediação dos fármacos fluoxetina, paracetamol, diazepam, ácido acetilsalicílico e cafeína através das microalgas *Spirulina platensis*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella homosphaera*, e avaliar os possíveis usos das biomassas e águas residuais após cultivo. Este trabalho foi dividido em 3 etapas. Na primeira etapa, o crescimento microalgal e os efeitos na composição das biomassas foram avaliados em meios com presença dos fármacos separadamente, em diferentes concentrações (100, 70, 50, 30, 10, 5 e 1 mg.L⁻¹). Na segunda etapa, os fármacos foram inseridos em conjunto, considerando os resultados de resistência observados na primeira etapa. Os parâmetros de crescimento foram monitorados durante 20 d, e a ecotoxicidade em bioindicadores vegetais com o sobrenadante dos cultivos foram avaliados a cada 5 d de cultivo. Na terceira etapa, a cada 5 d foi adicionado 20 µg.L⁻¹ de cada fármaco no meio de cultivo contendo 10% (v/v) de efluente oriundo do pós tratamento convencional de esgoto sanitário. Foram analisados parâmetros de crescimento das microalgas durante 30 d, e as análises cromatográficas foram avaliadas a cada 5 d. Na primeira etapa, a concentração máxima testada dos fármacos cafeína e ácido acetilsalicílico não apresentaram efeito tóxico nas três cepas testadas. A exposição a fluoxetina, paracetamol e diazepam resultaram em morte celular ou reduções da velocidade específica máxima de crescimento e concentração de biomassa nos cultivos, principalmente em concentrações acima de 30 mg.L⁻¹. A microalga menos resistente foi a *Spirulina platensis*, seguida da *Chlorella homosphaera*, sendo a *Scenedesmus obliquus* a cepa mais resistente. Os testes de hidrólise enzimática das biomassas cultivadas na presença dos fármacos apresentaram eficiência de hidrólise iguais a biomassa cultivada em meio padrão sem os fármacos. Na etapa dois, os ensaios com fluoxetina e paracetamol ocasionaram reduções no crescimento das microalgas. Não houve efeito tóxico nos testes de ecotoxicidade do sobrenadante dos cultivos da microalga *Scenedesmus*, obtendo índices de germinação acima de 80%. O sobrenadante dos cultivos de *Spirulina* obtiveram índices de germinação abaixo de 10%, fator este relacionado a toxicidade do meio de cultivo. Na etapa 3 a biodegradação dos fármacos foi observada, com reduções de 39% das concentrações de cafeína e quase 80% das concentrações de fluoxetina, além disso quantificou-se a presença de subprodutos da degradação dos fármacos. Sendo assim, é possível verificar que a microalga pode realizar a degradação de poluentes emergentes via mecanismo de biodegradação. Ainda, as biomassas cultivadas podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis, principalmente bioetanol e as águas residuais dos cultivos podem ser utilizadas em processos de fertirrigação.

Palavras chave: poluentes emergentes; biorremediação; microalgas; efluentes domésticos; biocombustíveis; fertirrigação.

ABSTRACT

The contamination of water by emerging pollutants (EPs) has become an environmental concern, due to the toxicity effects on the aquatic environment and on human health. For the most part, these micropollutants are not removed or degraded in conventional water treatment plants, persisting even after treatment. In this context, the bioremediation of PEs via microalgal metabolism becomes a promising alternative. The processes by which microalgae remove PEs from water or wastewater include mechanisms of bioaccumulation, bioadsorption and biodegradation. After the bioremediation crops, the generated biomass and the wastewater from these crops can be used in other applications, such as in the production of biofuels or in the use of fertigation, respectively. The objective was to carry out the bioremediation of the drugs fluoxetine, paracetamol, diazepam, acetylsalicylic acid, and caffeine through the microalgae *Spirulina platensis*, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella homosphaera*, and to evaluate the possible uses of biomass and wastewater after cultivation. This work was divided into 3 stages. In the first step, the microalgal growth and the effects on the composition of the biomass were evaluated in media with the presence of the drugs separately, at different concentrations (100, 70, 50, 30, 10, 5 and 1 mg.L⁻¹). In the second stage, the drugs were inserted together, considering the resistance results observed in the first stage. Growth parameters were monitored for 20 d, and ecotoxicity on plant bioindicators with the culture supernatant were evaluated every 5 d of cultivation. In the third step, every 5 d, 20 g.L⁻¹ of each drug was added to the culture medium containing 10% (v/v) of effluent from the conventional post-treatment of sanitary sewage. Microalgal growth parameters were analyzed for 30 d, and chromatographic analyzes were evaluated every 5 d. In the first stage, the maximum tested concentration of the drugs caffeine and acetylsalicylic acid did not present a toxic effect in the three tested strains. Exposure to fluoxetine, paracetamol and diazepam resulted in cell death or reductions in the maximum specific growth rate and biomass concentration in the cultures, mainly at concentrations above 30 mg.L⁻¹. The least resistant microalgae was *Spirulina platensis*, followed by *Chlorella homosphaera*, with *Scenedesmus obliquus* being the most resistant strain. The enzymatic hydrolysis tests of the biomass cultivated in the presence of the drugs showed hydrolysis efficiency equal to the biomass cultivated in standard medium without the drugs. In step two, the tests with fluoxetine and paracetamol caused reductions in the growth of microalgae. There was no toxic effect in the ecotoxicity tests of the supernatant of *Scenedesmus* microalgae cultures, obtaining germination rates above 80%. The supernatant of *Spirulina* cultures obtained germination rates below 10%, a factor related to the toxicity of the culture medium. In step 3, drug biodegradation was observed, with reductions of 39% in caffeine concentrations and almost 80% in fluoxetine concentrations, in addition to quantifying the presence of drug degradation by-products. Therefore, it is possible to verify that the microalgae can perform the degradation of emerging pollutants via biodegradation mechanism. Also, cultivated biomass can be used to produce biofuels, mainly bioethanol, and wastewater from crops can be used in fertigation processes.

Keywords: emerging pollutants; bioremediation; microalgae; domestic effluents; biofuels; fertigation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1	Objetivos	11
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
2	CAPÍTULO I	17
3	CAPÍTULO II	18
4	CAPÍTULO III	19
5	CAPÍTULO IV	20
5.1	Introdução	22
5.2	Materiais e Métodos	24
5.2.1	Microalgas	24
5.2.2	Poluentes emergentes	24
5.2.3	Efluente doméstico	25
5.2.4	Delineamento experimental.....	25
5.2.4.1	<i>Etapa 1: Cultivo descontínuo alimentado em reatores fechados com alimentação de cargas de efluente</i>	25
5.2.4.2	<i>Etapa 2: Cultivo descontínuo alimentado em mini-tanques com adição de efluente contendo poluentes emergentes</i>	27
5.2.4.2.1	Avaliação da degradação dos poluentes emergentes e geração de subprodutos	27
5.2.5	Análise estatística	28
5.3	Resultados e discussões	28
5.3.1	Etapa 1: Cultivo descontínuo alimentado em reatores fechados com alimentação de cargas de efluente	28
5.3.2	Etapa 2: Cultivo descontínuo alimentado em mini-tanques com adição de efluente contendo poluentes emergentes.....	34
5.3.2.1	<i>Remoção de poluentes emergentes e geração de subprodutos da degradação nos cultivos com adição de efluente em modo batelada alimentada em reatores abertos</i>	37
5.4	Conclusões	44
	REFERÊNCIAS	45
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os poluentes emergentes (PEs) são definidos como substâncias químicas ou materiais sintetizados, os quais são encontrados em ambientes aquáticos, cuja toxicidades e persistências afetam de maneira significativa o metabolismo de um organismo vivo (WU et al., 2012; SIMAZAKI et al., 2015; LENG et al., 2020). De maneira geral, estes poluentes incluem metabolitos ativos de vários setores industriais, como de fármacos, pesticidas, inseticidas, hormônios, nanopartículas, retardadores de chama, entre outros (BILAL et al., 2019; RASHEED et al., 2019). Devido aos seus efeitos adversos já relatados, a sua detecção e eliminação foram incorporadas nas Metas da Agenda 2030 para os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (UNESCO, 2020; RAMIREZ-MENDOZA et al., 2020).

Dentre estes poluentes destacam-se os provenientes da indústria farmacêutica, denominados fármacos, cada vez mais presentes em águas residuárias, principalmente devido a descartes irregulares, a automedicação, uso de altas dosagens e baixas eficiência no tratamento efluentes gerados após o consumo (BOLLMANN et al., 2016; TOLBOOM et al., 2019). Segundo dados publicados pelo site Portal Farmacêutico, um dos maiores canais de informações do mercado e da indústria farmacêutica, no ano de 2020 o Brasil concentrou 42% do consumo de medicamento de toda a América Latina, sendo as classes mais utilizadas os anti-inflamatórios e antidepressivos. Os fármacos fluoxetina e paracetamol, diazepam e ácido acetilsalicílico, pertencentes a estas classes, são amplamente utilizados. Além destes, outra substância amplamente utilizada é a cafeína, que está presente junto à formulação destes medicamentos, além de fazer parte na composição de energéticos e estimulantes, além de chás e café (KOREKAR et al., 2020).

O consumo sem prescrição médica e o uso em altas dosagens destas substâncias acarreta metabolização incompleta pelo organismo humano, fazendo com que parte destes metabolitos ainda ativos sejam excretados via fezes e urina (BOLLMANN et al., 2016; TOLBOOM et al., 2019). Após lançados em redes de esgotamento sanitário, estes poluentes são encaminhados para estações de tratamentos de efluentes, que são projetadas com o objetivo de redução de carga orgânica, nitrogênio, fósforo e redução de patógenos. Desta forma, estes micropoluentes não são eficientemente removidos pelas técnicas convencionais de tratamento, principalmente em função de suas características hidrofóbicas e altas persistências. Sendo assim, o não tratamento destes PEs ocasionam um grave problema ao ecossistema e à saúde pública. A exposição às baixas dosagens por longos períodos pode prejudicar diversos organismos vivos, como bactérias, peixes e plantas, além de contribuir para o surgimento de microrganismos com

altas resistência a antibióticos (PUCKOWSKI et al., 2016; WANG; WANG, 2016; GOJKOVIC et al., 2019). Vários pesquisadores de diferentes países detectaram PEs em altas e baixas concentrações (nas ordens de ng.L^{-1} a mg.L^{-1} , respectivamente) (SILVA et al., 2015; BUSTO et al., 2020).

Os principais problemas ocasionados pela exposição aos PEs provenientes de fármacos são: mudanças de comportamento, acúmulos em tecidos, danos ao sistema reprodutivo e inibições celular. Desta forma, é extremamente importante o desenvolvimento de tecnologias e sistemas para realizar a detecção, tratamento e a remoção destes PEs das águas residuais (FABBRI; FRANZELLITTI, 2016; TENORIO-CHAVÉZ et al., 2020; XIANG et al., 2022).

Tecnologias de tratamento avançadas vem sendo desenvolvidas e relatadas como eficientes na remoção destes poluentes em ambientes aquosos. Dentre estas, destacam-se os tratamentos por adsorção e sorção em diferentes matrizes, processos oxidativos avançados e separação por membranas. Entretanto, estes podem ser considerados onerosos em larga escala, ou ainda gerar novos resíduos ou a geração de novos subprodutos, que devem ser dispostos corretamente, aumentando os custos de aplicação destas técnicas (TOLBOOM et al., 2019; KHAN et al., 2020; GORITO et al., 2022).

Sendo assim, o aprimoramento destas técnicas e novas opções de tratamento devem ser investigados, entre elas a remoção de PEs via metabolismo microalgal. A degradação via microalgas surge como uma estratégia sustentável por apresentar uma série de vantagens, sendo a principal a capacidade das microalgas crescerem em efluentes com cargas de nutrientes como nitrogênio e fosforo, condição característica de efluentes domésticos, sendo que é neste tipo de efluente que as maiores concentrações destes PEs são encontradas (GEIGER et al., 2016; GENTILI; FICK, 2017; GOJKOVIC et al., 2019).

As microalgas possuem a capacidade de remoção destes poluentes através de três mecanismos: bioacumulação, biodegradação e bioadsorção. Suas eficiências de remoção podem alcançar faixas de 100% dependendo da espécie da microalga e das características físico-químicas do contaminante. As cepas mais citadas na literatura com potencial para realizar a remoção ou degradação destes PEs são *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. (ESCAPA et al., 2016; ESCAPA et al., 2017^a; ESCAPA et al., 2017^b).

Após a remoção ou degradação deste PEs a biomassa resultante pode ser utilizada para a produção de bioprodutos, como biocombustíveis e biofertilizantes. Ainda, as águas residuais dos cultivos podem ser utilizadas como fertirrigação, devido a presença de nutrientes residuais, como nitrogênio e fosforo, elementos estes essenciais para o desenvolvimento de plantas. Isto

pode agregar sustentabilidade ao processo podendo contribuir para criação de estratégias de biorrefinarias e bioeconomia circular (XIONG et al., 2018; GOJKOVIC et al., 2019).

Contudo, em altas concentrações, os poluentes podem apresentar efeitos tóxicos e letais para as microalgas e plantas. A composição química das microalgas deve ser avaliada a fim de verificar as possíveis aplicações das biomassas de diferentes cepas de microalgais. Ainda, que há poucos relatos sobre os efeitos ecotoxicológico em plantas das águas residuais dos cultivos algais na presença de fármacos.

A temática desta tese está inserida na linha de pesquisa em Infraestrutura Sustentável do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (PPGENG), buscando reduzir os danos ao meio ambiente e a saúde pública devido a exposição destes fármacos em águas de uso doméstico. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo, buscando a aplicação das biomassas algais concomitante ao tratamento ou pós-tratamento de efluentes, contribui para os conhecimentos na área de biorrefinarias integradas e para caracterizar os cultivos microalgais no contexto de bioeconomia circular.

1.1 Objetivos

Objetivou-se avaliar a biorremediação de efluente doméstico e de poluentes emergentes proveniente de fármacos através do metabolismo microalgal e possíveis uso de biomassa e sobrenadantes após cultivo.

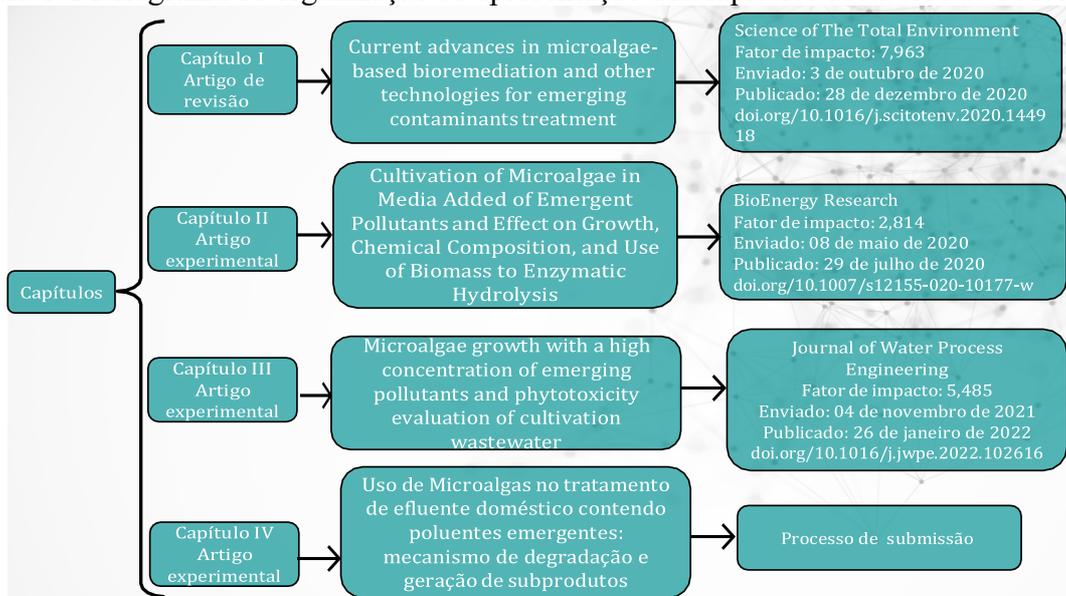
Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar a influência de diferentes concentrações de poluentes emergentes separadamente e em conjunto sobre o crescimento celular de microalgas em meios de cultivo padrão;
- b) Avaliar a influência dos poluentes emergentes sobre a composição celular das biomassas após cultivo;
- c) Realizar hidrólise enzimática em biomassas cultivadas com e sem a presença dos PEs;
- d) Avaliar possíveis efeitos ecotoxicológico dos sobrenadantes após os cultivos na germinação de sementes;
- e) Estudar o crescimento das microalgas em meios compostos por efluentes domésticos contendo PEs associados;

f) Quantificar as eficiências de remoção ou degradação dos PEs e avaliar a possíveis gerações de subprodutos após a biorremediação via metabolismo microalgal da *Spirulina platensis*.

Esta tese de doutorado foi organizada iniciando por uma introdução geral, que apresenta a problemática, justificativas e os objetivos, sendo este o capítulo atual. Após, a tese foi desenvolvida em capítulos de acordo com a Figura 1. Cada capítulo corresponde a um artigo científico, contendo o resumo gráfico, resumo, introdução, materiais e métodos, resultados e discussões, conclusões e referências bibliográficas. Por fim, apresenta-se as considerações finais da tese. Até o momento da defesa dessa tese, três artigos foram publicados em periódicos internacionais e um se encontra em processo de submissão.

Figura 1: Fluxograma da organização da apresentação dos capítulos desta tese de doutorado.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bilal, M., Adeel, M., Rasheed, T., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. (2019). Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. *Environment international*, *124*, 336-353.
- Bollmann, A. F., Seitz, W., Prasse, C., Lucke, T., Schulz, W., & Ternes, T. (2016). Occurrence and fate of amisulpride, sulpiride, and lamotrigine in municipal wastewater treatment plants with biological treatment and ozonation. *Journal of hazardous materials*, *320*, 204-215.
- Busto, R. V., Roberts, J., Hunter, C., Escudero, A., Helwig, K., & Coelho, L. H. G. (2020). Mechanistic and ecotoxicological studies of amoxicillin removal through anaerobic degradation systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *192*, 110207.
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2016). Comparative assessment of diclofenac removal from water by different microalgae strains. *Algal research*, *18*, 127-134.
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2017^a). Comparison of the culture and harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus* for the removal of pharmaceuticals from water. *Journal of Applied Phycology*, *29*(3), 1179-1193.
- Escapa, C., Coimbra, R. N., Paniagua, S., García, A. I., & Otero, M. (2017^b). Paracetamol and salicylic acid removal from contaminated water by microalgae. *Journal of Environmental Management*, *203*, 799-806.
- Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental toxicology and chemistry*, *35*(4), 799-812.
- Geiger, E., Hornek-Gausterer, R., & Saçan, M. T. (2016). Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *129*, 189-198.

- Gentili, F. G., & Fick, J. (2017). Algal cultivation in urban wastewater: an efficient way to reduce pharmaceutical pollutants. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 255-262.
- Gojkovic, Z., Lindberg, R. H., Tysklind, M., & Funk, C. (2019). Northern green algae have the capacity to remove active pharmaceutical ingredients. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 644-656.
- Gorito, A. M., Ribeiro, A. R. L., Pereira, M. F. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. (2022). Advanced oxidation technologies and constructed wetlands in aquaculture farms: What do we know so far about micropollutant removal?. *Environmental Research*, 204, 111955.
- Khan, N. A., Khan, S. U., Ahmed, S., Farooqi, I. H., Yousefi, M., Mohammadi, A. A., & Changani, F. (2020). Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging-pollutants-A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115744.
- Korekar, G., Kumar, A., & Ugale, C. (2020). Occurrence, fate, persistence and remediation of caffeine: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), 34715-34733.
- Leng, L., Wei, L., Xiong, Q., Xu, S., Li, W., Lv, S., ... & Zhou, W. (2020). Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: a review. *Chemosphere*, 238, 124680.
- Portal farmacêutico. Brasil concentra 42% do consumo de medicamentos na América Latina. Acesso em 10 de fevereiro de 2022. <https://panoramafarmacautico.com.br/brasil-concentra-42-do-consumo-de-medicamentos-na-america-latina/>.
- Puckowski, A., Mioduszevska, K., Łukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., & Stepnowski, P. (2016). Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127, 232-255.
- Ramirez-Mendoza, R. A., Morales-Menendez, R., Melchor-Martinez, E. M., Iqbal, H., Parra-Arroyo, L., Vargas-Martínez, A., & Parra-Saldivar, R. (2020). Incorporating the sustainable development goals in engineering education. *International Journal on Interactive Design and Manufacturing (IJIDeM)*, 14(3), 739-745.

Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment international*, *122*, 52-66.

Silva, B., Costa, F., Neves, I. C., & Tavares, T. (2015). *Psychiatric pharmaceuticals as emerging contaminants in wastewater* (pp. 1-96). Cham: Springer International Publishing.

Simazaki, D., Kubota, R., Suzuki, T., Akiba, M., Nishimura, T., & Kunikane, S. (2015).

Occurrence of selected pharmaceuticals at drinking water purification plants in Japan and implications for human health. *Water research*, *76*, 187-200.

Tenorio-Chávez, P., Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L. I., Ramírez-Rodrigues, M. M., Orozco-Hernández, J. M., & Gómez-Oliván, L. M. (2020). Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Science of The Total Environment*, *727*, 138716.

Tolboom, S. N., Carrillo-Nieves, D., de Jesús Rostro-Alanis, M., de la Cruz Quiroz, R., Barceló, D., Iqbal, H. M., & Parra-Saldivar, R. (2019). Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment—a review. *Science of the Total Environment*, *665*, 358-366.

Unesco. Emerging pollutants in water and wastewater. Retrieved from <https://en.unesco.org/emergingpollutantsinwaterandwastewater> (2020).

Wang, J., & Wang, S. (2016). Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review. *Journal of environmental management*, *182*, 620-640.

Wu, S., Zhang, L., & Chen, J. (2012). Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, *96*(4), 875-884.

Xiang, Y., Jiang, L., Zhou, Y., Luo, Z., Zhi, D., Yang, J., & Lam, S. S. (2022). Microplastics and environmental pollutants: key interaction and toxicology in aquatic and soil environments. *Journal of Hazardous Materials*, *422*, 126843.

Xiong, J. Q., Kurade, M. B., & Jeon, B. H. (2018). Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water?. *Trends in biotechnology*, 36(1), 30-4

2 CAPÍTULO I

O Capítulo I refere-se a um artigo de revisão, intitulado “Current advances in microalgae-based bioremediation and other technologies for emerging contaminants treatment”(<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144918>). Esse trabalho foi publicado na revista “Science of The Total Environment”, a qual possui Qualis A1 (Engenharias I) e Fator de Impacto de 7,963.

Abstract

Emerging contaminants (EC) have been detected in effluents and drinking water in concentrations that can harm to a variety of organisms. Therefore, several technologies are developed to treat these compounds, either for their complete removal or degradation in less toxic by-products. Some technologies applied to the treatment of EC, such as adsorption, advanced oxidative processes, membrane separation processes, and bioremediation through microalgal metabolism, were identified by thematic maps. In this review, we used a bibliometric software from >1000 articles. These manuscripts, in general, present removals from 0% to 100% for different ECs. This efficiency varies between treatment technologies and the contaminants' physical-chemical properties and their concentration and operational parameters. This review explored the bioremediation of EC through microalgae with greater emphasis. The main mechanisms of action of microalgae in the bioremediation of ECs are biodegradation bioadsorption, and bioaccumulation. Also, physicochemical properties and removal efficiencies of >50 emerging contaminants are presented. Although there are challenges related to the generation of more toxic by-products and economic and environmental viability, these can be minimized with advances in the development of treatment technologies and even through the integration of different techniques to make the treatment of contaminants emerging from environmental media more sustainable.

3 CAPÍTULO II

O Capítulo II refere-se à um artigo experimental, intitulado “Cultivation of Microalgae in Media Added of Emergent Pollutants and Effect on Growth, Chemical Composition, and Use of Biomass to Enzymatic Hydrolysis ”(<https://doi.org/10.1007/s12155-020-10177-w>). Esse trabalho foi publicado na revista “BioEnergy Research ”, que possui Qualis B1 (Engenharias I) e Fator de Impacto de 3,052.

Abstract

The objective of this study was to determine the influence of various concentrations of emerging pollutants (EPs) on growth, cell composition, and enzymatic hydrolysis of biomass. The microalgae used were *Spirulina platensis* LEB-52, *Chlorella homosphaera*, and *Scenedesmus obliquus*. The EPs used were paracetamol, diazepam, fluoxetine, acetylsalicylic acid, and caffeine, added to the cultures in concentrations ranging from 1 to 100 mg L⁻¹. The tests were carried out in closed 150 mL Erlenmeyer bioreactors, containing standard medium from each microalga culture. Cell concentrations were determined every 24 h using optical density. Culture continued for 20 days. At the end of the growth, biomass was collected and used to measure carbohydrates, proteins, and enzymatic hydrolysis, to determine possible changes due to the presence of EPs. In general, microalgae resisted concentrations of up to 100 mg L⁻¹ of paracetamol, acetylsalicylic acid, and caffeine, 30 mg L⁻¹ of diazepam, and 1 mg L⁻¹ of fluoxetine. *S. obliquus* was the most resistant strain, followed by *C. homosphaera* and *S. platensis* LEB-52 being less resistant. Acetylsalicylic acid and caffeine influenced the content of carbohydrates and proteins in biomass, reaching values above 35% of carbohydrates for *S. platensis* LEB-52 and above 66% of proteins for *S. obliquus*. There was no influence of EPs in the enzymatic hydrolysis processes. Microalgae showed resistance to EP concentrations, thereby emerging as a promising wastewater bioremediation technology. These high levels of carbohydrates are of great value because they can be used in the production of bioethanol.

4 CAPÍTULO III

O Capítulo III refere-se à um artigo experimental, intitulado “Microalgae growth with a high concentration of emerging pollutants and phytotoxicity evaluation of cultivation wastewater ”(<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102616>). Esse trabalho foi publicado na revista “Journal of Water Process Engineering” a qual possui Qualis B1 (Engenharias I) e Fator de Impacto de 5,485.

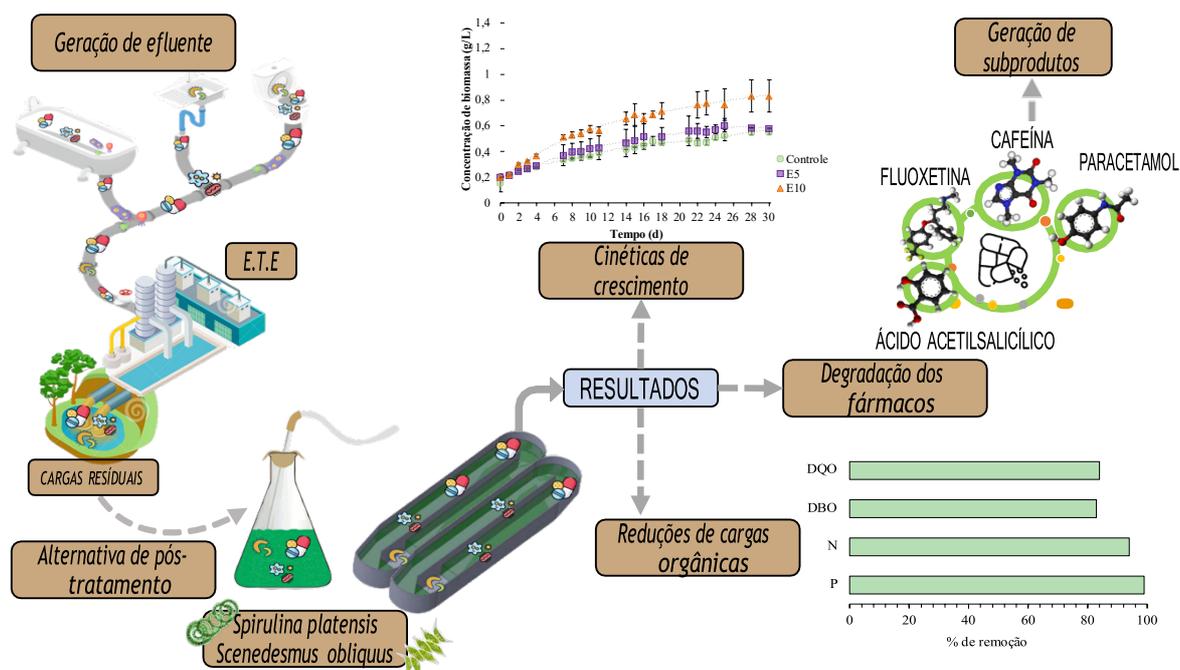
Abstract

This work aimed to evaluate the influence of different mixtures of emerging pollutants (EPs) (paracetamol, acetylsalicylic acid, caffeine, fluoxetine and diazepam) in the growth of *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella homosphaera* and *Spirulina platensis*. The cells growth test was carried out for 20 days, and the mixture of EPs was incorporated in the specific medium for each microalgae. Phytotoxicity tests were performed based on the germination index of lettuce and cucumber seeds using the wastewater from microalgae cultures (*S. obliquus* and *S. platensis*) without biomass. *S. obliquus* was able to grow in all mixtures of EPs. On the other hand, *S. platensis* presented cell death in EPs mixtures containing paracetamol. Both seeds germinated in *S. obliquus* supernatant with a germination index (GI) of 42.07% when acetylsalicylic acid and caffeine were added. In the absence of EPs, GI was 61.49%. The supernatant from *S. platensis* presented toxicological effects on seeds germination, with no germination for lettuce seeds. On cucumber seeds, the supernatant of *S. platensis* cultivated without EPs or acetylsalicylic acid and caffeine showed a GI of 7.13% and 4.27%, respectively, showing a negative effect of the culture medium of *Spirulina* on this parameter. Therefore, it is possible to use microalgae to EPs bioremediation and use the supernatant to further applications if the correct microalgae strain is chosen. *S. obliquus* showed the ability to grow when EPs were incorporated into the medium, besides reducing the phytotoxicological effects of the supernatant on the germination of seeds.

5 CAPÍTULO IV

Uso de microalgas no tratamento de efluente doméstico contendo poluentes emergentes: mecanismo de remoção e geração de subprodutos¹

Gráfico resumo



Highlights

- O cultivo em batelada alimentada com adições sucessivas de 10% (v/v) de efluente doméstico pré tratado permitiu crescimento *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus*;
- Houve redução de até 80% de DBO, DQO e N durante o cultivo de ambas as cepas;
- A microalga *Spirulina platensis* realizou a remoção de 39% de cafeína e 79% de fluoxetina;
- Os PE's foram removidos via mecanismos de biodegradação, já que houve o surgimento de subprodutos.

¹Alan Rempel, Julia Pedó Gutkoski, Gabrielle Nadal Biolchi, Bárbara Biduski, Helen Treichel, Rodrigo Hoff, Luciane Maria Colla.

Resumo

Objetivou-se avaliar a remoção de DBO, DQO, N e P e poluentes emergentes (PE's) de um efluente doméstico pré tratado, via metabolismo microalgal. Foram utilizadas as microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* cultivadas em erlenmeyers com 1,5 L de volume útil. Foram adicionados meio padrão de cada cepa mais a adição de 5 e 10% (v/v) de efluente doméstico pré tratado a cada 5 dias. Os parâmetros de crescimento foram avaliados durante 30 dias, bem como a composição bioquímica e eficiências de remoção dos parâmetros físico-químicos dos efluentes. Na sequência foi realizado um aumento de escala com a microalga *Spirulina platensis* em tanques de 10 L com adições de 10% (v/v) de efluente e 20 µg.L⁻¹ dos PE's cafeína, fluoxetina, paracetamol e ácido acetilsalicílico a cada 5 dias, sendo monitorados além dos parâmetros anteriores, as concentrações dos PE's e a geração de subprodutos da degradação. As microalgas desenvolveram-se nos cultivos em ambas as adições de efluente, alcançando faixas superiores a 1 g.L⁻¹ de biomassa e após 30 dias de cultivo houve reduções de todos os parâmetros físico-químicos do efluente, reduções <80% para DQO, DBO e N nos cultivos em erlenmeyers. A microalga *Spirulina platensis* se desenvolveu nos ensaios em reatores de 10 L com a presença do efluente mais as adições do PE's. Após 30 d houve remoção de 39% das concentrações de cafeína e de 80% para as concentrações de fluoxetina. Além disso, ao longo dos dias de cultivo houve o surgimento de subprodutos de degradação dos PE's, presença de teobromina proveniente da degradação de cafeína e norfluoxetina proveniente da degradação de fluoxetina. Evidenciando assim, que há um mecanismo de biodegradação de PE's pela cepa. A *Spirulina platensis* mante-se seu desenvolvimento com as adições de efluente quando foi realizado o aumento de escala para os biorreatores abertos, o que pode auxiliar nos processos de aplicabilidade industrial, podendo consolidar esta técnica com uma alternativa de pós-tratamento que atua sobre as cargas residuais não removidas pelas técnicas convencionais de tratamento. Ainda, pode atuar sobre as novas frações de poluentes presentes em águas residuárias, reduzindo o risco aos organismos aquáticos. Além disso, as biomassas com altos teores de carboidratos e proteínas produzidas após tratamento, podem ser empregadas na produção de bioenergia e biofertilizantes.

Palavras-chaves: cargas residuais; *Spirulina*; biorremediação; biodegradação; bioadsorção

5.1 Introdução

Os produtos farmacêuticos amplamente utilizados em nosso dia-dia fazem parte de uma nova classe de poluentes de águas residuárias denominados poluentes emergentes (PE's) (MUKHOPADHYAY et al., 2022). Sua presença em recursos hídricos pode representar potenciais riscos aos ecossistemas e a saúde humana (YANG et al., 2021). A presença destes PE's vem aumentando com o passar dos anos, devido ao consumo elevado de medicamentos, tanto por humanos quanto em clínicas veterinárias (PATEL et al., 2019). As concentrações destes PE's atualmente detectadas em águas superficiais e subterrâneas é na ordem de ng.L^{-1} e $\mu\text{.L}^{-1}$ (ČELIĆ et al., 2019).

Apesar das baixas concentrações presentes, pode haver efeitos maléficos aos organismos aquáticos, com alterações em sistemas locomotores e reprodutivos (FRANCO et al., 2019). Além disso, podem corroborar para o surgimento de fungos e bactérias resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, o que pode acarretar graves problemas de saúde pública (LEONARD et al., 2022). O principal meio de transporte destes PE's para os recursos hídricos são as redes de esgoto sanitário, sendo o problema aumentado pelas deficiências de saneamento básico existentes em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Mesmo quando o tratamento do esgoto é realizado através de estações de tratamento de efluentes, estas muitas vezes não são eficientes na remoção destes PE's. Ainda, pode haver o descarte destes efluentes com concentrações residuais de DBO, DQO, nitrogênio e fósforo em emissários, o que pode ocasionar problemas ambientais de eutrofização, além de prejudicar organismos aquáticos (DAN et al., 2021; XING et al., 2021; ZOU et al., 2022).

Novas tecnologias de tratamento ou de pós-tratamento destes efluentes devem ser investigadas, visando a remoção simultânea de mais de um PE's e, além disso, o processo deve ser capaz de reduzir as cargas residuais de DBO, DQO, nitrogênio e fósforo. Alternativas como separação por membranas, processos oxidativos avançados, adsorção em diferentes matrizes, vem sendo relatados na literatura como eficientes na remoção de PE's em águas residuárias. Porém, a aplicabilidade para remover poluentes em conjunto e os custos operacionais acabam em sua maioria inviabilizando seus usos (TEODOSIU et al., 2018; FISCHER et al., 2019).

As microalgas surgem como uma alternativa de tratamento ou pós-tratamento de águas residuárias, pela capacidade de utilização das frações residuais de nitrogênio e fósforo como nutrientes para o próprio crescimento (ZHANG et al., 2021; RUDE et al., 2022).

Há relatos da capacidade das microalgas realizarem a remoção de PE's isolados, sendo uma alternativa promissora e sustentável. Essas biomassas podem, após o tratamento, gerar

biomassas ricas em carboidratos e proteínas, as quais podem ser utilizadas na produção de bioenergia (REMPEL et al., 2019; REMPEL et al., 2021; SHARMA et al., 2022).

As microalgas podem realizar a remoção dos PE's através de três mecanismos: bioadsorção: no qual as moléculas de PE's não sofrem nenhum processo de degradação, apenas há a ligação destes poluentes na parede celular das microalgas; bioacumulação: no qual os PE's são carregados para dentro da célula microalgal; ou biodegradação, que ocorre no interior da célula microbiana, através de reações catalise que ocasionam a biodegradação e formação de subprodutos, os quais são excretados para fora das células (XIONG et al., 2018).

As cepas *Scenedesmus* sp. *Chlorella* sp. são amplamente citadas na literatura como capazes de realizar a redução de carga orgânica de efluentes provenientes de esgotamento doméstico. Também são citadas como os gêneros mais resistentes a alterações nutricionais conseguindo se desenvolver em meios com a presença de diferentes contaminantes. Zhou et al. (2014) empregaram o uso de 4 cepas microalgais, entre elas *Scenedesmus obliquus* para a remoção de nutrientes, antibióticos e estimulantes de esgoto sanitário. O estudo demonstrou que as microalgas removeram compostos com fósforo e nitrogênio com eficiências acima de 50%, além de apresentarem eficiências acima de 80% na remoção dos fármacos. Xie et al. (2020) demonstrou que as microalgas *Scenedesmus* sp e *Chlamydomonas* sp foram capazes de remover diferentes fármacos com eficiências variando entre 35-60%. Ainda, relataram que o principal mecanismo envolvido é a biodegradação. Matamoros et al. (2015) avaliou a eficiência de microalgas em remover em conjunto DQO, nitrogênio e fósforo e 26 PE's de águas residuárias. Entre os PE's avaliou a remoção de cafeína, paracetamol e ácido acetilsalicílico. A remoção de cargas orgânica variou de 26-96% já para os PE's citados a remoção alcançou faixas de 90%.

Considera-se, desta forma, que emprego de águas residuárias como meio para cultivar microalgas apresenta potencial econômico e ambiental, gerando biomassa, recuperação de nutrientes e por consequência o tratamento destes efluentes. No entanto, a variabilidade de compostos e alterações nas concentrações podem prejudicar o desenvolvimento das microalgas. Além disso, o uso dessas águas como fontes nutricionais em cultivo em larga escala também se apresenta como um desafio (ZHAI et al., 2017).

Sendo assim, estudos que reportam a degradação das cargas residuais de efluentes doméstico e ainda a remoção de PE's com eficiência são de extrema necessidade. Assim, buscar desenvolver ensaios em maiores escalas com uso de águas residuais como fonte alternativas de nutrientes, elucidar o mecanismo de degradação dos PE's e identificar a geração de subprodutos após o tratamento podem auxiliar no entendimento e na proposição de uma nova tecnologia integrada de tratamento de efluentes.

Desta forma, objetivou-se realizar a remoção de cargas residuais de nutrientes de efluente domésticos após tratamento biológico em conjunto com a remoção de 4 fármacos (fluoxetina, paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico). As microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* foram utilizadas, demonstrando o mecanismo de remoção dos PE's, bem como a identificação dos possíveis subprodutos de degradação dos mesmos.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Microalgas

As microalgas utilizadas foram *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo (UPF).

A *Spirulina platensis* foi cultivada em meio Zarrouk com concentração de 50%. A composição do meio Zarrouk padrão (100%, g.L⁻¹) é: bicarbonato de sódio: 16,8; fosfato dipotássico: 0,05; nitrato de sódio: 2,5; sulfato de potássio: 1,0; cloreto de sódio: 1,0; sulfato de magnésio: 0,2; cloreto de cálcio: 0,04; sulfato ferroso: 0,01; e ácido etilenodiaminotetracético: 0,08 (ZARROUK, 1966). Solução de micronutrientes A₅ (g.L⁻¹): 2,86 (H₃BO₃); 1,81 (MnCl₂.4H₂O); 0,222 (ZnSO₄.7H₂O); 0,079 (CuSO₄.5H₂O); 0,015 (Na₂MoO₄). Solução de micronutrientes B₆ (mg.L⁻¹): 22,86 (NH₄VO₃); 192 (K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O); 44,8 (NiSO₄.6H₂O); 17,94 (Na₂WO₄.2H₂O); 43,98 (CO(NO₃)₂.6H₂O).

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi cultivada em meio BG-11 com a seguinte composição em g.L⁻¹: nitrato de sódio: 1,5; fosfato dipotássico: 0,04; sulfato de magnésio: 0,075; cloreto de cálcio: 0,036; sulfato ferroso: 0,006; ácido etilenodiaminotetracético: 0,001; carbonato de sódio: 0,02; e ácido cítrico: 0,006 (RIPKA et al., 1979). Solução de micronutrientes A₅ (g.L⁻¹): 2,86 (H₃BO₃); 1,81 (MnCl₂.4H₂O); 0,222 (ZnSO₄.7H₂O); 0,079 (CuSO₄.5H₂O); 0,015 (Na₂MoO₄).

5.2.2 Poluentes emergentes

Os fármacos utilizados foram paracetamol com 99,46% de pureza (Infinity pharma, Brasil), fluoxetina com 99,64% de pureza (Purifarma, Brasil), ácido acetilsalicílico com pureza de 99,75% (Valde Química, Brasil) e cafeína com pureza de 99,1% (Valde Química, Brasil). Esses fármacos foram adquiridos em farmácia de manipulação.

5.2.3 Efluente doméstico

O efluente foi coletado após o processo de tratamento biológico, composto por lagoa anaeróbia, lagoa facultativa, lagoa aeróbia e lagoa de maturação. O ponto de coleta do efluente foi na saída da lagoa de maturação. Após a coleta o efluente foi armazenado em ultrafreezer (-70 °C). Visando manter as condições, foi coletado um volume de efluente suficiente para se realizar todas as etapas do trabalho. O efluente foi caracterizado de acordo com os teores de DBO₅ e DQO, nitrogênio e fósforo, conforme metodologias de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1995.

5.2.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi conduzido em duas etapas: a Etapa 1 foi realizado cultivo das cepas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* em reatores fechados em modo de cultivo descontínuo alimentado, com adição de efluente doméstico pré tratado, visando reduções de cargas orgânicas. Na Etapa 2, foi realizado o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em mini tanques abertos em modo de cultivo descontínuo alimentado, com adição de efluente doméstico pré tratado mais adições dos poluentes emergentes, visando avaliar as reduções da concentração dos PE,s e possíveis gerações de subprodutos da degradação.

5.2.4.1 Etapa 1: Cultivo descontínuo alimentado em reatores fechados com alimentação de cargas de efluente

As microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* foram cultivadas em modo descontínuo alimentado com adições de 5% (E5), 10% (E10) (v/v) de efluente a cada 5 dias, em biorreatores fechados. Foi testada também a adição de 20% (v/v) de efluentes, porém houve morte celular nos ensaios com as duas cepas. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de 2 L com volume útil de 1,5 L, contendo o meio padrão de cada microalga e uma concentração celular inicial de 0,2 g.L⁻¹. Ensaios controle foram realizados sem a presença de efluente. Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C por 20 min.

Os ensaios foram realizados em câmeras de germinação (TE-4020-E, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil), com temperatura controlada (25 °C±2), iluminação de lâmpadas de led (67.5 µE m⁻² s⁻¹) com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro e agitação proveniente de bombas

de diafragma (U-2800, Boyu, China). Os ensaios foram mantidos durante 30 d. Foram monitorados o crescimento celular a cada 24 h por densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (UV-1600, Pró-Tools, Porto Alegre, RS, Brasil). As absorvâncias foram correlacionadas com o peso seco através de uma curva padrão pré-estabelecida para cada microalga (Equações 1 e 2).

$$Spirulina\ platensis\ (g_{celulas}.L^{-1}) = 0,6941 \times ABS_{670} - 0,0371\ (R^2 = 0,99) \quad (1)$$

$$Scenedesmus\ obliquus\ (g_{celulas}.L^{-1}) = 0,3297 \times ABS_{670} - 0,0093\ (R^2 = 0,99) \quad (2)$$

A concentração máxima de biomassa (X_f , g.L⁻¹) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , d⁻¹) foram calculadas pela equação 3.

$$\mu_{max}(d^{-1}) = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (3)$$

Onde: X_1 e X_2 são concentrações de biomassa de microalgas no início e no final da fase de crescimento exponencial, e o tempo Δt é a duração da fase logarítmica.

Ao final dos 30 d, os cultivos foram centrifugados a 3.500 rpm (Eppendorf, 5810, Hamburgo, Alemanha). A biomassa foi seca em estufa a 50 °C e caracterizada quanto os teores de carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (LOWRY et al., 1951). As águas residuárias foram caracterizadas quanto aos teores de DBO₅, DQO, nitrogênio e fósforo, segundo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1995.

As eficiências de remoção de DBO₅ e DQO, nitrogênio e fósforo foram calculados a partir da soma das cargas de efluente adicionadas mais a concentração dos parâmetros provenientes do meio de cultivo padrão das microalgas determinadas no ensaio controle. Esta soma foi dividida pela carga determinada nos ensaios com adição de efluente mais microalgas (Equação 4).

$$Ef(\%) = \frac{Entrada - Saída}{Entrada} \times 100 \quad (4)$$

5.2.4.2 Etapa 2: Cultivo descontínuo alimentado em mini-tanques com adição de efluente contendo poluentes emergentes

A partir dos melhores resultados da Etapa 1 em relação ao percentual de efluente a ser adicionado em modo descontínuo alimentado, foi realizado um aumento de escala no cultivo, utilizando-se apenas a microalga *Spirulina platensis*. Os ensaios foram realizados em tanques de acrílico, alocados em estufa de hidroponia, com volume útil de 10 L, com agitação proveniente de bombas submersas (SP-500, Boyu, China), e temperatura entre 25 ± 5 °C, e iluminação natural, com adição de 10% (E10) (v/v) de efluente contaminado com os PE's (cafeína, paracetamol, fluoxetina e ácido acetilsalicílico) na concentração de 20 µg/L. O efluente foi adicionado a cada 5 d por 30 d. A concentração inicial de inoculo de *Spirulina* foi de 0,2 g.L⁻¹.

O meio padrão utilizado foi o Zarrouk 50% conforme composição descrita no item 5.2.1. Um ensaio controle, sem a presença de efluente e dos fármacos, foi realizado. O crescimento celular foi monitorado a cada 24 h por densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (UV-1600, Pró-Tools, Porto Alegre, RS, Brasil). As absorbâncias foram correlacionadas com o peso seco através de uma curva padrão pré-estabelecida para microalga (Equação 1). Além do crescimento celular, foram monitorados também a concentração máxima de biomassa (X_f , g.L⁻¹) e a velocidade específica máxima de crescimento, (μ_{max} , d⁻¹), calculada pela Equação 3. Também foram avaliados a cada 5 d os teores de carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (LOWRY et al., 1951) da biomassa microalgal.

5.2.4.2.1 Avaliação da degradação dos poluentes emergentes e geração de subprodutos

As eficiências de remoção dos fármacos e a geração de possíveis produtos da degradação foram analisadas via cromatografia líquida a cada 5 d de cultivo. Amostras dos cultivos foram retiradas e centrifugadas a 3.500 rpm (modelo 5810, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A determinação foi realizada no sobrenadantes dos cultivos, visando quantificar a concentração do PE's e possíveis subprodutos de degradação. Além disso, a biomassa separada também foi analisada com o objetivo de verificar uma possível presença dos PE's bioadsorvidos na mesma. Foi utilizado o sistema 1290 Infinity, fabricado pela Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massa com íons linear híbrido triplo quadrupolo 5500 QTrap, fabricado pela Sciex (Framingham, EUA), equipado com ESI (electrospray ionization).

A separação cromatográfica dos produtos farmacêuticos foi realizada utilizando uma coluna analítica Nucleodur C18 Gravity (3 μ M, 50 mm \times 2 mm), da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), que foi acoplada a uma coluna guarda C18 (Phenomenex). A fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol L⁻¹ de acetato de amônio. A taxa de fluxo foi de 0,3 mL min⁻¹. O gradiente inicial foi de 95% A (1-4 min), 10% A (4-12 min) e 95% A (12-13 min), mais 2 minutos de equilíbrio entre as injeções. O volume de injeção foi ajustado para 5 μ L e a coluna foi mantida a 40 °C.

A análise de espectrometria de massa foi realizada com fonte de ionização por eletrospray (ESI) trabalhando em ambos os modos positivo e negativo. Para o modo positivo (ESI+) os parâmetros de ionização foram os seguintes: voltagem de ion spray (IS): 5500 V; gás de cortina: 25 psi; gás nebulizador (GS1): 55 psi; gás auxiliar (GS2): 55 psi; temperatura da fonte: 400 °C. Ao trabalhar em modo negativo (ESI-), os mesmos parâmetros foram ajustados, exceto a tensão IS, ajustada em -4500 V. O nitrogênio foi usado para nebulização e colisão. Todos os analitos foram avaliados usando monitoramento de reação selecionado (SRM), com duas transições m/z monitoradas para cada composto. Os softwares Analyst 1.6.2 e MultiQuant (Sciex, Foster City, CA) foram utilizados para aquisição e processamento dos dados. Os parâmetros de espectrometria de massa específicos do analito foram otimizados em relatórios anteriores e foram confirmados para aplicação pelo presente método.

5.2.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram tratados e avaliados por análise de variância com nível de confiança de 95%, com posterior análise por meio do teste de Tukey no software Statsoft (Statistica 10).

5.3 Resultados e discussões

5.3.1 Etapa 1: Cultivo descontínuo alimentado em reatores fechados com alimentação de cargas de efluente

As microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* foram cultivadas com a adição de 5% (v/v) (E5) e 10% (v/v) (E10) de efluente doméstico coletado após tratamento biológico, sendo os cultivos realizados em biorreatores fechados (1,5 L) durante 30 dias. Para

fins comparativos, foi realizado um ensaio controle sem adição de efluente para cada microalga. Para avaliar a performance dos cultivos, foram calculadas a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a concentração máxima de biomassa ($[X]_{\text{máx}}$), além da quantificação de carboidratos e proteínas das biomassas. A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento das microalgas nos 30 dias de cultivo e a Tabela 1 apresenta os parâmetros de velocidade específica de crescimento, concentração máxima de biomassa e a composição celular das microalgas.

Figura 1: Curvas de crescimento da *Spirulina platensis* (A) e *Scenedesmus obliquus* (B) em meio Zarrouk 50% adicionado de cargas (v/v) de 5, 10% de efluente doméstico coletado após o tratamento biológico

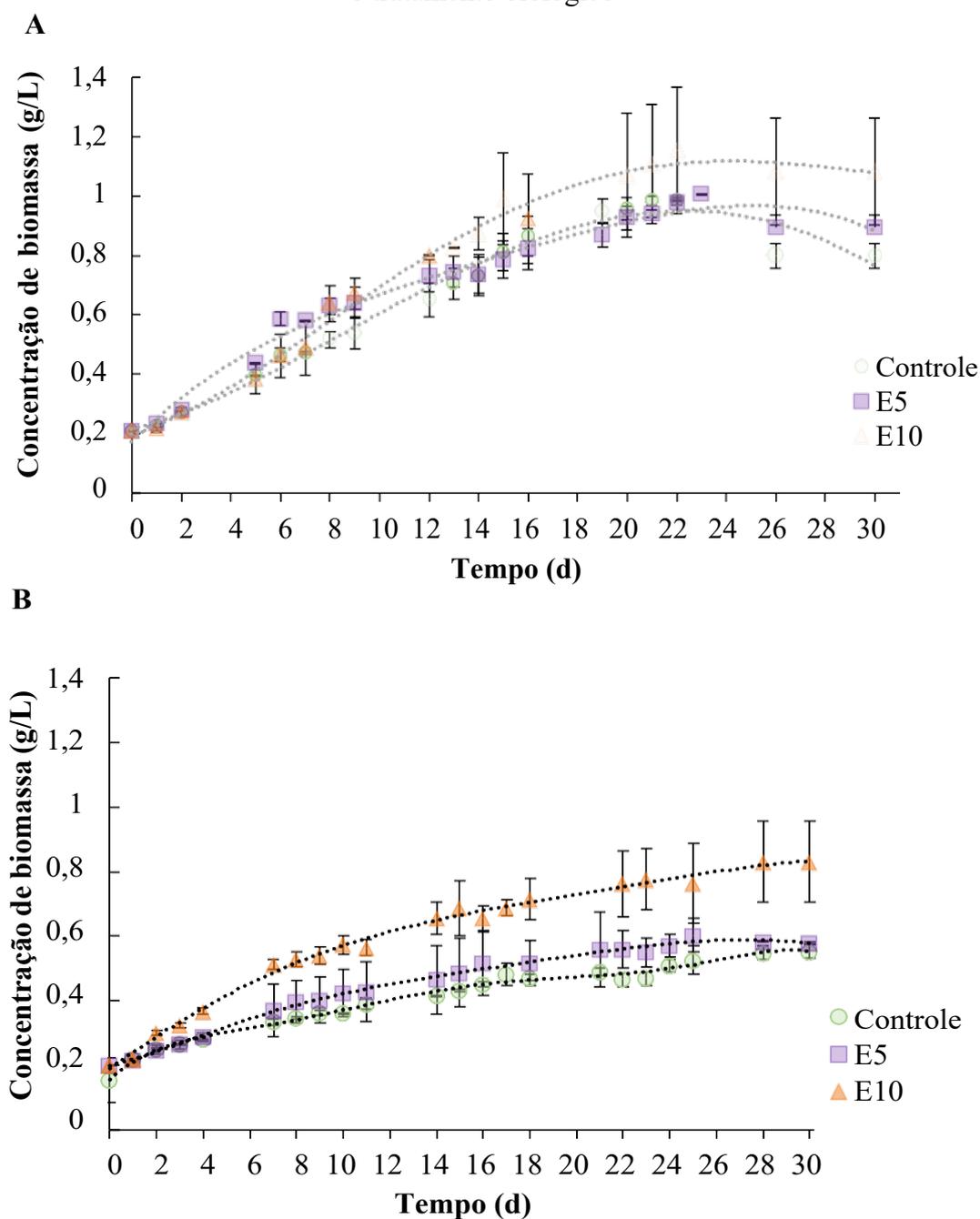


Tabela 1: Velocidades e concentrações máximas de células dos cultivos microalgais em efluente doméstico, e percentuais de carboidratos e proteínas obtidos nas biomassas

<i>Spirulina platensis</i>					
Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	R ²	[X] _{máx} (g.L ⁻¹)	CHO* (%)	PTN* (%)
Controle	0,077±0,012 ^a	0,987	1,13±0,263 ^a	11,85±0,008 ^b	43,21±0,002 ^c
E5*	0,069±0,023 ^a	0,982	1,00±0,001 ^a	8,93±0,001 ^a	41,60±0,003 ^b
E10*	0,059±0,002 ^a	0,986	1,27±0,051 ^a	16,47±0,009 ^c	32,03±0,001 ^a
<i>Scenedesmus obliquus</i>					
Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	R ²	[X] _{máx} (g.L ⁻¹)	CHO* (%)	PTN* (%)
Controle	0,048±0,002 ^b	0,980	0,54±0,021 ^a	17,39±0,019 ^b	53,50±0,001 ^a
E5*	0,039±0,003 ^{ab}	0,991	0,60±0,051 ^{ab}	13,46±0,014 ^a	59,35±0,004 ^b
E10*	0,036±0,005 ^a	0,971	0,80±0,082 ^c	18,06±0,015 ^c	68,32±0,005 ^c

CHO: carboidratos; PTN: proteínas; E5: ensaio com adição de 5% (v/v) de efluente doméstico pós-tratamento biológico; E10: ensaio com adição de 10% (v/v) de efluente doméstico pós-tratamento biológico. Letras iguais na coluna, não apresentam diferença estatística entre os testes em um nível de 95%. (média±desvio padrão).

As adições de 5 e 10% (v/v) de efluente doméstico não prejudicaram o crescimento microalgal de ambas as cepas (Figura 1), uma vez que a adição de 10% de efluente não causou influência na concentração máxima em comparação com o ensaio controle (Tabela 1). Os efluentes domésticos são misturas complexas compostas por matéria fecal humana, detergentes, fármacos, compostos inorgânicos, resíduos domésticos, tecidos de animais e plantas, entre outros. Estes efluentes, sem nenhum tipo de tratamento pode apresentar riscos ao ecossistema e a saúde pública (GOSWAMI et al., 2021). O efluente doméstico utilizado passou por tratamento biológico composto por UASB, lagoa anaeróbia, lagoa aeróbia e lagoa de maturação. A alteração entre processos anaeróbios e aeróbios é realizada para aumentar a eficiência de remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e matéria orgânica (GRADY et al., 2011). Porém, mesmo após o tratamento, o efluente ainda possuía em sua composição, residuais de N e P (Tabela 2). Isso pode ter contribuído para o desenvolvimento das cepas estudadas, estas cargas residuais foram utilizadas como fonte de nutricional para as microalgas, já que as velocidades específicas e o rendimento máximo de biomassa não foram afetados ou houve aumento da concentração máxima de biomassa se comparados aos dados do ensaio controle para a microalga *Scenedesmus obliquus*.

SundarRajan et al. (2020) observaram que a microalga *Scenedesmus abundans* conseguiu se desenvolver em efluente doméstico pré tratado, com obtenção de 3,55 g.L⁻¹ de biomassa, valor bem superior aos encontrados neste trabalho. O efluente adicionado aos cultivos, possuía os seguintes parâmetros: DQO (782 mg.L⁻¹), N (262 mg.L⁻¹ NH₄⁺ e 48 mg.L⁻¹ NO₃⁻) e P (42 mg.L⁻¹), cargas residuais mais elevadas do que as utilizadas em nosso estudo. A diferença entre as cepas microalgais e a forma de cultivo podem justificar o maior rendimento em biomassa. Além disso, de acordo com os autores, o uso de iluminação de 4.000 lux de forma

contínua pode ter proporcionado maiores taxas fotossintéticas que por consequência resultaria em maiores consumos das cargas residuais e maiores concentrações de biomassa.

As microalgas metabolizam o N e o P para sintetizar ATP, ADP, aminoácidos, DNA e RNA (Zhou et al., 2020; Ahmed et al., 2022). O N entra pela membrana celular das microalgas por transporte ativo, sendo NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^- as formas mais comuns. A NH_4^+ é preferível pois não necessita de reações de redução, a qual é convertida em aminoácidos pela síntese do glutamato a glutamina, uma reação catalisada pela enzima glutamina síntese com formação de glutamato e ATP. Da mesma forma que o N, o P entra via membrana celular por transporte ativo nas formas de H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} . Após, ocorre a inserção de PO_4^{3-} em compostos orgânicos pela fosforilação, com geração de um ATP. Fatores como pH, oxigênio dissolvido e temperatura também podem influenciar na remoção de P (Kong et al., 2021). Os compostos N, P e C são indispensáveis no crescimento microalgal. Integrar o cultivo com o tratamento de efluentes é uma forma de diminuir as concentrações desses compostos na água e gerar produtos de interesse com a biomassa restante (MOHSENPOUR et al., 2021; AHMED et al., 2022).

Os cultivos com adição de efluente como mostrado na Figura 1 corrobora com a possibilidade de acoplar o cultivo microalgal como uma etapa adicional ao tratamento biológico convencional, reduzindo assim as cargas residuais e gerando biomassas com potenciais para a produção de bioprodutos.

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para $\mu_{\text{máx}}$ da *Spirulina*, enquanto para a *Scenedesmus*, o ensaio E10 possuiu a menor $\mu_{\text{máx}}$ ($0,036 \text{ d}^{-1}$) e o ensaio controle, a maior $\mu_{\text{máx}}$ ($0,048 \text{ d}^{-1}$) ($p < 0,05$). A hipótese de crescimento mixotrófico, utilizando simultaneamente o carbono orgânico e o inorgânico. Esse modo de cultivo é preferível quando se objetiva produzir biomassa, como constatado por Pereira et al. (2019), que cultivaram *Spirulina platensis* em cultivo mixotrófico e obtiveram maiores $\mu_{\text{máx}}$, $[\text{X}]_{\text{máx}}$ e teores de carboidratos quando comparado com o cultivo autotrófico.

As $\mu_{\text{máx}}$ da *Spirulina* foram maiores que as da *Scenedesmus*, da mesma forma que os valores de $[\text{X}]_{\text{máx}}$. Um comportamento contrário foi observado no estudo de Fan et al. (2020). Os autores cultivaram *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* em efluente doméstico sob regimes de luz otimizados e observaram que a *Scenedesmus* apresentou maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ e de $[\text{X}]_{\text{máx}}$ quando comparados aos valores da *Spirulina*. A *Scenedesmus* é uma cepa conhecida no emprego do tratamento de efluentes por sua resistência e adaptabilidade ao meio (Shen et al., 2017; SundarRajan et al., 2020). O que ter ocasionado um menor rendimento de biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* frente a *Spirulina platensis* em nosso estudo é a adaptabilidade das microalgas ao meio de cultivo e as condições de cultivo, durante os ensaios

houve uma troca de fonte de iluminação, o que pode ter prejudicado o desenvolvimento da *Scenedesmus*.

A *Spirulina* apresentou a maior porcentagem de carboidratos no ensaio E10 (16,47%) ($p < 0,05$), e por consequência menor porcentagem de proteínas (32,03%) ($p < 0,05$) (Tabela 1). O *stress* proveniente da maior adição de efluente e a redução dos nutrientes do meio padrão podem ter interferido em um maior acúmulo de carboidratos neste ensaio. As cianobactérias possuem valores significativos de proteínas quando cultivadas em um meio com ampla diversificação de nutrientes, mas isso pode ser modificado quando há restrição destes. A composição química da microalga altera-se, acumulando carboidratos pela conversão do conteúdo proteico, pois os carboidratos representam o principal nutriente de reserva de energia (DISMUKES et al., 2008; MAGRO et al., 2018).

Quanto aos compostos intracelulares da *Scenedesmus*, os maiores resultados tanto de carboidratos quanto de proteínas são observados no ensaio E10 (18,06 e 68,32%, respectivamente), com diferença estatística dos outros ensaios ($p < 0,05$) (Tabela 1). Em estudo realizado por Afify et al. (2018), a microalga *Scenedesmus* cultivada em meio padrão obteve percentual de 40,7% de proteína. Já em cultivo da *Scenedesmus* em efluente municipal, Shen et al. (2015) obtiveram o acúmulo de 22% de proteínas e 65% de carboidratos, comportamento contrário do obtido no presente estudo. Isso pode ter ocorrido devido ao curto tempo de cultivo (6 dias). Além disso, os autores suplementaram o meio com 120 mg.L⁻¹ de carbono orgânico, obtendo uma proporção de 4,8 C/N, situação que favorece o acúmulo de carboidratos.

Com o crescimento celular, a concentração de N no meio de cultivo diminui devido ao seu consumo pelas microalgas. Essa limitação causa uma mudança na rota fotossintética de carbono, ou seja, a via metabólica de síntese da proteína altera-se para a via de síntese de lipídeos ou carboidratos, ocorrendo a acumulação (PROCHÁZKOVÁ et al., 2014). Entretanto, esse comportamento não foi observado para a *Scenedesmus*. Os maiores valores de proteínas podem ser devido à um mecanismo de defesa ao meio que a microalga desenvolveu durante o cultivo, acumulando a proteína como um nutriente de reserva. Estes elevados teores de proteínas é um fator benéfico pois esta proteína pode ser utilizada na produção de bioenergia ou até para rações para animais, desde que seja comprovada a não toxicidade após os cultivos na presença de PE's (CHIA et al., 2019).

Além dos parâmetros de crescimento e composição intracelular obtidos, calculou-se as eficiências de remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), N e P no fim dos cultivos para as duas microalgas. Foram analisados os

parâmetros do efluente utilizado, dos ensaios controle e dos ensaios com adição de 10% do efluente (v/v) (E10). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Eficiências de remoção de DBO, DQO, N e P após os 30 dias de cultivo

<i>Spirulina platensis</i>					
Parâmetros (mg.L ⁻¹)	Efluente (mg.L ⁻¹)	Carga total com o efluente adicionado (mg.L ⁻¹)*	<i>Spi.</i> Controle após 30d (mg.L ⁻¹)	<i>Spi.</i> + efluente após 30d (mg.L ⁻¹)	Eficiência de remoção** (%)
DQO	38,20±6,8	191,00	29,00±6,7	36,10±7,0	84,10
DBO	103,20±8,4	516,00	80,90±8,4	98,30±8,4	83,53
P	3,46±0,4	17,30	57,85±0,2	39,29±0,2	47,72
N	25,20±0,2	126,00	1,00±0,2	1,00±0,1	99,21
<i>Scenedesmus obliquus</i>					
Parâmetros (mg.L ⁻¹)	Efluente (mg.L ⁻¹)	Carga de efluente adicionada (mg.L ⁻¹)*	<i>Sce.</i> Controle após 30d (mg.L ⁻¹)	<i>Sce.</i> + efluente após 30d (mg.L ⁻¹)	Eficiência de remoção** (%)**
DQO	38,20±6,8	191,00	190,80±9,0	54,50±7,9	85,73
DBO	103,20±8,4	516,00	74,40±8,4	142,60±8,4	75,85
N	3,46±0,4	17,30	1,03±0,3	1,03±0,2	94,38
P	25,20±0,2	126,00	4,90±0,1	4,90±0,1	99,64

* Ao longo dos 30 d de cultivo, foram realizadas 5 adições de efluente. ** A eficiência de remoção foi calculada a partir da soma das cargas de efluente adicionadas mais a concentração dos parâmetros provenientes do meio de cultivo padrão das microalgas determinadas no ensaio controle. Esta soma foi dividida pela carga determinada nos ensaios com adição de efluente mais microalgas.

Segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 430/2011, o efluente de qualquer fonte poluidora só poderá ser lançado no ambiente se apresentar remoção mínima de 60% da DBO e máximo de 120 mg.L⁻¹ para efluentes provenientes do tratamento de esgoto sanitário. Para o N amoniacal total, o padrão para lançamento é de, no máximo, 20 mg.L⁻¹. Para o P total, a CONAMA designa que cabe aos estados do Brasil definir os limites de concentração. A resolução do Conselho Estadual do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul (CONSEMA) n° 355/2017 limita a concentração de P entre 4 a 1 mg.L⁻¹, com eficiência de 75%, a qual depende da vazão do efluente (>100 a 10.000 m³.d⁻¹), sendo a maior concentração para a menor vazão. Por fim, para a DQO, o CONSEMA delimita uma concentração máxima de 330 mg.L⁻¹.

Ao observar as concentrações obtidas no ensaio com a *Spirulina* após os 30 dias de cultivo, a DQO (36,1 mg.L⁻¹), DBO (98,3 mg.L⁻¹) e P (1,00 mg.L⁻¹) estão de acordo com as legislações, enquanto para a *Scenedesmus*, a DQO (54,5 mg.L⁻¹) e N (1,03 mg.L⁻¹) apresentaram concentrações dentro do aceitável. O meio de cultivo padrão da *Spirulina* é composto por uma

alta concentração de N ($\cong 0,2 \text{ g.L}^{-1}$), o que justifica o valor de N encontrado após os 30 dias de cultivo no ensaio Controle ($57,85 \text{ mg.L}^{-1}$). Em contraste, o valor encontrado no ensaio Controle da *Scenedesmus* foi de $1,03 \text{ mg.L}^{-1}$, fator esse que pode ter possibilitado a maior eficiência de remoção do nutriente com essa microalga (Tabela 2).

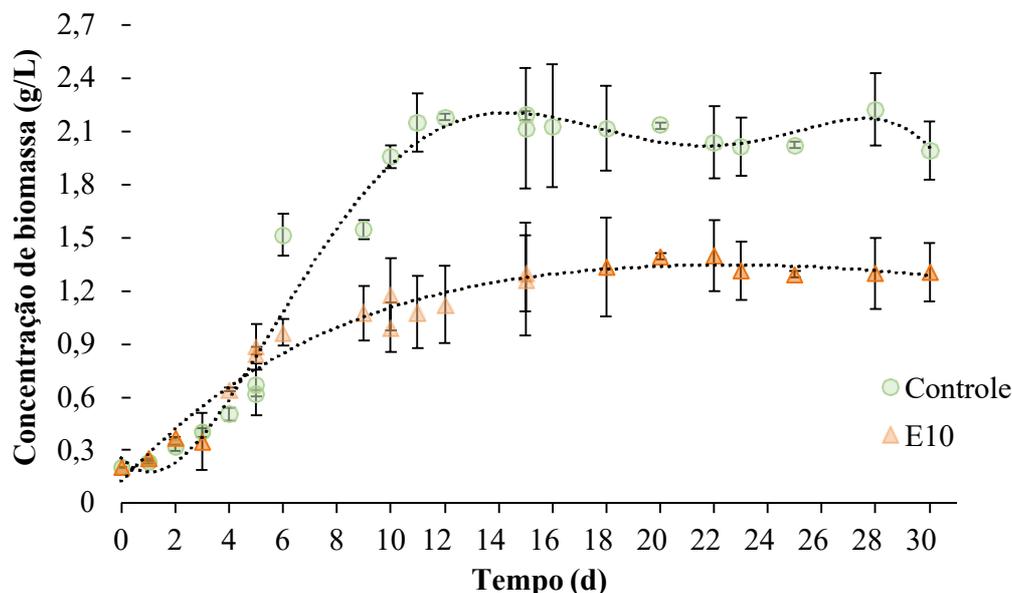
Os valores de DQO e DBO para ambas as cepas diminuíram após o tratamento (Tabela 2) o que indica que as cepas utilizadas conseguiram assimilar a matéria orgânica presente no meio. Tripathi et al. (2019) relatam eficiências de remoção parecidas para DQO (87,43%) e DBO (86,74%) em cultivo com a *Scenedesmus* sp. em efluente municipal. Para assimilar o carbono orgânico, as microalgas utilizam do metabolismo heterotrófico de forma parecida com outros organismos, com a oxidação dos açúcares. A capacidade de utilizar esse tipo de fonte de carbono está relacionada à permeabilidade celular diante da fonte, seu transporte ativo e fatores enzimáticos (Bumbak et al., 2011; Azma et al., 2011).

As duas microalgas obtiveram altas eficiências de remoção para o P, com 99,21% no cultivo com a *Spirulina* e 99,64% com a *Scenedesmus* (Tabela 2). Em estudo de Zhai et al. (2017), ao cultivar *Spirulina platensis* em efluente municipal sintético, os autores obtiveram remoção de 80,52% de P. A assimilação de P pelas microalgas é na forma de polifosfato, um polímero biológico composto por resíduos de P unidos por ligações fosfohidreto de alta energia. Esses compostos possuem um importante papel no aumento da resistência celular em condições desfavoráveis de cultivo (CHU et al., 2013; OTA et al., 2016). As eficiências de remoção observadas para todos os parâmetros indicam que a *Spirulina platensis* e a *Scenedesmus obliquus* são microalgas promissoras no tratamento ou pós-tratamento de efluentes.

Os rendimentos da biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus* foi baixo, desta forma apenas a cepa *Spirulina platensis* foi utilizada na segunda etapa dos ensaios nos mini tanques abertos, com adições de 10% (v/v), adição esta que não prejudicou o desenvolvimento da *Spirulina* (Tabela 1).

5.3.2 Etapa 2: Cultivo descontínuo alimentado em mini-tanques com adição de efluente contendo poluentes emergentes

A Figura 2 apresenta a curva de crescimento da *Spirulina* no cultivo em aumento de escala realizado em tanque de 10L. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), a concentração máxima de biomassa ($[X]_{\text{máx}}$) e o conteúdo de proteínas e carboidratos da biomassa estão apresentados na Tabela 3.

Figura 2: Curva de crescimento da *Spirulina platensis* com efluente doméstico no *scale-up*Tabela 2: Parâmetros cinéticos de crescimento e composição bioquímica das microalgas obtidos após cultivo microalgal com efluente doméstico no *scale-up*

<i>Spirulina platensis</i>			
Ensaio	$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	R^2	$[\text{X}]_{\text{máx}}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Controle	$0,225\pm 0,009^{\text{b}}$	0,955	$2,18\pm 0,022^{\text{b}}$
E10*	$0,149\pm 0,003^{\text{a}}$	0,898	$1,49\pm 0,219^{\text{a}}$
Ensaio	Dia	CHO* (%)	PTN* (%)
Controle	30	$41,47\pm 0,005^{\text{a}}$	$30,18\pm 0,005^{\text{f}}$
	10	$43,20\pm 0,006^{\text{b}}$	$11,57\pm 0,002^{\text{a}}$
	15	$47,49\pm 0,005^{\text{b}}$	$12,13\pm 0,001^{\text{b}}$
E10	20	$49,06\pm 0,010^{\text{d}}$	$19,62\pm 0,003^{\text{c}}$
	25	$52,77\pm 0,003^{\text{c}}$	$23,87\pm 0,019^{\text{d}}$
	30	$55,19\pm 0,002^{\text{f}}$	$29,18\pm 0,016^{\text{e}}$

CHO: carboidratos; PTN: proteínas; E10: ensaio com adição de 10% (v/v) de efluente doméstico pós-tratamento biológico. Letras iguais na coluna, não apresentam diferença estatística entre os testes em um nível de 95%. (média±desvio padrão).

Houve diferença ($p < 0,05$) nos resultados de $\mu_{\text{máx}}$ e $[\text{X}]_{\text{máx}}$ para os cultivos com a *Spirulina* realizados em mini-tanques., sendo que o ensaio com a adição de efluente apresentou o menor valor em ambos os parâmetros (Figura 2; Tabela 3). Os valores de CHO nos ensaios realizados em estufa foram maiores do que os resultados provenientes nos ensaios de em escalas laboratoriais (Tabela 1). Isto pode estar relacionado às condições de luminosidade, uma vez que ao contrário das condições laboratoriais, o controle de temperatura é menos minucioso e não há controle de intensidade de luz nos cultivos, o que impacta diretamente nos parâmetros de crescimento. Gao et al. (2022) investigaram como a intensidade de luz afeta no acúmulo de

biomassa em cultivo mixotrófico da microalga *Chlorella vulgaris* e verificaram que em maiores intensidades de luz (12.000 lux), a microalga apresentou maior concentração de biomassa.

Um dos maiores desafios em integrar o cultivo microalgal com o tratamento de efluentes é a incerteza na concentração de nutrientes presentes no meio. Ao contrário de um meio de cultivo padrão, como o *Zarrouk* para a *Spirulina*, por exemplo, é que os efluentes possuem maiores concentrações de N e P, além da possível presença de contaminantes emergentes e outros compostos, como por exemplo metais pesados, que podem apresentar toxicidade e inibição no crescimento microalgal. A fim de mitigar essa problemática, a suplementação e diluição dos efluentes pode ser empregada como uma alternativa para viabilizar o cultivo e baratear o processo (Zhai et al., 2017; Lim et al., 2021). Entretanto, estudos mostram que a concentração máxima de biomassa obtida em cultivos de *Spirulina* com efluentes é bem menor (0,2 a 1,5 g L⁻¹) se comparada ao meio padrão (0,5 a 6,9 g L⁻¹) (DINESHKUMAR et al., 2016; ZHAI et al., 2017; mostafa et al., 2019; MICHAEL et al., 2019), fato esse também observado no presente estudo (Tabela 3).

O teor de carboidratos e proteínas aumentou ao longo do tempo ($p < 0,05$), com o maior valor obtido no dia 30 (55,19%) (Tabela 3). O mesmo comportamento é observado para as proteínas, com 29,18% no dia 30. O teor de carboidratos obtido no fim do cultivo para o Controle é menor (41,47%), enquanto a porcentagem de proteínas é maior (30,18%) ($p < 0,05$) quando comparados com o ensaio E10.

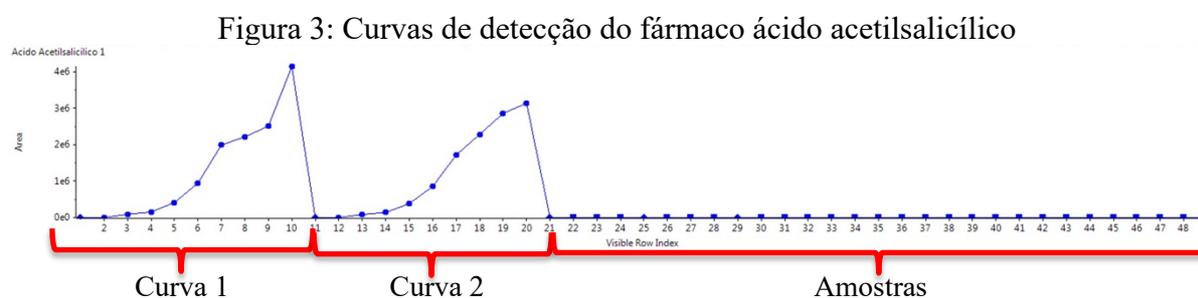
O aumento do conteúdo de carboidratos observados na Tabela 3 para a *Spirulina* em comparação aos ensaios em escala laboratoriais (9 e 16% Tabela 2) pode ter ocorrido devido às alterações de incidência luminosa e às variações de temperatura durante os cultivos na estufa, que causam uma situação de *stress* à microalga, além disso há um aumento da síntese de carboidratos em função da maior taxa fotossintética. Outro fator relevante é a colheita da biomassa ser realizada na fase de declínio (Figura 2), cenário que auxilia na acumulação de carboidratos pois, como nessa fase a concentração de N é menor que no início do cultivo, a microalga altera seu metabolismo para a síntese de carboidratos, aumentando o conteúdo intracelular desse nutriente (MAGRO et al., 2018; REMPEL et al., 2019).

Ao longo do tempo de cultivo a concentração de proteínas também sofre um acréscimo de 11,57 % no dia 10 para 29,18% no dia 30. Mojiri et al. (2021) relatam que quando há o cultivo de microalgas em baixas concentrações de PE,s (ng.L⁻¹; µg.L⁻¹) pode haver um aumento nos teores de proteínas por duas principais razões, a primeira que estas baixas concentrações causa impacto indutivo aumentando assim a síntese de enzimas e/ou outras

frações produtoras de energia; e um aumento no teor de proteínas pode apoiar as cepas microalgais a diminuir as espécies reativas de oxigênio.

5.3.2.1 Remoção de poluentes emergentes e geração de subprodutos da degradação nos cultivos com adição de efluente em modo batelada alimentada em reatores abertos

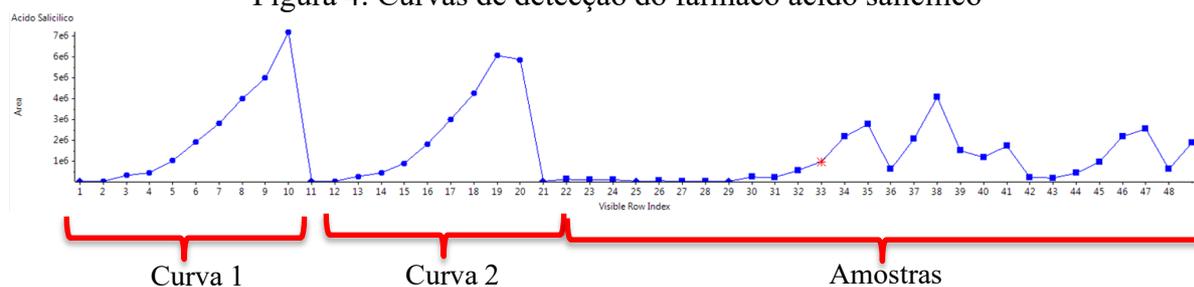
A Figura 3 apresenta as curvas de calibração para o PE's ácido acetilsalicílico, realizada a partir do padrão analítico do fármaco, a mais a resposta do cromatógrafo após a injeção das amostras.



Analisando a Figura 3 percebe que quando há a injeção de amostras contendo o analito padrão do ácido acetilsalicílico (curva 1 e curva 2) há uma resposta com concentrações que podem variar de 10-1000 μL , o que representa que o método estaria ajustado para a captação do PE, quando as amostras dos ensaios contendo este fármaco seriam injetadas. Porém, ainda de acordo com a Figura 3 percebe-se que quando a injeção das amostras provenientes do ensaio com a microalga *Spirulina platensis* não há a detecção do PE ácido acetilsalicílico, todas as amostras dos ensaios experimentais, independentes do tempo de adição, não foram detectadas.

Devido a quantidade nutrientes utilizados no cultivo da *Spirulina* pode haver a transformação de alguns compostos, principalmente quando há variações de faixas de pH. O ácido acetilsalicílico apresenta estabilidade dependente do pH em meio aquoso, e conforme há variações no meio este pode ser transformado em ácido salicílico (MOGHISEH; REZAEI, 2021). Desta forma, foi realizado a injeção de analito padrão de ácido salicílico. Foram realizadas duas curvas de calibração e após foi injetada as amostras dos nossos ensaios. A Figura 4 apresenta as curvas de calibração do ácido salicílico e os picos de repostas após injeção das amostras experimentais.

Figura 4: Curvas de detecção do fármaco ácido salicílico

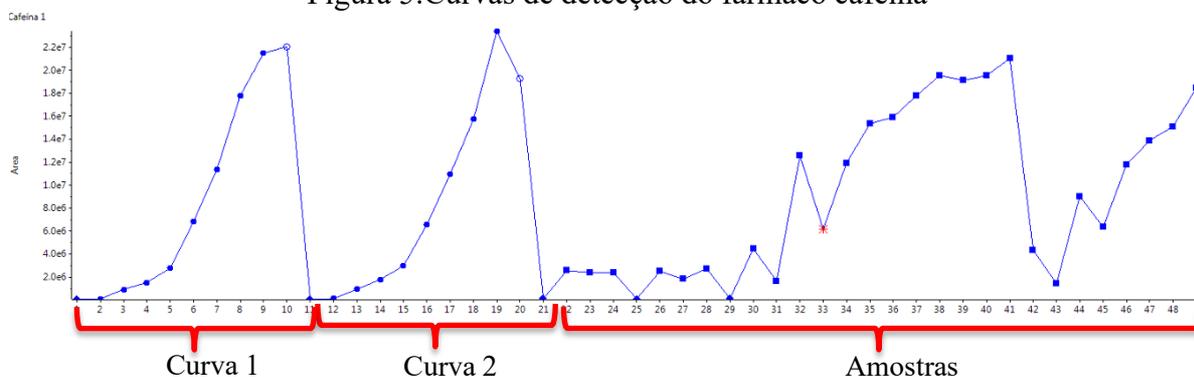


De acordo com a Figura 4 após a injeção das amostras dos ensaios experimentais há a detecção de concentrações variando de 10-1000 μL , o que corrobora a hipótese de que após a inserção do ácido acetilsalicílico nos cultivos, este foi hidrolisado e houve a transformação para ácido salicílico. Porém, como houve a transformação do composto, alterações nas concentrações foram detectadas o que impossibilitou realizar a eficiência de remoção.

Ainda, a análise do espectro de massas não apresentou a geração de subprodutos da degradação do ácido salicílico, corroborando a hipótese de que a microalga não realizou a degradação do PE.

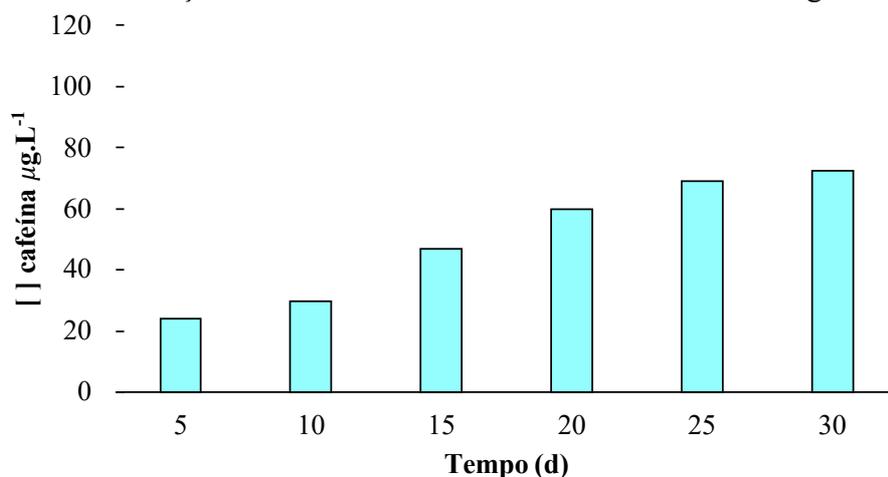
A Figura 5 apresenta as curvas de calibração da cafeína e os picos de repostas após injeção das amostras experimentais.

Figura 5: Curvas de detecção do fármaco cafeína



De acordo com a Figura 5, após a injeção das amostras dos ensaios experimentais há a detecção de concentrações variando de 10-1000 μL , o que demonstra a presença do PE cafeína nos cultivos. A Figura 6 apresenta o perfil de comportamento das concentrações de cafeína do sobrenadante do cultivo ao longo das 6 adições durante os 30 d de cultivos.

Figura 6: Concentração de cafeína no sobrenadante do cultivo ao longo dos 30 dias



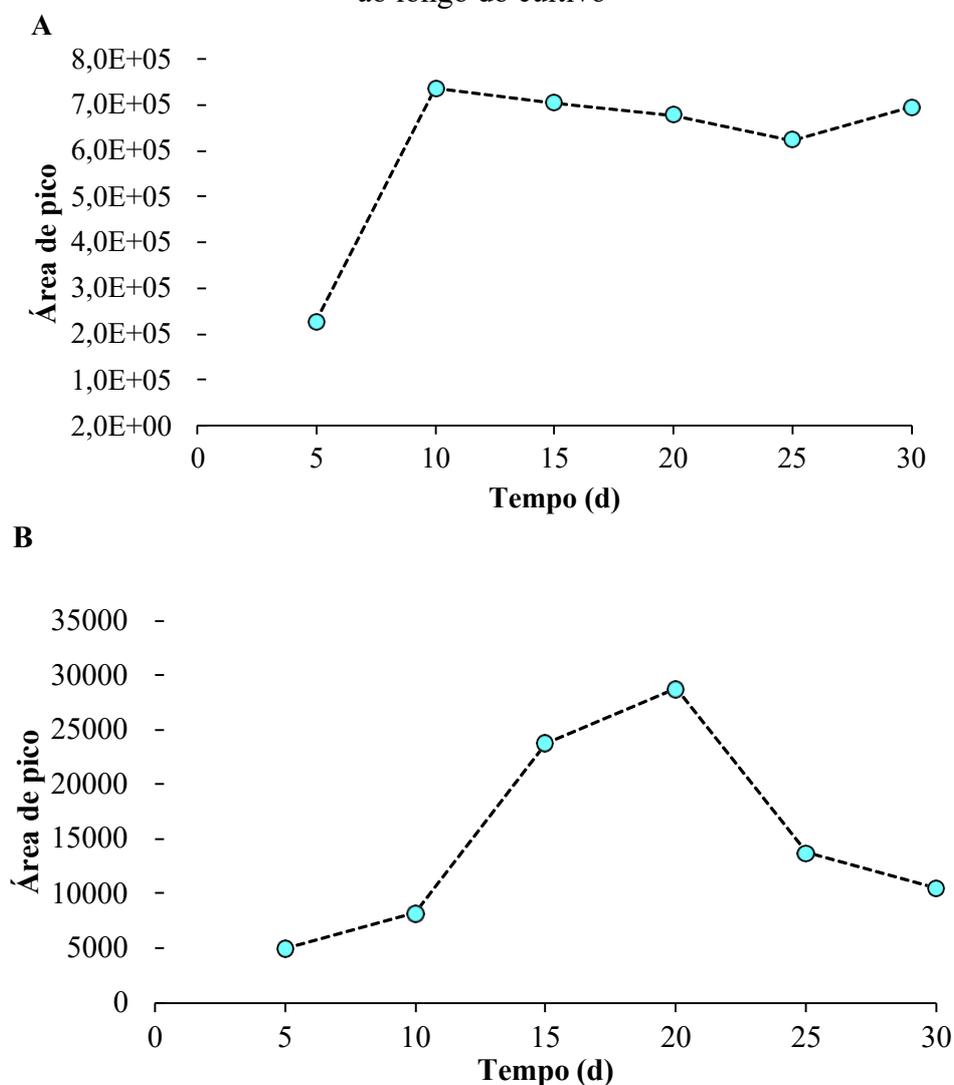
De acordo com a Figura 6 há um aumento da concentração de cafeína a cada 5 d, fator este relacionado as adições de 20 µg.L⁻¹periódicas. A concentração de cafeína mensurada no sobrenadante do cultivo no dia 30 foi de 72,27 µg.L⁻¹, após 6 adições o total de cafeína inserida foi de 120 µg.L⁻¹, com isso houve a redução de 47,73 µg.L⁻¹ obtendo-se uma eficiência de remoção de cafeína foi 39,77%. Há relatos na literatura de eficiências de remoção <90% quando há o cultivo das microalgas em consórcio com bactérias e fungos (KATAM et al., 2020). Porém a eficiência encontrada em nosso estudo esta superior do que a relatadas na literatura para a remoção de cafeína a partir apenas de cepas microalgais. Matamoros et al. (2016), utilizou as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. para a remoção de cafeína de águas residuárias domésticas e estas apresentaram eficiência média de remoção 17%. Ainda segundo Matamoros et al. (2016) a cafeína é um micropoluente que não sofre fotodegradação.

Após análises das biomassas coletadas nos tempos de adição dos efluentes não se constatou a presença de concentrações de cafeína bioadsorvidas na biomassa, fato este esperado devido ao baixo log de K_{OW} da cafeína de -0,07 (HANSCH et al., 1995). Segundo Luo et al. (2014) micropoluentes com K_{OW}<2,5 tendem a ter baixo potencial de sorção em sólidos, além disso a cafeína apresenta baixa afinidade com a células microalgais (ŠVORC, 2013; MOJIRI et al., 2021). Desta forma, não havendo fotodegradação, nem processos de bioadsorção a cafeína removida passou por mecanismos de biodegradação e possivelmente foi utilizada como uma fonte de carbono para o crescimento da microalga *Spirulina platensis*.

Como houve biodegradação, havia a possibilidade de geração de subprodutos, desta forma foi analisado via espectrofotômetro de massas, que apresentou o surgimento de subprodutos da degradação. Após a análise foram identificados dois subprodutos, a teobromina (138,06 m/z) (LAJIN et al., 2021), e a metilxantina (109,8 m/z) (SENTA et al., 2015)

subprodutos estes, já reportados na literatura, como resultados de degradação da molécula de cafeína.

Figura 7: Perfil dos subprodutos de degradação da cafeína, teobromina (A) e metilxantina (B) ao longo do cultivo

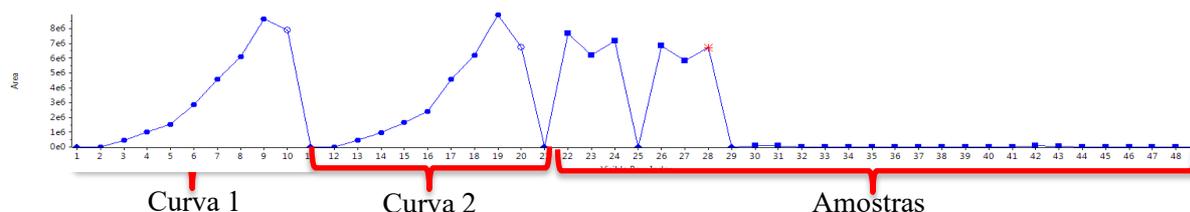


De acordo com a Figura 7, que apresenta a análise em espectrofotômetro de massa no tempo 10 d de cultivo há uma elevação no pico da presença de teobromina, o que reporta que primeiramente há a degradação da cafeína em teobromina, picos estes que se mantiveram estáveis até o final do cultivo (Figura 7 (A)). Percebe-se ainda, que após 15 d de cultivo há a presença de picos de metilxantina que alcançam seu pico máximo no vigésimo dia de cultivo (Figura 7 (B)).

De acordo com Katam et al. (2020) e Algharrwi et al. (2017) que avaliaram a degradação de cafeína por microrganismos, primeiro há a conversão para teobromina e paraxantina e posteriormente pode haver a degradação para metilxantina e xantina, fator este que ocorre em

nosso estudo, visto que nos primeiros dias de cultivos há a presença teobromina e a metilxantina atinge seu pico máximo apenas com 20 d de cultivo, o que reforça a nossa hipótese que houve degradação da cafeína por mecanismo de biodegradação.

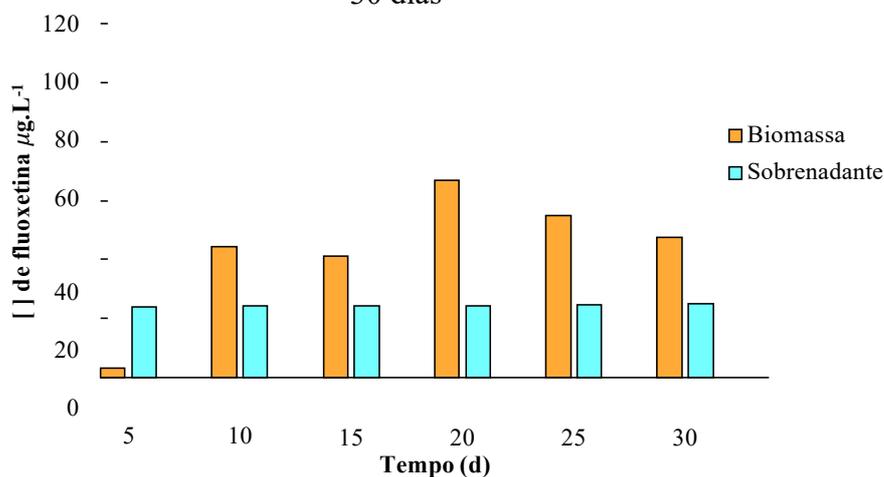
A Figura 8 apresenta as curvas de calibração de fluoxetina e os picos de repostas após injeção das amostras experimentais.



De acordo com a Figura 8, após a injeção das amostras dos ensaios experimentais há a detecção de concentrações variando de 10-1000 μL , o que corrobora que há a presença do PE fluoxetina nos cultivos.

A Figura 9 apresenta o perfil de comportamento das concentrações de fluoxetina do sobrenadante do cultivo e das biomassas ao longo das 6 adições durante os 30 d de cultivos

Figura 9: Concentração de fluoxetina no sobrenadante e na biomassa do cultivo ao longo dos 30 dias



De acordo com a Figura 9 pode-se observar que para a fluoxetina houve processo de bioadsorção e biodegradação. Durante as adições percebe-se que as 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ inseridas no sistema foram detectadas no sobrenadante do cultivo ao longo dos dias. Em relação a bioadsorção na biomassa há um aumento no tempo de 20 d, neste tempo há a maior taxa de bioadsorção 66,88 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

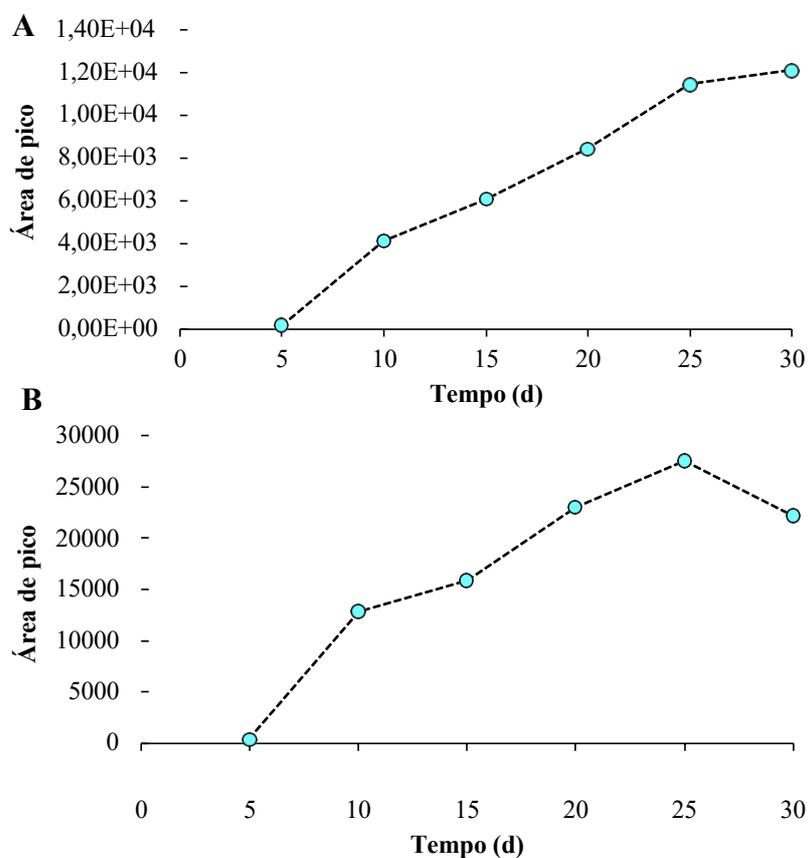
Ao longo das 6 adições, foram inseridas no sistema $120 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fluoxetina. No tempo 30 d foi determinado uma concentração de $24,94 \mu\text{g.L}^{-1}$ no sobrenadante e $47,43 \mu\text{g.L}^{-1}$ adsorvidas na biomassa, o que totalizaria entre as concentrações do sobrenadante e na biomassa $72,37 \mu\text{g.L}^{-1}$. Percebe-se assim que houve um processo de biodegradação de um valor de $47,63 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fluoxetina, esta fração de concentração foi metabolizada pela microalga ao longo dos 30 d de cultivo.

Esta fluoxetina foi biodegradada e transformada em subprodutos. Analisando-se as eficiências de remoção, que levam em consideração mecanismos de bioadsorção e biodegradação, pode-se afirmar que houve uma remoção de fluoxetina de $95,05 \mu\text{g.L}^{-1}$, visto que $47,43 \mu\text{g.L}^{-1}$ ficou adsorvida na biomassa no tempo 30 d e houve uma degradação de $47,63 \mu\text{g.L}^{-1}$, ficando apenas a concentração residual no sobrenadante de $24,94 \mu\text{g.L}^{-1}$ que não foi metabolizada pela microalga. Desta forma a microalga *Spirulina platensis* teve uma eficiência de remoção de fluoxetina de 79,20%. García-Galán et al. (2017) em um estudo utilizando microalgas relatam que houve processos de biodegradação e bioadsorção de diferentes fármacos, incluindo fluoxetina em reatores abertos com eficiências superiores a 60%.

Ainda, de acordo com Luo et al. (2014) componentes com $K_{OW} >$ que 4,0 tendem a maior potencial de ficar adsorvidos em frações sólidas. Adlard et al. (1995) relatam que o K_{OW} da fluoxetina possui um valor de 4,05 o que evidencia que a fluoxetina tem alto potencial de ficar adsorvida em diferentes matrizes sólidas. Este fato foi observado em nosso estudo, pois cerca de 40% da concentração de fluoxetina inserida no cultivo ficou adsorvida na biomassa de *Spirulina platensis*.

Como comentado anteriormente cerca de $47 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fluoxetina foi biodegradada durante os 30 d de cultivo, sendo assim foi avaliado a geração de subprodutos via espectrofotometria de massas, foram avaliados e detectados a presença de norfluoxetina (296,2 m/z) e para-trifluorometilfenol (161,02 m/z) (LIN et al., 2020; CHOW et al., 2021).

Figura 10: Perfil dos subprodutos de degradação da fluoxetina, norfluoxetina (A) e para-trifluorometilfenol (B) ao longo do cultivo



A norfluoxetina (Figura 10 (A)) é o principal metabólito secundário da fluoxetina, estima-se que de 20-30% da fluoxetina metabolizada é transformada rapidamente em norfluoxetina (WHITLOCK et al., 2019). Avaliando a Figura 10 (A) percebe-se que realmente há uma transformação rápida de fluoxetina em norfluoxetina, sendo que após a primeira adição entre os dias 5 e 10 já há a detecção de picos de norfluoxetina, e há um crescimento dos picos de detecção ao longo dos dias de cultivo, após cada adição de fluoxetina.

Nałecz-Jawecki (2007) em um estudo que avaliou a biotransformação da fluoxetina em testes ecotoxicológico em protozoários realizou espectro de massas e identificou a presença de norfluoxetina e de para-trifluorometilfenol, também identificado em nosso estudo (Figura 10 (B)). O para-trifluorometilfenol é um resultado da desalquilação da fluoxetina, através de reações onde se dá a retirada de compostos que possuem várias ligações de hidrogênio e carbono (URICHUK et al., 1997). Assim, há evidências para corroborar com a hipótese que houve processos de biodegradação da fluoxetina através do metabolismo da microalga *Spirulina platensis* já que identificamos a geração de dois dos principais subprodutos da degradação da fluoxetina.

Sobre o paracetamol, não foi possível analisar a presença do fármaco nas amostras, a hipótese é que pode ter ocorrido um processo de modificação da conformação da molécula do paracetamol, provavelmente ocasionada por alguma ligação com os compostos presentes no meio de cultivo da *Spirulina platensis*, impossibilitando a detecção do PE.

5.4 Conclusões

As microalgas *Spirulina platensis* e a *Scenedesmus obliquus* se desenvolveram em meios contendo concentrações de até 10% (v/v) de efluente doméstico pré tratado nos reatores fechados. Ainda, reduziram em mais de 85% os teores residuais de nitrogênio, DBO e DQO que estavam presentes no efluente antes de ser inserido nos cultivos. Ao final dos cultivos as microalgas produziram biomassas com altos teores de carboidratos (41,60%) e proteínas (68,32%). No aumento de escala realizado em tanques abertos a microalga *Spirulina platensis* também se desenvolveu com adição de efluente doméstico pré tratado em 10% (v/v), gerando biomassa com altos teores de carboidratos (55,19%) e proteínas (29,18%). Além disso, suportou a adição de até 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do conjunto de PE's. Houve reduções de 39% das concentrações de cafeína e de aproximadamente 80% da fluoxetina, realçando que houve a geração de subprodutos da degradação destes PE,s o que elucida que a *Spirulina platensis* realiza a remoção dos PE's por mecanismo de biodegradação e bioadsorção, já que parte da fluoxetina ficou bioadsorvida na biomassa. Portanto, surge assim uma alternativa promissora de pós-tratamento de efluente, que é capaz de atuar sobre cargas residuais após tratamento físico-químico ou biológico de efluentes doméstico. Ainda, atuar sobre as concentrações desta nova classe de poluentes que não são removidos ou degradados por processos convencionais de tratamento. Sendo assim, é possível reduzir os impactos provenientes destes contaminantes, reduzindo os efeitos maléficos ao ecossistema e a saúde pública e ainda gerando biomassas que podem ser utilizadas na produção de bioenergia.

REFERÊNCIAS

- Adlard, M., Okafo, G., Meenan, E., & Camilleri, P. (1995). Rapid estimation of octanol–water partition coefficients using deoxycholate micelles in capillary electrophoresis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (21), 2241-2243.
- AFIFY, Abd El-Moneim MR et al. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399-408, 2018.
- AHMED, Shams Forruque et al. Progress and challenges of contaminate removal from wastewater using microalgae biomass. **Chemosphere**, v. 286, p. 131656, 2022.
- ALGHARRAWI, Khalid HR; SUMMERS, Ryan M.; SUBRAMANIAN, Mani. Production of theobromine by N-demethylation of caffeine using metabolically engineered *E. coli*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 153-160, 2017.
- AZMA, Mojtaba et al. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 187-195, 2011
- BUMBAK, Fabian et al. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 31-46, 2011.
- ČELIĆ, Mira et al. Pharmaceuticals as chemical markers of wastewater contamination in the vulnerable area of the Ebro Delta (Spain). **Science of the Total Environment**, v. 652, p. 952-963, 2019.
- CHIA, Shir Reen et al. Microalgal protein extraction from *Chlorella vulgaris* FSP-E using triphasic partitioning technique with sonication. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 396, 2019.

CHOW, Timothy W. et al. A validated enantioselective assay for the simultaneous quantitation of (R)-,(S)-fluoxetine and (R)-,(S)-norfluoxetine in ovine plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 5-6, p. 349-358, 2011.

CHU, Fei-Fei et al. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.

CLASSICS LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2011. Resolução nº 430, 13 de Maio de 2011. Ministério do Meio Ambiente.

CONSEMA - Conselho Estadual do Meio Ambiente, 2017. Resolução nº 355. Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável.

DAN, A. et al. Removal efficiency, kinetic, and behavior of antibiotics from sewage treatment plant effluent in a hybrid constructed wetland and a layered biological filter. **Journal of Environmental Management**, v. 288, p. 112435, 2021.

DINESHKUMAR, R.; NARENDRAN, R.; SAMPATHKUMAR, P. Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. 2016. DISMUKES, G. Charles et al. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 235-240, 2008.

DUBOIS, Michel et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAN, Honghui et al. A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, p. 100849, 2020.

FISCHER, Astrid et al. Development and application of relevance and reliability criteria for water treatment removal efficiencies of chemicals of emerging concern. **Water research**, v. 161, p. 274-287, 2019.

FRANCO, Mariana Bernardes et al. Exposure to dilute concentrations of bupropion affects zebrafish early life stages. **Chemosphere**, v. 222, p. 175-183, 2019.

GAO, Pengtao et al. Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. **Journal of environmental management**, v. 302, p. 114095, 2022.

GARCÍA-GALÁN, María Jesús et al. Fate of priority pharmaceuticals and their main metabolites and transformation products in microalgae-based wastewater treatment systems. **Journal of hazardous materials**, v. 390, p. 121771, 2020.

GOSWAMI, Rahul Kumar et al. Microalgae-based biorefineries for sustainable resource recovery from wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101747, 2021.

Grady, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. (2011). *Biological wastewater treatment*. CRC press, 3^a ed, 963 p.

HANSCH, Corwin et al. The expanding role of quantitative structure-activity relationships (QSAR) in toxicology. *Toxicology letters*, v. 79, n. 1-3, p. 45-53, 1995.

HEN, Qiao-Hui et al. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 257-263, 2015.

HERNÁNDEZ, David et al. Recovery of protein concentrates from microalgal biomass grown in manure for fish feed and valorization of the by-products through anaerobic digestion. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, p. 28, 2018.

ISTGA1. **Renewable Energy**, 135, 617-625. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.056>

KATAM, Keerthi et al. Performance evaluation of two trickling filters removing LAS and caffeine from wastewater: Light reactor (algal-bacterial consortium) vs dark reactor (bacterial consortium). **Science of The Total Environment**, v. 707, p. 135987, 2020.

LAJIN, Bassam et al. The determination of the paraxanthine/caffeine ratio as a metabolic biomarker for CYP1A2 activity in various human matrices by UHPLC-ESIMS/MS. **Talanta**, v. 234, p. 122658, 2021.

LEONARD, Anne Fc et al. Natural recreational waters and the risk that exposure to antibiotic resistant bacteria poses to human health. **Current opinion in microbiology**, v. 65, p. 40-46, 2022.

LIM, Hooi Ren et al. Perspective of Spirulina culture with wastewater into a sustainable circular bioeconomy. **Environmental Pollution**, v. 284, p. 117492, 2021.

LIN, Elizabeth Z. et al. The fresh air wristband: A wearable air pollutant sampler. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 7, n. 5, p. 308-314, 2020.

LUO, Yunlong et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the total environment**, v. 473, p. 619-641, 2014.

MAGRO, Francisco Gerhardt et al. Spirulina platensis biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds. **Environmental technology**, v. 39, n. 14, p. 1868-1877, 2018.

MATAMOROS, Víctor et al. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: a pilot-scale study. **Journal of hazardous materials**, v. 288, p. 34-42, 2015.

MICHAEL, Angelina; KYEWALYANGA, Margareth Serapio; LUGOMELA, Charles Venance. Biomass and nutritive value of Spirulina (Arthrospira fusiformis) cultivated in a cost-effective medium. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 13, p. 1387-1395, 2019.

MOGHISEH, Zohreh; REZAEI, Abbas. Removal of aspirin from aqueous solution using electroactive bacteria induced by alternating current. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 20, p. 25327-25338, 2021.

MOHSENPOUR, Seyedeh Fatemeh et al. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 142168, 2021.

MOJIRI, A. et al. Removal of Pharmaceutical Micropollutants with Integrated Bio-char and Marine Microalgae. *Microorganisms* 2021, 9, 4. 2020.

MUKHOPADHYAY, Anwasha; DUTTAGUPTA, Srimanti; MUKHERJEE, Abhijit. Emerging Organic Contaminants in Global Community Drinking Water Sources and Supply: A Review of Occurrences, Processes and Removal. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 107560, 2022.

NAŁĘCZ-JAWECKI, Grzegorz. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. **Chemosphere**, v. 70, n. 1, p. 29-35, 2007.

OTA, Shuhei et al. Deciphering the relationship among phosphate dynamics, electron-dense body and lipid accumulation in the green alga *Parachlorella kessleri*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

PATEL, Manvendra et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods. **Chemical reviews**, v. 119, n. 6, p. 3510-3673, 2019.

PEREIRA, Maria IB et al. Mixotrophic cultivation of *Spirulina platensis* in dairy wastewater: Effects on the production of biomass, biochemical composition and antioxidant capacity. **PloS one**, v. 14, n. 10, p. e0224294, 2019.

PROCHÁZKOVÁ, Gita et al. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal of applied phycology**, v. 26, n. 3, p. 1359-1377, 2014.

REMPEL, Alan et al. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121588, 2019.

REMPEL, Alan et al. Cultivation of microalgae in media added of emergent pollutants and effect on growth, chemical composition, and use of biomass to enzymatic hydrolysis. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 1, p. 265-277, 2021.

RIPPKA, Rosmarie et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

SENTA, Ivan et al. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. **Water research**, v. 74, p. 23-33, 2015.

Sharma, P., Srinivas, G. L. K., Varjani, S., & Kumar, S. (2021). Emerging microalgae-based technologies in biorefinery and risk assessment issues: Bioeconomy for sustainable development. *Science of The Total Environment*, 152417.

SHEN, Liang et al. Assessment upon heterotrophic microalgae screened from wastewater microbiota for concurrent pollutants removal and biofuel production. **Bioresource technology**, v. 245, p. 386-393, 2017.

SUNDARRAJAN, PanneerSelvam et al. An insight into carbon balance of product streams from hydrothermal liquefaction of *Scenedesmus abundans* biomass. **Renewable Energy**, v. 151, p. 79-87, 2020.

ŠVORC, L.'ubomír. Determination of caffeine: a comprehensive review on electrochemical methods. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 8, p. 5755-5773, 2013.

TEODOSIU, Carmen et al. Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: A review on processes and environmental performances assessment. **Journal of cleaner production**, v. 197, p. 1210-1221, 2018.

TRIPATHI, Ritu; GUPTA, Asmita; THAKUR, Indu Shekhar. An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. **Renewable Energy**, v. 135, p. 617-625, 2019.

URICHUK, Liana J. et al. Determination of p-trifluoromethylphenol, a metabolite of fluoxetine, in tissues and body fluids using an electron-capture gas chromatographic procedure. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 698, n. 1-2, p. 103-109, 1997.

WHITLOCK, Sophia E. et al. Detecting fluoxetine and norfluoxetine in wild bird tissues and feathers. **Environment international**, v. 126, p. 193-201, 2019.

XIE, Peng et al. Revealing the role of adsorption in ciprofloxacin and sulfadiazine elimination routes in microalgae. **Water research**, v. 172, p. 115475, 2020.

XING, Yi et al. Effect of minocycline on the changes in the sewage chemical index and microbial communities in sewage pipes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, p. 123792, 2021.

XIONG, Jiu-Qiang; KURADE, Mayur B.; JEON, Byong-Hun. Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water?. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 30-44, 2018

YANG, Lu et al. Contamination, source and potential risks of pharmaceuticals and personal products (PPCPs) in Baiyangdian Basin, an intensive human intervention area, China. **Science of The Total Environment**, v. 760, p. 144080, 2021.

YU, Chi Li et al. Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4624-4632, 2009.

ZARROUK, Claude. Contribution a l'etude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina mixima*. **Thesis. University of Paris, France.**, 1966.

ZHAI, Jun et al. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. **Ecological engineering**, v. 108, p. 83-92, 2017.

ZHAI, Jun et al. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. **Ecological engineering**, v. 108, p. 83-92, 2017.

ZHANG, Chaofan; LI, Shengnan; HO, Shih-Hsin. Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: a critical review. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 126056, 2021.

ZHOU, Guang-Jie et al. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 8, p. 2018-2027, 2014.

ZHOU, Wenguang et al. Microalgae cultivation and photobioreactor design. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. Academic Press, 2020. p. 31-50.

ZOU, Mengyuan et al. Quinolone antibiotics in sewage treatment plants with activated sludge treatment processes: A review on source, concentration and removal. **Process Safety and Environmental Protection**, 2022.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os poluentes emergentes apresentaram níveis de toxicidades diferentes para as três cepas de microalgas. A fluoxetina foi o poluente com efeito tóxico mais elevado para as microalgas, sendo que a menor concentração testada, de 1 mg.L^{-1} , foi a única em que as três cepas conseguiram se desenvolver. O poluente diazepam também apresentou alto efeito tóxico nas três cepas de microalgas, sendo que houve crescimento em concentrações inferiores a 30 mg.L^{-1} . O fármaco paracetamol apresentou efeito tóxico mais agudo para as microalgas *Spirulina* e *Chlorella*, houve crescimento celular em concentrações inferiores a 30 mg/L , já para a microalga *Scenedesmus* não houve morte celular após 20 dias de cultivos para todas as concentrações testadas, reforçando que a *Scenedesmus* é mais resistente que outras microalgas. Os poluentes cafeína e ácido acetilsalicílico apresentaram baixo efeito tóxico para as três cepas de microalgas, sendo que houve crescimento em concentrações de 100 a 1 mg.L^{-1} . Os fármacos, além de apresentarem efeito tóxico às microalgas, também ocasionaram *stress* aos cultivos, que por consequência interferiu na composição celular das microalgas. Os teores de carboidratos e proteínas foram alterados, em experimentos chegando a valores próximos 50% de carboidrato e a 67% de proteínas.

O teste de hidrólise nas biomassas cultivadas com e sem a presença dos fármacos apresentam resultados iguais de eficiência de hidrólise, o que evidencia que a presença dos poluentes durante o cultivo das microalgas não interferiu no processo de geração hidrólise enzimática, podendo assim fazer o uso desta biomassa para a produção de bioetanol. Quando foi realizado o cultivo com a adição conjunta dos fármacos, os ensaios que tinham a presença de fluoxetina, paracetamol e diazepam apresentaram mesmo efeito toxicológicos observados nos cultivos com a adição separadamente dos fármacos, reforçando assim a toxicidade dos mesmos.

Os testes de ecotoxicidade dos sobrenadantes dos cultivos da microalga *Spirulina* e *Scenedesmus* apresentaram resultados diferentes de índices de germinação para as duas sementes testadas. Na presença do sobrenadante da *Spirulina*, as sementes de alface não germinaram, enquanto as de pepino apresentaram elevada fitotoxicidade, com índices de germinação (IG) menores que 15% . Houve a germinação de ambas as sementes com o sobrenadante da *Scenedesmus* e os valores de IG foram iguais ao controle de água destilada, o que indica que as sementes não foram afetadas negativamente com a presença do sobrenadante.

Sendo assim, as microalgas avaliadas surgem como uma alternativa promissora para o tratamento de águas residuais contaminadas com diferentes fármacos e posterior uso do sobrenadante dos cultivos na fertirrigação de plantas.

Ainda, a microalga *Spirulina* apresentou eficiência de degradação dos poluentes testados, realizando a transformação destes em subprodutos menos tóxicos. Fatores como resistência das microalgas, composição celular adequada para produção biocombustíveis no caso das microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus*, uso dos sobrenadantes da *Scenedesmus obliquus* como fertirrigação e atuação do mecanismo de biodegradação dos poluentes testados, demonstram que uso das microalgas como uma alternativa de pós-tratamento de efluentes sanitários visando a remoção e degradação destes poluentes emergentes é uma técnica promissora. Podendo assim agregar sustentabilidade ao processo de tratamento, pois além do tratamento destes efluentes pode haver a geração de produtos. Porém, é necessário o aprofundamento dos estudos sobre usos de biomassas e do sobrenadantes dos cultivos, visando aplicabilidade em maior escala atingindo assim os conceitos de biorrefinarias, tornando assim o uso das microalgas como alternativa de tratamento e propondo o uso total de todas as frações de biomassa e nutrientes residuais após cultivo.



UPF

UNIVERSIDADE
DE PASSO FUNDO

UPF Campus I - BR 285, São José
Passo Fundo - RS - CEP: 99052-900
(54) 3316 7000 - www.upf.br