

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS
HÍDRICOS**

**BIORREMEDIÇÃO COM MICROALGAS ACOPLADA AO
TRATAMENTO TERCIÁRIO PARA EFLUENTES CONTENDO
ANTIBIÓTICOS**

LARISSA DE ABREU COSTA RAMOS

Itajubá, MG
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS
HÍDRICOS

LARISSA DE ABREU COSTA RAMOS

BIORREMEDIAÇÃO COM MICROALGAS ACOPLADA AO
TRATAMENTO TERCIÁRIO PARA EFLUENTES CONTENDO
ANTIBIÓTICOS

Monografia submetida ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração:

Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Chuei Matsudo

Itajubá, MG
2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por me conduzir e capacitar, por ser meu refúgio e fortaleza. Minhas conquistas sempre serão para o Senhor.

Agradeço ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado, foi meu apoio e o meu maior incentivador. Tenho certeza de que o seu companheirismo deixou essa jornada muito mais agradável.

Agradeço aos meus pais, Luiz Carlos e Márcia, e aos meus irmãos, Yasmin e Felipe, pela cumplicidade, confiança e pelo amor incondicional. Agradeço as orações e por sempre me incentivarem a ir mais longe.

Ao meu orientador, professor Marcelo Matsudo, por sua orientação com excelência, sua disponibilidade e apoio constantes na realização de todo trabalho e principalmente pelo conhecimento compartilhado. Foi um privilégio ser sua orientada e poder aprender com você.

Ao técnico e companheiro de laboratório, Paulo, obrigada pela companhia e por não medir esforços para auxiliar no que foi necessário.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro desta pesquisa.

À Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e ao Departamento de Relações Internacionais, pelo incentivo e apoio financeiro durante o estágio de curta duração em Portugal. Sempre serei grata por esta oportunidade.

Ao professor José Carlos Magalhães Pires, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, por, tão prontamente, me receber e me orientar durante meu estágio na FEUP. Obrigada por me proporcionar essa oportunidade.

Ao professor João Carlos Monteiro de Carvalho da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), por gentilmente ter disponibilizado seu laboratório e assim cooperado com os resultados obtidos.

Enfim, agradeço à todos os amigos e colegas que fizeram parte da minha vida durante esse mestrado. Obrigada por caminharem ao meu lado.

RESUMO

O aumento no uso de antibióticos e a disposição inadequada destes são responsáveis por aumentar o processo de resistência bacteriana nos ambientes aquáticos. As estações de tratamento de esgoto (ETE) atuais não foram projetadas para remover fármacos que, em sua maioria, permanecem inalterados após passarem pelos processos biológicos. Processos oxidativos avançados, ozonização, reatores com lâmpada ultravioleta e adsorção com carvão ativado, são exemplos de tecnologias disponíveis para a remoção desses poluentes, porém são caros e muitas vezes insustentáveis, além de não serem empregados pela maior parte das ETE. A cultura de microalgas oferece uma opção interessante para o tratamento terciário de águas residuais, pois estas têm a capacidade de acumular nutrientes, remover contaminantes emergentes, além de produzir uma biomassa potencialmente valiosa. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência de remoção dos antibióticos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP), utilizando fotobiorreatores de bancada através do cultivo da microalga *Monoraphidium contortum*. Foram realizados seis cultivos diferentes a fim de avaliar a máxima concentração celular atingida (X_m), a produtividade em biomassa (P_x), a capacidade de consumo de nitrogênio e a eficiência de remoção dos antibióticos selecionados. Foram realizados quatro cultivos em meio Bold (cultivo padrão, com SMX, com TMP e com SMX e TMP juntos) e dois cultivos em efluente sintético (cultivo padrão e com SMX), sendo os parâmetros de pH e crescimento celular monitorados diariamente. O cultivo em efluente sintético resultou em menor valor de X_m , comparado ao cultivo em meio Bold, onde há maior concentração de nutrientes e, devido ao crescimento insuficiente, os ensaios de remoção foram realizados no meio Bold. As remoções para os experimentos realizados no meio Bold foram iguais a 42,3% (SMX), 28,6% (TMP) e, em adição simultânea dos antibióticos, 27,6% e 7,0% (TMP e SMX, respectivamente). Para o experimento realizado no efluente sintético, não houve remoção do sulfametoxazol. Remoções de mais de 90% da concentração de nitrogênio total foram encontradas para os cultivos realizados em meio Bold, com ou sem a presença dos antibióticos. A avaliação das biomassas revelou que a espécie *M. contortum* destaca-se como uma opção promissora para a obtenção de lipídios, os quais são adequados para a produção de biodiesel. Sendo assim, o cultivo de microalgas deste estudo demonstra ser um potencial para a biorremediação de efluentes com a diminuição da concentração de micropoluentes e nutrientes no meio de cultivo, além de produzir uma biomassa

potencialmente valiosa. Tal estratégia é interessante visto que a diversidade desses microrganismos é abundante e sua utilização é sustentável.

Palavras-chave: Contaminantes emergentes; biorremediação; antibióticos; microalgas; biomassa.

ABSTRACT

The increase in the use of antibiotics and their inadequate disposal are responsible for increasing the process of bacterial resistance in aquatic environments. Current sewage treatment plants (STP) were not designed to remove drugs that, in most cases, remain unchanged after passing through biological processes. Advanced oxidative processes, ozonation, ultraviolet lamp reactors and activated carbon adsorption are examples of technologies available for the removal of these pollutants, but they are expensive and often unsustainable, in addition to not being used by most STP. Microalgae culture offers an interesting option for the tertiary treatment of wastewater, as they have the ability to accumulate nutrients, remove emerging contaminants, in addition to producing potentially valuable biomass. This work aimed to evaluate the efficiency of removal of the antibiotics sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP), using bench-scale photobioreactors through the cultivation of the microalgae *Monoraphidium contortum*. Six different cultures were carried out in order to evaluate the maximum cell concentration reached (X_m), biomass productivity (P_x), nitrogen consumption capacity and removal efficiency of the selected antibiotics. Four cultures were carried out in Bold medium (standard culture, with SMX, with TMP, and with SMX and TMP together) and two cultures in synthetic effluent (standard culture and with SMX), with pH and cell growth parameters daily monitored. Cultivation in synthetic effluent resulted in a lower X_m value, compared to cultivation in Bold medium, where there is a higher concentration of nutrients and, due to this insufficient growth in synthetic effluent, the removal assays were performed in Bold medium. The removals for the experiments carried out in Bold medium were equal to 42.3% (SMX), 28.6% (TMP) and, in simultaneous addition of antibiotics, 27.6% and 7.0% (TMP and SMX, respectively). For the run carried out in the synthetic effluent, there was no removal of sulfamethoxazole. Removals of more than 90% of the total nitrogen concentration were found for cultures carried out in Bold medium, with or without the presence of antibiotics. The evaluation of biomass revealed that the species *M. contortum* stands out as a promising option for obtaining lipids, which are suitable for the production of biodiesel. Therefore, the cultivation of microalgae in this study demonstrates potential for the bioremediation of effluents by reducing the concentration of micropollutants and nutrients in the cultivation medium, in addition to producing potentially valuable biomass. This strategy is interesting since the diversity of these microorganisms is abundant and their use is sustainable.

Keywords: Emerging contaminants; bioremediation; antibiotics; microalgae; biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula química estrutural dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim ..	11
Figura 2: (a) Raceway pond, (b) Fotobiorreator plano, (c) Fotobiorreator tubular	17
Figura 3 - Fotobiorreator tubular tipo Air-lift em escala laboratorial	26
Figura 4: Crescimento da microalga <i>M. contortum</i> com SMX	32
Figura 5: Crescimento da microalga <i>M. contortum</i> com TMP	32
Figura 6: Curva de calibração de <i>Monoraphidium contortum</i>	33
Figura 7: Curva de crescimento médio da <i>M. contortum</i> em fotobiorreator	34
Figura 8: Quantificação da remoção dos antibióticos no meio de cultivo.....	36
Figura 9: Cromatogramas dos experimentos com SMX, TMP e SMX-TMP	37
Figura 10: Curva de calibração Nitrato	40
Figura 11: Curva de calibração nitrito	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis de ocorrência de sulfametoxazol e trimetoprim em efluentes de ETEs e em águas de rios da Ásia, Europa e América	11
Tabela 2: Principais tecnologias terciárias de tratamento de fármacos	13
Tabela 3 - Fatores que influenciam a taxa de crescimento das microalgas.....	15
Tabela 4 – Possíveis aplicações da biomassa de microalgas.....	16
Tabela 5: Estudos de remoção de nitrogênio e fósforo através do cultivo de microalgas	20
Tabela 6: Estudos da biorremediação de antibióticos através do cultivo de microalgas	23
Tabela 7: Gradiente utilizado para a eluição dos antibióticos	29
Tabela 8: Concentração máxima ($X_{máx}$) e Produtividade em biomassa (P_x) para dos cultivos em fotobiorreator	34
Tabela 9: Valores de Nitrogênio antes e depois dos cultivos	41
Tabela 10: Teores de proteína e de lipídios em biomassa de <i>Monoraphidium contortum</i> para diferentes meios de cultivo	42
Tabela 11: Perfil de ácidos graxos (%) das frações lipídicas de cada cultivo	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEs	Contaminantes emergentes
CO ₂	Dióxido de carbono ou gás carbônico
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HPLC	High performance liquid chromatography
K _{bio}	Constante de biodegradabilidade
K _d	Coefficiente de distribuição ou partição sólido-líquido
K' _H	Constante da Lei de Henry
O ₂	Gás oxigênio
P _x	Produtividade em biomassa
POAs	Processos Oxidativos Avançados
PPCPs	Pharmaceutical and personal care products
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprim
X _{máx}	Concentração máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Micropoluentes ou Contaminantes Emergentes (CEs).....	9
1.2 Remoção de fármacos em sistemas de tratamento de esgoto	11
1.3 Microalgas	14
1.4 Tecnologias de tratamento baseadas no cultivo de microalgas	17
1.4.1 Sistemas de cultivo de microalgas.....	17
1.4.2 Assimilação de nutrientes utilizando microalgas	18
1.4.3 Mecanismos de remoção de MPEs utilizando microalgas	20
2 HIPÓTESES E OBJETIVOS	25
2.1 Hipóteses	25
2.2 Objetivos.....	25
2.2.1 Objetivo Geral	25
2.2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Preparo do inóculo.....	27
3.2 Quantificação da Biomassa	27
3.3 Cultivo de <i>Monoraphidium contortum</i> em fotobiorreator tubular	27
3.3.1 Cultura de <i>Monoraphidium contortum</i> em meio Bold	27
3.3.2 Cultura de <i>Monoraphidium contortum</i> em efluente sintético.....	28
3.4 Quantificação da remoção dos antibióticos por HPLC-UV	28
3.5 Análise da remoção de nitrogênio	29
3.6 Análise da composição bioquímica da biomassa obtida	30
3.6.1 Quantificação de lipídios totais	30
3.6.2 Quantificação de proteínas totais.....	30
3.6.3 Determinação do perfil de ácidos graxos	30
3.7 Análise estatística	31

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Identificação da concentração inibitória dos antibióticos sobre a microalga.	32
4.2 Avaliação do crescimento da microalga <i>Monoraphidium contortum</i> em fotobiorreator tubular.....	33
4.3 Quantificação da remoção dos antibióticos por HPLC-UV	36
4.4 Análise da remoção de nitrogênio total	39
4.5 Análise da composição bioquímica da biomassa	41
5 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO.....	57
Anexo 1 – Composição do meio Bold - Bold 1NV Medium esterilizado.....	57
Anexo 2 – Composição do Efluente Sintético – (Xu et al., 2014)	58

1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de água potável para o consumo humano está entre os principais problemas em relação aos recursos naturais disponíveis atualmente. Com a expansão populacional e o desenvolvimento industrial, houve um aumento na liberação de contaminantes para os corpos hídricos, aumentando assim a pressão sobre este recurso (SENGUPTA et al., 2013). Os efluentes domésticos, de origem agrícola, pecuária e industriais, muitas vezes são ricos em nutrientes como nitrogênio, fósforo, e contaminantes emergentes (CEs). Estes têm sido alvo de preocupações crescentes devido aos riscos e impactos associados aos corpos aquáticos e à saúde humana (SOUSA et al., 2022).

1.1 Micropoluentes ou Contaminantes Emergentes (CEs)

Os CEs são substâncias químicas de status não regulatório, ou seja, ainda não fazem parte de programas de monitoramento de rotina, mas são futuros candidatos à regulamentação (WILKINSON et al., 2017). Estes compreendem substâncias naturais, como substâncias de defesa excretadas por espécies invasoras em determinado ecossistema, e antropogênicas, incluindo produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PPCPs- *pharmaceutical and personal care products*), pesticidas e produtos químicos industriais. Os PPCPs compreendem o maior grupo sendo utilizados na pecuária, agricultura e na vida cotidiana dos seres humanos (SMITAL et al, 2004; HENA et al, 2021).

Segundo Hernández et al. (2007) e Sutherland e Ralph (2019), os PPCPs estão presentes no meio ambiente há muito tempo, no entanto, recentemente, com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas como cromatografia líquida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, foi possível detectar estes compostos presentes em baixíssima concentração (entre $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Dentre os PPCPs tem-se os antibióticos (SIEDLEWICZ et al., 2016; RODRIGUES, 2020).

Os antibióticos são medicamentos responsáveis por eliminar ou inibir o crescimento das bactérias, por conta disso, são amplamente utilizados para combater doenças infecciosas em humanos e animais (BROWN E WRIGHT, 2016). As principais classes de antibióticos são: β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), macrolídeos, sulfonamidas, trimetoprimas, fluoroquinolonas e tetraciclina (LOCATELLI et al., 2011).

Essa carga de antibióticos disposta no meio ambiente pode acarretar sérias consequências para os ecossistemas e a saúde humana. A exposição contínua das bactérias aos antibióticos pode aumentar a seleção das cepas resistentes, pois os antibióticos são normalmente encontrados no ambiente em concentrações subterapêuticas (ZUCCATO et al., 2010). Assim, este fenômeno pode reduzir o potencial dos tratamentos envolvendo os antibióticos e é evidente a necessidade do desenvolvimento de tecnologias que são capazes de remover tais micro poluentes (RODRIGUES, 2020).

Neste estudo, foram analisados os antibióticos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprim (TMP), dois entre os dez antibióticos mais consumidos no Brasil nos últimos anos (NEVES E CASTRO et al., 2020). Na Tabela 1 pode-se ver os níveis de ocorrência de ambos os fármacos em efluentes de ETEs e em águas de rios da Ásia, Europa e América. Suas estruturas químicas podem ser vistas na Figuras 1 a seguir.

O sulfametoxazol (SMX), um dos antibióticos da classe sulfonamidas, é eficaz tanto contra bactérias gram negativas como em bactérias gram positivas. Também é amplamente utilizado na pecuária e na indústria de aquicultura para curar infecções bacterianas. O mecanismo de ação do SMX envolve prevenir a formação de ácido dihidropteróico, que conseqüentemente inibe a dihidropteroato sintase e o crescimento bacteriano (BHATTACHARJEE, 2016; WANG E WANG, 2018). O trimetoprim (TMP) é um antibiótico sintético da classe trimetopríma, que possui um efeito bacteriostático contra espécies de bactérias gram-negativas. Este atua na inibição da dihidrofolato redutase, atuando nas etapas da síntese do DNA (GUIMARÃES et al., 2010).

Comumente, ambos os antibióticos são coadministrados para tratar infecções urinárias, otites, bronquite crônica e outras infecções. Em relação ao SMX, cerca de 84,5% são excretados na urina, sendo cerca de 30% em sua forma inalterada. E em relação ao TMP, cerca de 80% é excretado de forma inalterada (DRUGBANK, 2022).

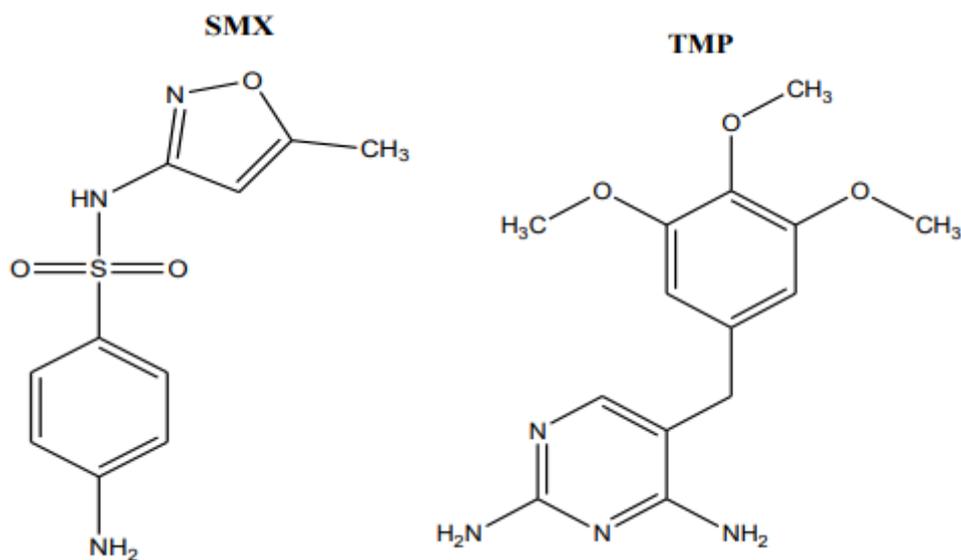
Segundo Zuccato et al. (2010) e Kummerer (2009), esses compostos excretados que não são metabolizados chegam às ETEs, que não são projetadas para tratar esses micropoluentes, e acabam contaminando os resíduos, águas superficiais e subterrâneas. Os antibióticos administrados ao gado podem ser dispersos através do estrume, atingindo o solo e as águas subterrâneas e os utilizados na agricultura e piscicultura podem acumular-se no solo ou sedimentos. Contudo, apesar das diversas vias de dispersão, as ETEs são consideradas os principais meios e, por conta disso, é de extrema importância o desenvolvimento de tratamentos eficazes para degradação destes compostos.

Tabela 1: Níveis de ocorrência de sulfametoxazol e trimetoprim em efluentes de ETEs e em águas de rios da Ásia, Europa e América

Composto	Faixa de concentração (ng·L ⁻¹)					
	Ásia		Europa		América	
	Efluente	Rios de	Efluente	Rios de	Efluente	Rios de
	Taiwan,	água	Espanha,	água	EUA,	água
	Índia,	doce	França	doce	Brasil	doce
	Malásia	Vietnã,		Espanha,		EUA,
		Malásia		Rep.		Brasil
				Tcheca		
Sulfametoxazol	3 – 5.823	4.330	100 –	33	310	250
			6.300			
Trimetoprim	1 – 4.010	1.808	100 –	59,9	2.550	145
			3.800			

Fonte: Adaptado de Bsognin et al. (2018)

Figura 1: Fórmula química estrutural dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim



Fonte: Adaptado de Guimarães et al. (2010)

1.2 Remoção de fármacos em sistemas de tratamento de esgoto

As estações de tratamento de esgoto atuais são projetadas para reduzir a carga de poluentes orgânicos e, eventualmente, nutrientes e microrganismos patogênicos. Não

foram projetadas para remover micropoluentes que, em sua maioria, permanecem inalterados após passarem pelos processos biológicos empregados como principal tecnologia (AQUINO et al., 2013; LENG et al., 2019). Segundo Aquino et al. (2013), os mecanismos responsáveis pela remoção de fármacos nas ETEs são:

- i) Sorção: onde ocorre o fenômeno de transferência de massa no qual moléculas passam de uma fase fluida (líquida ou gasosa) e tornam-se associados a uma fase sólida ou líquida. No caso dos fármacos e desreguladores endócrinos, está relacionado às interações dos grupos alifáticos e aromáticos dos poluentes da fase líquida com a membrana celular lipofílica dos microrganismos presentes na biomassa (lodo) ou com as frações lipídicas dos sólidos suspensos. A sorção pode ser determinada pelo coeficiente de distribuição ou de partição sólido-líquido (K_d). Valores de $\log K_d$ maiores que 2,7 apontam alta tendência de sorção, $\log K_d$ entre 2,0 e 2,7 indicam baixa tendência, enquanto valores abaixo de 2,0 apontam uma tendência quase nula.
- ii) Transformações biológicas: é um processo limitado do ponto de vista cinético, uma vez que as concentrações dos fármacos no esgoto bruto são baixas. Uma das transformações mais importantes é a biodegradação, que pode ser estimada pela constante de biodegradabilidade (K_{bio}).
- iii) Fotodegradação ou fotólise: processo de degradação que ocorre de forma direta, quando o micropoluente é degradado diretamente quando exposto à radiação UV, ou indireta, quando moléculas presentes no meio são excitadas pela radiação UV formando radicais livres que podem reagir com os microcontaminantes, degradando-os.
- iv) Volatilização: este processo pode ser estimado pela constante da Lei de Henry adimensional (K'_H), em um sistema fechado, esta determina o equilíbrio entre as moléculas dissolvidas na fase líquida com aquelas presentes na fase. Tal processo é significativo somente para compostos que apresentam $K'_H > 10^{-4}$.

Existem algumas tecnologias terciárias de tratamento de esgoto disponíveis para remover de forma mais eficaz esses fármacos. Na Tabela 2 tem-se os principais tratamentos, suas vantagens e desvantagens. Porém, a maioria das ETEs não empregam tais tecnologias devido à demanda de altos custos de investimentos e por apresentarem uma operação mais complexa que os processos biológicos empregados (IWA, 2010).

Tabela 2: Principais tecnologias terciárias de tratamento de fármacos

Tratamento	Agente	Vantagens	Desvantagens
Cloração	Gás cloro, hipoclorito e dióxido de cloro	Baixa carga de matéria orgânica nos antibióticos.	Subprodutos cancerígenos
Ozonização	Ozônio	Mais eficaz que o processo de cloração; Indicada quando a composição e a vazão do efluente variam.	Alto custo; Alto gasto de energia.
Fenton e foto-fenton	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , H ₂ O ₂ e UV	Processo simples; Alta eficiência de degradação; Abundância de ferro na crosta terrestre.	Estreita faixa de pH em que a eficiência de degradação é máxima.
Fotólise e fotocatalise	Luz (artificial ou natural)	Mais econômico	Aplicável apenas a fontes de água com compostos fotossensíveis e de baixo DQO
Processos eletroquímicos	Âodos como TiO ₂ , grafite, ligas à base de Ti, óxidos de Ru e Ir, eletrodos de diamante dopados com boro (BDD) e ânodos dimensionalmente estáveis.	Altamente eficiente	Alto custo
Adsorção	Biochar, argilominerais, carvões ativados, nanotubos de carbono, nanotubos de carbono de paredes múltiplas e bentonita.	Baixo custo; Alta eficiência; Sem risco de subprodutos perigosos.	Dificuldade do processo de remoção e concentração dos adsorventes utilizados.

Fonte: Chaturvedi et al. (2021)

Atualmente, a biorremediação utilizando microalgas tem sido relatada como um método promissor para o tratamento terciário de efluentes municipais e industriais, pois no cultivo destas há um potencial para fixação de CO₂, remoção de contaminantes, absorção de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo e ainda há a produção de uma biomassa potencialmente valiosa (LENG et al., 2019; SU, 2021). A tecnologia com microalgas também tem sido introduzida para efluentes contendo antibióticos e tem se mostrado eficaz na remoção destes fármacos (VILLAR-NAVARRO et al., 2018; DIAS et al., 2019).

1.3 Microalgas

O termo microalgas é comumente referido a grupos de microrganismos protistas e à classe das cianobactérias, que possuem pigmentos fotossintéticos em sua composição celular. São organismos microscópicos, unicelulares e podem estar presentes no solo e meios aquáticos. Fisiologicamente englobam tanto espécies eucarióticas quanto procarióticas e podem variar em tamanho e morfologia (SCHMITZ et al., 2012). São compostas basicamente por proteínas, carboidratos, vitaminas e lipídios (SPOLAORE et al., 2006). Esta composição pode variar de acordo com as espécies e com as condições de cultivo, como a intensidade da luz, temperatura, nutrientes, agitação, pH e fase de crescimento (MIAO e WU, 2004).

As microalgas eucarióticas são mais abundantes e assumem uma predominância maior. Neste grupo, destacam-se três classes: as algas verdes (*Chlorophyceae*), as algas douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*). As algas procarióticas incluem as cianobactérias (*Cyanophyceae*), que também são conhecidas por algas azul-esverdeadas (DEMIRBAS E DEMIRBAS, 2010).

Segundo Chen et al. (2011), há quatro tipos de metabolismo em que as microalgas podem crescer, foto-autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e foto-heterotrófico. Tais metabolismos serão explicados na seção 1.4.2 a seguir. No entanto, existem diversos fatores que influenciam o crescimento das microalgas. Estes podem ser divididos entre fatores abióticos, bióticos e operacionais. A Tabela 3 resume cada uma destas categorias.

Tabela 3 - Fatores que influenciam a taxa de crescimento das microalgas

Fatores	
Abióticos	Temperatura
	Intensidade luminosa e fotoperíodo
	Concentração de nutrientes
	Concentração de CO ₂ e O ₂
	Salinidade
	pH
	Substâncias inibidoras
Bióticos	Patogênicos (bactérias, fungos e vírus)
	Competição interespecífica
	Predação do zooplankton
Operacionais	Taxa de diluição
	Mistura
	Profundidade
	Adição de bicarbonato
	Frequência da colheita

Fonte: Adaptado de Larsdotter (2006)

Diversas são as aplicações biotecnológicas e industriais da biomassa das microalgas, como por exemplo, na alimentação animal e humana, indústria farmacêutica, química e cosmética (cremes anti-idades, regenerativos ou refrescantes), e em aplicações ambientais, como por exemplo, o tratamento de águas residuais, fixação de CO₂ e a produção de biocombustíveis (SPOLAORE et al., 2006; SCHERER, 2015). A Tabela 4 apresenta algumas aplicações comerciais da biomassa resultante do crescimento das microalgas.

Tabela 4 – Possíveis aplicações da biomassa de microalgas

Aplicações	
Lipídeos	Biodiesel
	Produtos farmacêuticos
Proteínas	Suplementos alimentares
	Alimentação animal
Carboidratos	Produtos farmacêuticos
	Suplementos alimentares
	Alimentação animal
	Químicos
	Bioetanol
	Bioplásticos
	Cosméticos
Pigmentos	Produtos farmacêuticos
	Suplementos alimentares
Vitaminas e Nutrientes	Biofertilizantes
	Antioxidantes

Fonte: Adaptado de Safi *et al.* (2014)

As microalgas do gênero *Monoraphidium* fazem parte da divisão Chlorophyta. A *Monoraphidium contortum* é um dos Chlorococcales mais comuns em corpos d'água continentais. A espécie pode ser encontrada em plânctons e perifítons de ambientes oligotróficos a eutróficos (RAMOS *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado a *Monoraphidium* promissora para diversas aplicações ambientais. Choi *et al.* (2023) identificaram o cultivo da espécie *M. contortum* em águas residuais da indústria de laticínios como uma boa alternativa para tratamento terciário desta, além da produção de uma biomassa viável para produção de biodiesel. El-Sheekh *et al.* (2023) identificaram a *Monoraphidium braunii* como eficiente na remoção de nutrientes, metais pesados e minerais. Kuravi e Mohan (2022) também obtiveram boa eficiência de remoção de nutrientes (85% de nitrato e 60% de fosfato) ao cultivar *Monoraphidium sp* em um fotobiorreator com águas residuais sintéticas de laticínios. Ricky e Shanthakumar (2023) estudaram a remoção de ciprofloxacina e norfloxacina através do cultivo de *Monoraphidium sp.* e obtiveram remoções de 23,8% e 76,3% respectivamente. Bogen (2013) identificou a *Monoraphidium contortum* como uma

espécie promissora para a produção de biocombustíveis devido ao alto teor de lipídios na biomassa produzida e do perfil de ácidos graxos desta.

1.4 Tecnologias de tratamento baseadas no cultivo de microalgas

1.4.1 Sistemas de cultivo de microalgas

As tecnologias de tratamento baseadas no cultivo de microalgas podem ser realizadas em dois tipos de configuração: sistemas abertos ou fechados.

Os sistemas abertos incluem as lagoas (*open ponds*), *raceways* e tanques. É um sistema mais robusto e com operação mais simples. Assim, tem como vantagem o baixo custo de operação e baixa demanda energética, sendo utilizados em locais com disponibilidade de energia solar. Porém, para esses cultivos, a necessidade de controle dos fatores externos é maior, além de demandar maior área de cultivo (KLIGERMAN E BOUWER, 2015; YIN et al., 2020).

Os sistemas fechados são conhecidos como fotobiorreatores (PBRs) e podem ser do tipo tubular ou plano. São mais sofisticados, com uma taxa produtiva superior aos sistemas abertos e não demandam uma grande área de cultivo. Os PBRs oferecem uma melhor condição de controle do cultivo, sendo mais fácil acompanhar e corrigir os parâmetros em comparação com os sistemas abertos. Como desvantagem, são mais complexos, exigem um consumo energético maior e, conseqüentemente, apresentam um custo mais elevado (CHEN et al., 2011; YIN et al., 2020). Exemplos destes dois sistemas podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2: (a) Raceway pond, (b) Fotobiorreator plano, (c) Fotobiorreator tubular



Fonte: Shen et al. (2009)

1.4.2 Assimilação de nutrientes utilizando microalgas

Diversas espécies de microalgas foram testadas para avaliar a remoção de nutrientes e produção de biomassa em vários tipos de águas residuais, incluindo municipal, agrícola, de aquicultura e industrial (PENG et al., 2019). A eficiência da biorremediação com microalgas está relacionada à capacidade de absorção de nutrientes destas, sendo assim, é interessante entender os mecanismos que envolvem estes processos (SU, 2021).

As microalgas são compostas em cerca de 50% por carbono, por isso, este é um nutriente importante no crescimento destas (CARVALHO et al., 2006). Segundo Chen et al. (2011), os quatro tipos de metabolismos que as microalgas podem crescer são:

- Foto-autotrófico: onde a fonte de energia é proveniente da luz e como fonte de carbono utilizam carbono inorgânico (por exemplo, CO_2 e bicarbonato - HCO_3^-). A produção de energia química é realizada através da fotossíntese;
- Heterotrófico: utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e a respiração celular para obter energia;
- Mixotrófico: utilizam carbono orgânico e inorgânico como fonte de carbono, variando de acordo com a concentração de compostos orgânicos e da luz disponível; estes organismos podem viver sob ambas as condições, auto e heterotróficas;
- Foto-heterotrófico: neste caso, os microrganismos utilizam a luz para processar os compostos orgânicos usados como fonte de carbono.

O nitrogênio (N) é outro tipo de nutriente assimilado pelas microalgas. As maiores contribuições para o aumento deste nutriente nos corpos aquáticos se baseiam nas atividades agrícolas, através do uso de fertilizantes nitrogenados e dejetos de origem animal; no esgoto sanitário e nas indústrias, devido aos NO_x oriundos da queima de combustíveis fósseis e possíveis efluentes líquidos (HUANG et al., 2018).

As fontes inorgânicas desse composto são o nitrato (NO_3^-), o nitrito (NO_2^-), o amônio (NH_4^+), o amoníaco (NH_3) e o nitrogênio gasoso (N_2). O N é encontrado em diversas substâncias biológicas importantes, como enzimas, peptídeos, clorofila, moléculas de ATP e ADP e material genético (DNA e RNA). O nitrato é a fonte que está em predominância no meio aquático, sendo a forma mais oxidada e estável termodinamicamente. Assim, é o mais assimilado pelas microalgas. Porém, o amônio é a forma preferencial desses microrganismos, uma vez sua assimilação não necessita de uma

reação redox e exige menos energia. (CAI et al., 2013). A fixação de N_2 atmosférico também pode ser realizada por algumas microalgas procariotas (cianobactérias) que o convertem em formas que podem ser assimiladas (LARSDOTTER, 2006).

Em relação ao fósforo (P), este se apresenta de forma solúvel e/ou insolúvel no ecossistema. A forma solúvel, inorgânica, é caracterizada pela presença de íons livres de ortofosfato (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^-$), enquanto o fósforo insolúvel abrange os tipos orgânicos, adsorvido e mineral. Através da mineralização, erosão e descarga de resíduos, o fósforo atinge os corpos aquáticos. Este ciclo é considerado praticamente unidirecional, dado a cinética extremamente lenta desde composto. (DANESHGAR et al., 2018; SASABUCHI et al., 2022).

A assimilação do fósforo acontece através do processo de fosforilação, onde os compostos disponíveis são incorporados em componentes orgânicos. Esse processo envolve a geração de ATP, onde a energia requerida é originada da respiração celular ou da luz, quando há fotossíntese. O fósforo pode ser encontrado em ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, sendo assim um nutriente essencial no metabolismo das microalgas (CAI et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado a eficiência do cultivo de microalgas para a remoção de nitrogênio e fósforo. Alguns exemplos podem ser vistos na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Estudos de remoção de nitrogênio e fósforo através do cultivo de microalgas

Microalga	Parâmetros do cultivo	Remoção	Referência
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Águas residuais urbanas; 3 dias; 530 L HRAP;	65,1% de N 58,8% de P	Arbib et al., 2013
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Águas residuais de laticínios; 0,5 dias	97,5% de N 51,7% de P	Huo et al., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	Urina humana diluída; Fotobiorreator de membrana	77,3 % N 53,2 % P	Nguyen et al., 2021
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Urina humana diluída	36% de N 100% de P	Chatterjee et al., 2019
<i>Scenedesmus sp.</i>	Águas residuais domésticas secundárias; 7,6 dias;	79% de N 57% de P	Posadas et al., 2015
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Urina humana diluída; Semi-continuous mode	52% de N 38% de P	Dittami et al., 2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	Águas residuais domésticas do tanque de sedimentação; 48 L PBR; 1,5 dias	78,4% de N 88,5% de P	Choi e Lee, 2015
<i>S. obliquus</i>	Águas residuais de pocilgas diluídas e digeridas; 48 L PBR; 1,8 dias	74,6% de N 81,7% de P	Xu et al., 2015

Fonte: Autora (2024)

1.4.3 Mecanismos de remoção de MPEs utilizando microalgas

A remoção de micropoluentes, incluindo os antibióticos, pelas microalgas depende de fatores como: a espécie das microalgas, estruturas químicas e concentrações

do poluente, além das condições do meio de crescimento (LENG et al., 2019). Os principais mecanismos, segundo Hena et al. (2021), pelos quais ocorre a remoção se baseiam na bioadsorção, bioacumulação, biodegradação e fotodegradação.

A bioadsorção é um mecanismo passivo e rápido em que as partículas do micropoluentes se adsorvem na parede celular das microalgas ou nas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) excretadas por estas. O processo ocorre devido à interação hidrofóbica ou iônica entre os poluentes e a superfície adsorvente (FOMINA E GADD, 2014). A bioadsorção dos micropoluentes depende da sua estrutura, hidrofobicidade, grupo funcional na superfície e espécies de microalgas. As microalgas e EPS, em sua maioria, possuem uma carga superficial negativa e é o que favorece as interações com compostos carregados positivamente (HENA et al., 2021). A bioadsorção foi o mecanismo de remoção detectado por Hena et al. (2020) ao cultivarem *C. vulgaris* com 5 µM de metronidazol. Neste estudo, 100% desse fármaco pode ser removido.

A bioacumulação é um mecanismo ativo com consumo de energia. Comparado à bioadsorção, é um processo mais lento, onde após a adsorção na parede celular, alguns compostos são acumulados internamente nas células das microalgas através de canais iônicos ou vias de difusão na membrana celular. Os polissacarídeos são compostos mais comumente armazenados dentro da célula microalgal durante a fotossíntese (YU et al., 2017; HENA et al., 2021). Sun et al. (2017) ao analisarem a remoção de sulfametazina através do cultivo de *C. pyrenoidosa*, identificaram a bioacumulação como um dos principais mecanismos de remoção, juntamente com a biodegradação.

A biodegradação é uma degradação metabólica, onde as microalgas transformam compostos complexos em compostos mais simples através da liberação de enzimas. Pode envolver várias reações como hidrogenação, desidrogenação, hidroxilação, carboxilação, hidrólise, desmetilação, entre outras (PENG et al., 2014; MATAMOROS et al., 2016). É um dos mecanismos de remoção mais frequentemente detectado. Foi detectada por Garcia-Rodríguez et al. (2013) na remoção de sulfatiazol por *Spyrogira sp.*, por Yu et al. (2017) na remoção de ceftazidima através da microalga *C. pyrenoidosa* e por Song et al. (2019) na remoção de florfenicol por *Chlorella sp.*

A fotobiodegradação é um mecanismo que pode acontecer no cultivo de microalgas na presença de radiação UV. Neste processo, com a exposição à luz, algumas microalgas liberam substâncias fotossensibilizadoras que participam da geração de radicais livres como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ou radical peroxil ($\text{ROO}\bullet$). Estes radicais têm potencial para degradar as substâncias contaminantes presentes no meio (HENA et al.,

2021). Este mecanismo foi identificado por Yang et al. (2017) na remoção do antibiótico cefradina através da microalga *S. obliquus* na presença de radiação UV.

Com a presença de radiação UV, também pode ocorrer a fotólise direta no meio, em que algumas partículas do micropoluinte absorvem diretamente a radiação e, eventualmente, quebram sem o envolvimento das microalgas (CHALLIS et al., 2014).

Com a necessidade de desenvolvimento de tecnologias de tratamento terciário de efluentes, as tecnologias baseadas na biorremediação pelo cultivo de microalgas estão sendo amplamente utilizadas, também com a finalidade de avaliar a remoção de antibióticos em águas residuárias (LENG et al., 2019). Diversos estudos têm mostrado a eficiência destes tratamentos.

Xiong et al. (2017) avaliaram a remoção de enrofloxacina por cinco diferentes espécies de microalgas: *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas mexicana*, *Chlorella vulgaris*, *Ourococcus multisporeus*, *Micractinium reisseri*, e obtiveram uma taxa de remoção entre 18 e 26%. Kiki et al. (2020) avaliaram o potencial de biorremediação das microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlorella vulgaris* em um mix de 10 antibióticos, entre eles sulfametoxazol e trimetoprim, e a média de remoção destes foram iguais a 74 e 37%, respectivamente. E a remoção do sulfametoxazol e trimetoprim também foi investigada por Bai e Acharya (2017), que avaliaram a biorremediação com a microalga *Nannochloris* sp. e encontraram valores de remoção de 10 e 40%, respectivamente. Outros exemplos de estudos relacionados à biorremediação de fármacos podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6: Estudos da biorremediação de antibióticos através do cultivo de microalgas

Micropoluente	Microalga	Parâmetros	Remoção	Referência
Oxitetraciclina	<i>Chlorella sorokiniana</i>	BG-11 medium, 24h de luz, 25 °C, por 7 dias	>99%	Wu et al., 2022
Carbamazepina Trimetoprima	<i>Chlorella sorokiniana</i>	300 mL do meio (água marrom e urina); 35°C, por 31 dias	30% 60%	Wilt et al., 2016
Tetraciclina Sulfatiazol Ciprofloxacina	<i>Chlorella sorokiniana</i>	50 mgL ⁻¹ de TET, STZ e CIP; BG-11 medium; 2 dias.	93% 30% 65%	Chu et al., 2023
Cefazolina	<i>Chlorella vulgaris</i>	100-300 mgL ⁻¹ de CFZS; 96 horas;	30%	Rezaee et al., 2023
Sulfametoxazol	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	BG-11 medium; 5 mgL ⁻¹ de SMZ; 16 dias	49%	Huang et al., 2023
Sulfametoxazol e Trimetoprim	Bactérias e as microalgas (<i>Tetradesmus obliquus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Pseudanabaena sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i> e <i>Nitzscha sp.</i>)	Efluente sintético	>80%	Ruas et al., 2022
Trimetoprim	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella saccharophyla</i> <i>Coelastrum astroideum</i>	12 dias	3% 33% 21%	Gojkovic et al., 2019

Sulfametoxazol	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Meio Bold; 12 dias; 0,25 mgL ⁻¹ de SMX	46,8%	Xiong et al., 2019
----------------	-----------------------------	---	-------	--------------------

Sulfametazina	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Meio Bold; 12 dias; 0,25 mgL ⁻¹ de SMZ	62,3%	Xiong et al., 2019
---------------	-----------------------------	---	-------	--------------------

Sulfametazina	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	13 dias	69%	Sun et al., 2017
---------------	------------------------------	---------	-----	------------------

Fonte: Autora (2024)

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 Hipóteses

- 1) A microalga *Monoraphidium contortum* pode ser cultivada e se multiplicar em água residuária contendo os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim.
- 2) A tecnologia utilizando fotobiorreatores contendo a microalga *Monoraphidium contortum* acoplada ao tratamento terciário, é promissora na biorremediação dos antibióticos selecionados.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é investigar a biorremediação dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim utilizando a microalga *Monoraphidium contortum* associada ao tratamento terciário de efluentes domésticos.

2.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito inibitório dos antibióticos isolados sulfametoxazol e trimetoprim, e da mistura de ambos no crescimento da biomassa da microalga *Monoraphidium contortum*;
- 2) Analisar a performance da microalga em fotobiorreator e o potencial de biorremediação desta em meios de cultivo contendo os antibióticos selecionados;
- 3) Avaliar a composição da biomassa de *Monoraphidium contortum* após o crescimento desta nos diferentes meios de cultivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A microalga *Monoraphidium contortum* CCMA-UFSCar 701 utilizada neste estudo foi isolada de área de mangue do Parque Estadual da Serra do Mar (Ubatuba, S.P.) (MATSUDO et al., 2021), e mantida em meio Bold (meio padrão) à 25°C e 40 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para manutenção da viabilidade celular.

Foram realizados seis cultivos em fotobiorreatores tubulares em triplicata, variando-se os meios utilizados e os antibióticos utilizados.

O fotobiorreator tubular do presente estudo, que pode ser visto na Figura 3, foi construído de acordo com Ferreira et al. (2012). Este é constituído por 20 tubos de vidro transparente (comprimento de 50,0 cm e diâmetro interno de 1,0 cm), com inclinação de 2% (1,15°) a fim de favorecer o escoamento do líquido. Os tubos são interligados com mangueiras de silicone de mesmo diâmetro interno, de forma que o volume iluminado corresponde a 1,26 L. O volume total do sistema é de 2,5 L. Na parte mais baixa dos tubos do reator há um tubo na forma de T, onde ocorre a entrada de ar comprimido para promover o deslocamento da suspensão celular para um frasco na parte superior. Neste frasco, há uma pedra porosa acoplada a uma mangueira de diâmetro interno de 4 mm no qual ocorre entrada de CO_2 para manutenção de pH do meio ($7,0 \pm 1,5$). A injeção de CO_2 é controlada por um temporizador que, quando acionado, abre uma válvula solenoide acoplada ao sistema. Lâmpadas fluorescentes de 18 watts foram utilizadas para fornecer luz na intensidade de $80 \pm 5 \mu\text{mol}$ fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 3 - Fotobiorreator tubular tipo Air-lift em escala laboratorial



Fonte: Autora (2024)

3.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, cerca de 20 mL da suspensão celular foi adicionada a frascos de Erlenmeyer, contendo 180 mL do mesmo meio de cultura estéril (Meio Bold - Bold 1NV Medium esterilizado; UTEX s.d.). Os detalhes para o preparo do meio Bold podem ser vistos no Anexo 1. Os frascos foram agitados (150 RPM) sob intensidade luminosa de aproximadamente $40 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2 \text{s}^{-1}$, temperatura de 25°C e pH inicial de $7,0 \pm 0,5$. Ap\u00f3s cerca de uma semana, o in\u00f3culo ainda em fase de crescimento exponencial era utilizado para os experimentos nos fotobiorreatores.

3.2 Quantifica\u00e7\u00e3o da Biomassa

Para avaliar a concentra\u00e7\u00e3o de biomassa de microalgas no in\u00f3culo e posteriormente nos cultivos em fotobiorreator, foi constru\u00edda uma curva de calibra\u00e7\u00e3o para a microalga, correlacionando absorb\u00e2ncia (550nm, Becker, 2004) e concentra\u00e7\u00e3o de biomassa (massa seca). A massa seca foi determinada gravimetricamente em filtros com di\u00e2metro de poros de $1,2 \mu\text{m}$.

3.3 Cultivo de *Monoraphidium contortum* em fotobiorreator tubular

3.3.1 Cultura de *Monoraphidium contortum* em meio Bold

Volumes de suspens\u00e3o das cepas de *Monoraphidium contortum* foram transferidos para fotobiorreatores tubulares do tipo air-lift, com volume total de 2,5 L. Os cultivos foram conduzidos \u00e0 temperatura de 25°C , com valor de pH mantido em $7,0 \pm 1,5$, por meio da adi\u00e7\u00e3o de CO_2 puro proveniente de cilindro, e a intensidade luminosa de $80 \mu\text{mol f\u00f3tons}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (P\u00c9REZ-MORA, 2016).

Foram realizados cinco cultivos no meio Bold: cultivo padr\u00e3o (MB), com sulfametoxazol (MB com SMX), com trimetoprim (MB com TMP), com sulfametoxazol e trimetoprim concomitantes (MB com SMX e TMP) e um frasco em condi\u00e7\u00e3o abi\u00f3tica, apenas com meio Bold e antibi\u00f3tico, a fim de analisar a possibilidade de fotodegrada\u00e7\u00e3o. A concentra\u00e7\u00e3o dos antibi\u00f3ticos utilizada neste experimento foi de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foi considerada uma concentra\u00e7\u00e3o de n\u00e3o inibi\u00e7\u00e3o em estudos anteriores do grupo de pesquisa (NOGUEIRA E MATSUDO, 2022).

Diariamente, a concentra\u00e7\u00e3o celular foi determinada por turbidimetria, a 550nm, conforme descrita na se\u00e7\u00e3o anterior. Ap\u00f3s o cultivo, as amostras colhidas foram separadas por centrifuga\u00e7\u00e3o, a biomassa foi destinada para an\u00e1lise da sua composi\u00e7\u00e3o e o

sobrenadante a fim de analisar a porcentagem de remoção dos antibióticos. O crescimento das microalgas foi avaliado em termos de Concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$) e, para analisar a eficiência do processo, foi calculada a Produtividade em biomassa (P_x), de acordo com a Equação (1).

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_{inicial}}{tempo} \quad (1)$$

3.3.2 Cultura de *Monoraphidium contortum* em efluente sintético

Para estes experimentos, foi preparado um efluente sintético de acordo com Xu et al. (2014), cuja composição pode ser vista no Anexo 2, e analisado dois cultivos diferentes em fotobiorreator tubular: cultivo controle (a microalga apenas em efluente sintético - MS) e cultivo com sulfametoxazol (MS com SMX). Esses experimentos foram conduzidos nas mesmas condições dos experimentos no meio Bold, exceto pelo meio de cultivo.

3.4 Quantificação da remoção dos antibióticos por HPLC-UV

As análises quantitativas dos antibióticos selecionados foram realizadas usando um sistema de cromatografia modelo Agilent Infinity 1260, composto por uma bomba quaternária, um injetor automático, um módulo de aquecimento de coluna e um detector ultravioleta com arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C8 (4.6 mm × 250 mm - 5 mm) mantida a uma temperatura de 40 °C.

Conforme Cavazos-Rocha, et al. (2007), as amostras foram eluídas com uma fase móvel composta por água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético – TFA (solvente A) e acetonitrila (solvente B), o gradiente usado pode ser visto na Tabela 7. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL·min⁻¹, volume de injeção foi de 10 µL e o comprimento de onda DAD foi definido em 265 nm para os analitos.

Tabela 7: Gradiente utilizado para a eluição dos antibióticos

Tempo (min)	TFA 0,1%	Acetonitrila
1	92	8
4	92	8
14	73	27
24	73	27
26	92	8
30	92	8

Fonte: Adaptado de Cavazos-Rocha, et al. (2007)

3.5 Análise da remoção de nitrogênio

A fim de avaliar a eficiência das microalgas para a remoção de compostos inorgânicos indesejados, foi feita a quantificação de nitrogênio nas amostras iniciais e finais de cada cultivo. Foi possível determinar a concentração de nitrato e nitrito de acordo com os protocolos a seguir.

- Análise de nitrato segundo o Protocolo 4500 (NO_3^-) A e B (APHA, 2005).

As amostras foram previamente filtradas, através de um filtro de membrana de fibra de vidro de 0,45 micras (μm), para eliminação da matéria orgânica em suspensão e para evitar a oxidação do nitrato. Posteriormente, foram acidificadas com ácido clorídrico (HCl) $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, a fim de evitar a interferência de concentrações de hidróxido ou carbonato de cálcio ($CaCO_3$) de até $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Foi medida a absorção do nitrato a 220 nanômetros (nm) e para eliminar a possível interferência de matéria orgânica residual, uma segunda absorção a 275 nm foi necessária para corrigir o valor de nitrato (APHA, 2005).

- Análise de nitrito segundo USP/CARMOUZE (1994).

Esta análise é baseada em um método espectrofotométrico após reação em meio fortemente ácido. Neste método, foi adicionado HNO_2 (Ácido Nitroso) e $C_6H_8O_2N_2S$ (sulfanilamida) para reagir e formar um composto diazônico. Posteriormente, $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$ (bicloridrato) foi adicionado, onde houve a formação de um composto de coloração rosa. Assim, foi medida a absorbância por leitura em espectrofotômetro a 543 nm. (MACKERETH et al., 1978; CARMOUZE, 1994).

3.6 Análise da composição bioquímica da biomassa obtida

Após a centrifugação e a secagem, foram quantificados os teores de lipídios totais e proteínas totais das biomassas obtidas em cada cultivo. A fração lipídica ainda foi submetida à determinação da composição de ácidos graxos. Os métodos utilizados estão descritos a seguir.

3.6.1 Quantificação de lipídios totais

Para a quantificação dos lipídios totais foi feita a extração deste com solventes orgânicos, nesse caso clorofórmio e metanol (2:1 v/v), de acordo com a metodologia de Soxhlet (PELIZER et al., 1999).

3.6.2 Quantificação de proteínas totais

Após a extração e quantificação dos lipídeos totais, a quantificação de proteínas totais foi feita com a biomassa desengordurada submetida ao método Kjeldahl. Foi utilizado 6,25 como fator de conversão após determinados os teores de nitrogênio total (AOAC, 1984).

3.6.3 Determinação do perfil de ácidos graxos

Na determinação do perfil de ácidos graxos, a fração lipídica extraída na determinação do teor de lipídios totais foi recuperada em éter petróleo. Para a conversão dos ácidos graxos em seus correspondentes ésteres metílicos, segundo Hartman e Lago (1973), foi adicionado 3 mL de solução metanólica 0,5M KOH mantendo-se a 70 °C durante 5 minutos. Em seguida, houve a adição de 9 mL do reagente de esterificação (2g de NH₄Cl + 3mL de H₂SO₄ em 60mL de metanol) mantendo-se a 70 °C por 5 minutos. Em seguida, foi transferida para um funil de separação com 15mL de éter de petróleo e 30mL de água deionizada. Após agitação e separação das fases, a fase aquosa foi descartada. Foi feita a lavagem da fase orgânica (éter de petróleo) duas vezes com a adição de 15mL de água deionizada, agitando o meio e descartando a fase aquosa. A fase orgânica foi coletada e o solvente foi evaporado em banho-maria a 40 °C sob fluxo de corrente de nitrogênio. Os metil-ésteres de ácidos graxos foram recuperados em hexano e injetados no cromatógrafo a gás modelo 7890 (Agilent Technologies, EUA), equipado com detector de ionização de chama. Utilizou-se coluna capilar de sílica fundida

(Innowax) com 30m de comprimento, 0,25mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de polietilenoglicol dentro da coluna. As condições da análise segundo Pérez-Mora et al. (2016), foram:

- Injeção split: 20:1;
- Volume de injeção: 2 μ L;
- Temperatura da coluna: 75 °C por 1 min
- Rampa de aquecimento: 37.5° C/min até 150° C
1° C/min até 215° C
Manutenção de 215° C por 10 min
- Tempo total da corrida: 78 min
- Temperatura do injetor: 250° C
- Temperatura do detector: 280° C
- Gás de Arraste: Hélio, vazão de 1 mL/min
- Gás Make up + gás constante da coluna: Hélio a 30 mL/min

A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada comparando-se os valores dos tempos de retenção dos picos obtidos em padrões presentes em “37 Component FAME Mix” (Supelco).

3.7 Análise estatística

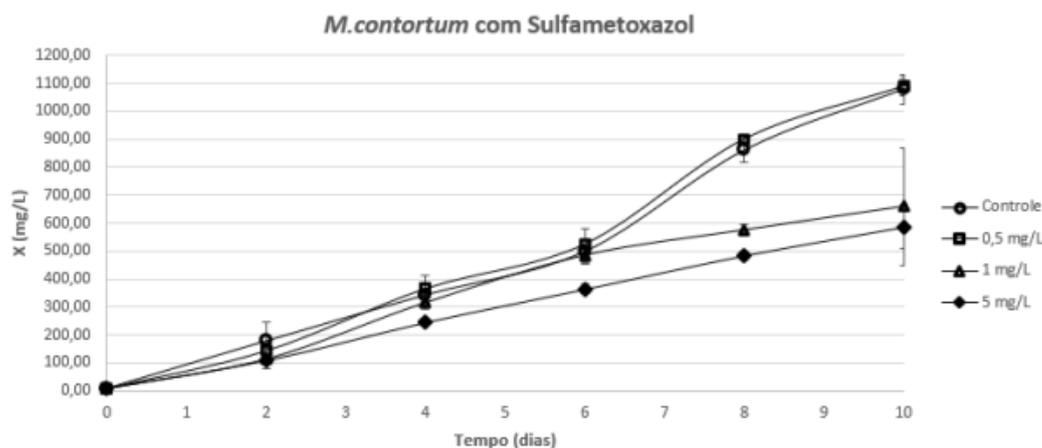
Os dados referentes à concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade de biomassa (P_x), teor de proteínas e teor de lipídios foram analisados utilizando a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey. O objetivo era determinar se havia diferenças estatísticas significativas nos resultados, influenciadas pelos distintos meios de cultura testados: Meio Bold, Meio Bold com SMX, Meio Bold com TMP, Meio Bold com SMX e TMP, Meio efluente sintético e Meio efluente sintético com SMX. A análise foi realizada no software Minitab 17, adotando-se um nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação da concentração inibitória dos antibióticos sobre a microalga.

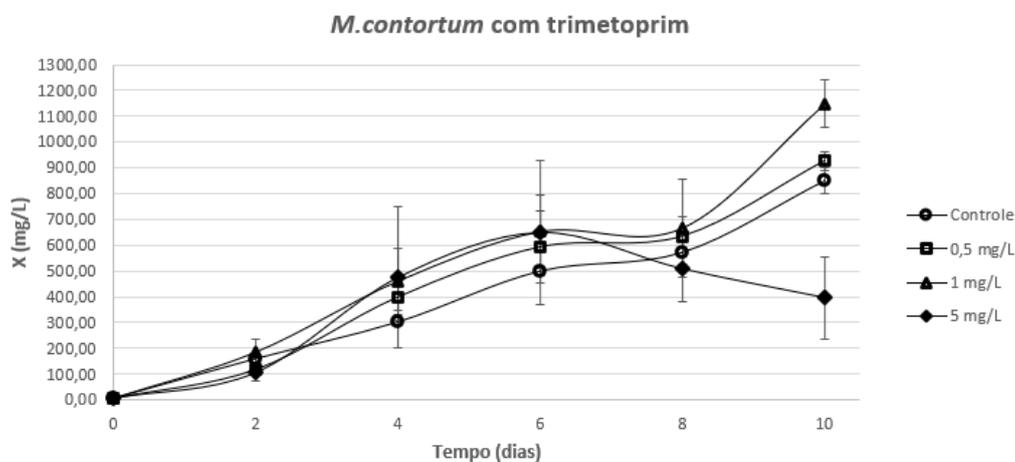
A análise de diversas concentrações do SMX e TMP sobre o crescimento da microalga *Monoraphidium contortum* foi feita previamente por Nogueira e Matsudo (2022) no laboratório de microbiologia aplicada, da Universidade Federal de Itajubá. Antes de avaliar a capacidade da microalga em degradar os antibióticos considerados contaminantes emergentes, foi preciso verificar a concentração a partir da qual estes antibióticos inibem o crescimento da microalga. Os resultados obtidos podem ser vistos nas Figuras 4 e 5 a seguir.

Figura 4: Crescimento da microalga *M. contortum* com SMX



Fonte: NOGUEIRA E MATSUDO (2022)

Figura 5: Crescimento da microalga *M. contortum* com TMP



Fonte: NOGUEIRA E MATSUDO (2022)

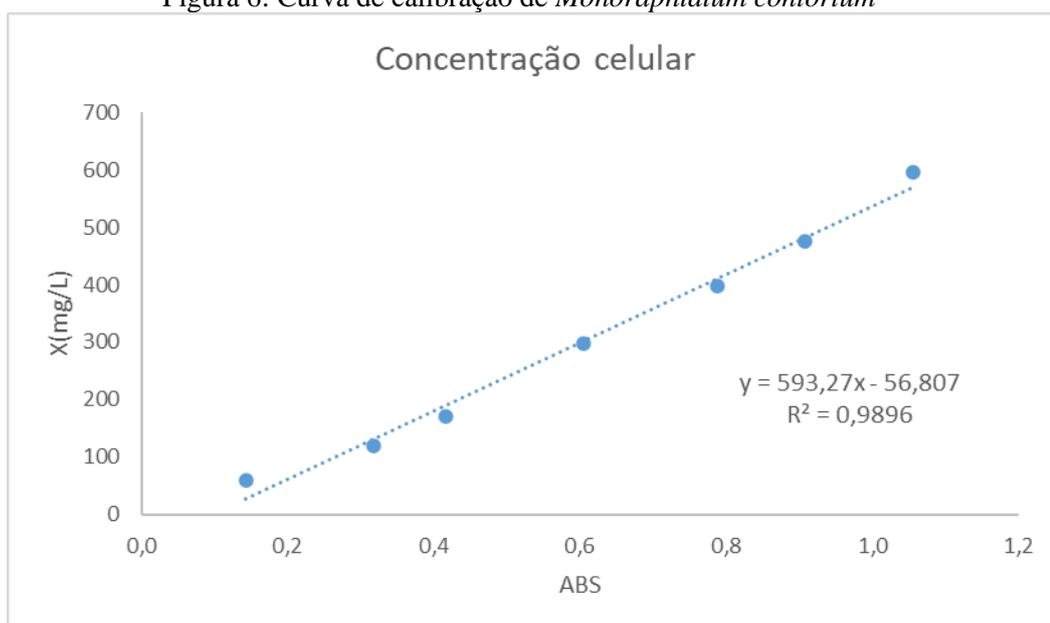
Observa-se que, para os cultivos com sulfametoxazol, a concentração inibitória foi a partir de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico, enquanto nos cultivos com trimetoprim foi a partir de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os resultados demonstram que concentrações altas de ambos os antibióticos podem realmente inibir o crescimento das microalgas, uma vez que o mecanismo de ação destes age danificando as estruturas celulares e organelas das microalgas (EGUCHI et al., 2004; ISIDORI et al., 2005). Em pesquisas anteriores, Eguchi et al. (2004) encontraram uma concentração inibitória (EC_{50} – redução de 50% do crescimento do cultivo em relação ao cultivo controle) de $1,53 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfametoxazol sobre o cultivo de *Selenastrum capricornutum*. Valitalo et al. (2017) também analisaram a concentração de trimetoprim sobre o crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* e encontraram o valor de $EC_{50} = 80,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Sendo assim, considerando os resultados obtidos por Nogueira e Matsudo (2022) foi empregada uma concentração subinibitória para ambos os antibióticos ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para os cultivos no fotobiorreator, a fim de garantir o crescimento da microalga *M. contortum* e a análise efetiva da capacidade de remoção de antibióticos desta.

4.2 Avaliação do crescimento da microalga *Monoraphidium contortum* em fotobiorreator tubular

A concentração celular da *Monoraphidium contortum* foi obtida a partir da curva de calibração que pode ser vista na Figura 6.

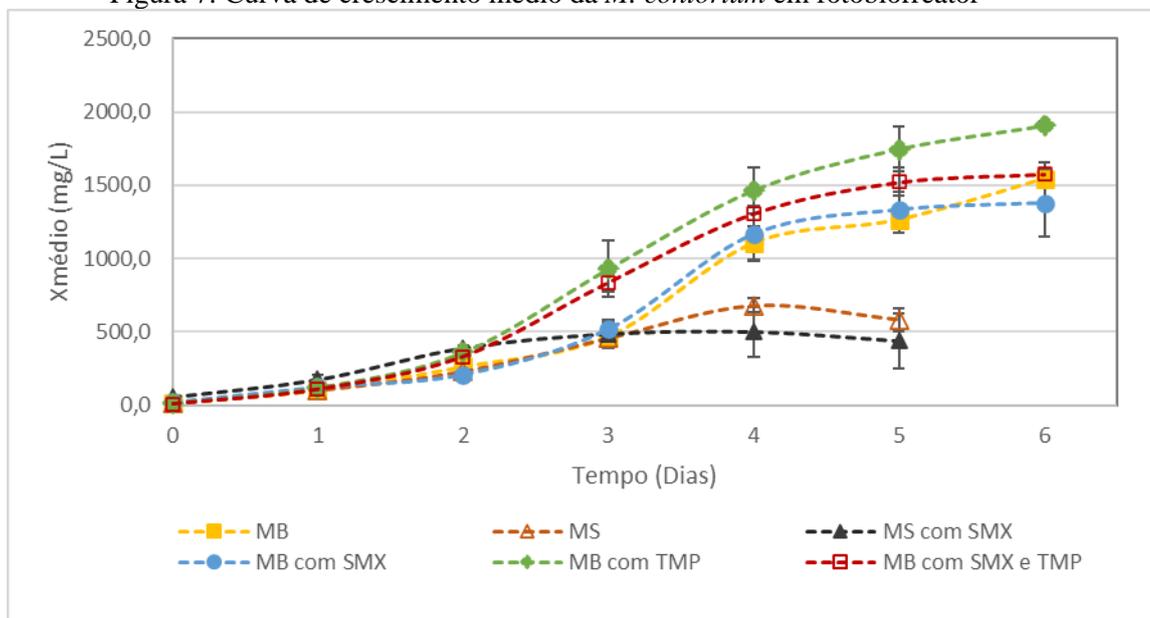
Figura 6: Curva de calibração de *Monoraphidium contortum*



Fonte: Autora (2024)

Com a média dos valores dos três reatores, tem-se os valores da concentração média em função do dia, como mostra a Figura 7. E os valores da Concentração máxima ($X_{m\acute{a}x}$) e Produtividade em biomassa (P_x) podem ser vistos na Tabela 8.

Figura 7: Curva de crescimento médio da *M. contortum* em fotobiorreator



MB – Meio Bold, MS – Meio Efluente Sintético, SMX – Sulfametoxazol, TMP - Trimetoprim

Fonte: Autora (2024)

Tabela 8: Concentração máxima ($X_{m\acute{a}x}$) e Produtividade em biomassa (P_x) para dos cultivos em fotobiorreator

Experimento	$X_{m\acute{a}x}$ [mg. L ⁻¹]	P_x [mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹]
Meio Bold	1544,53 ± 33,8 ^A	255,35 ± 5,63 ^A
Meio Bold com SMX	1410,31 ± 209,83 ^A	244,48 ± 14,14 ^A
Meio Bold com TMP	1909,21 ± 29,27 ^B	337,39 ± 41,39 ^B
Meio Bold com SMX e TMP	1576,96 ± 88,70 ^A	261,45 ± 14,78 ^A
Meio Efluente Sintético	683,05 ± 51,82 ^C	155,37 ± 23,14 ^C
Meio Efluente Sintético com SMX	535,76 ± 135,71 ^C	146,76 ± 14,04 ^C

*Média com letras iguais não diferem entre si estatisticamente. Fonte: Autora (2024)

Ao longo dos dias de cultivo, observa-se um crescimento significativo na biomassa de microalgas cultivadas em meio Bold. O padrão das curvas de crescimento foi consistente, onde até aproximadamente o dia 2 tem-se a fase lag de crescimento, do dia 2 ao dia 5 a fase exponencial e do dia 5 ao dia 6 a fase estacionária. Este

comportamento é semelhante à curva de crescimento da microalga *Chlorella sp* observada por Angulo et al. (2018), onde utilizaram esta para a biorremediação do antibiótico cefalexina.

O crescimento da biomassa microalgal em meio contendo baixas concentrações de antibióticos foi observado por Sun et al. (2017) em que estudaram a microalga *Chlorella pyrenoidosa* para remoção de sulfametazina e até $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico no meio não houve inibição do crescimento desta. O crescimento da microalga *Chlorella sp.* UTEX1602 na presença de florfenicol também não apresentou inibição até $46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ do antibiótico (SONG et al., 2019). Sendo assim, os resultados obtidos nos experimentos realizados em meio Bold estão de acordo com o esperado, onde não houve inibição no crescimento da microalga para concentrações dos antibióticos inferiores à $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Vale ressaltar que o crescimento efetivo da microalga em meios contendo antibióticos é de extremo interesse, uma vez que possuem altos teores de lipídeos em sua composição e, por conta disso, representam uma fonte potencialmente valiosa para a produção de biocombustíveis (ROY e MOHANTY, 2019).

Para os cultivos realizados no efluente sintético, observa-se que não houve um crescimento satisfatório comparado ao meio Bold e não se observa um padrão nas curvas de concentração. A análise de variância confirmou que o tipo de meio influencia o crescimento, havendo impacto nos valores de $X_{\text{máx}}$ e P_x ($p < 0,001$ para $X_{\text{máx}}$ e $p < 0,001$ para P_x). De acordo com Xiong et al. (2016) a diminuição na quantidade de nutrientes no meio é um dos principais fatores que levam a diminuição da taxa de crescimento das microalgas. Sendo assim, pode-se explicar o baixo crescimento da biomassa em efluente sintético, onde a concentração de nutrientes é menor que a concentração destes em meio Bold.

Observa-se que os maiores valores de concentração de biomassa ($1909,21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e produtividade em biomassa ($337,39 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$) foram obtidos para o experimento em meio Bold com concentração de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de trimetoprim. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de os antibióticos poderem atuar como fonte de carbono para as microalgas, ou também estimularem a expressão de genes relacionados à replicação do DNA, conseqüentemente, promovendo o crescimento da biomassa (ZHANG et al., 2020; JIANG et al., 2021; WU et al., 2022). Esse comportamento foi observado por Wu et al. (2022) em que a maior concentração de microalgas foi alcançada quando $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de oxitetraciclina foi adicionada ao cultivo. Ding et al. (2017) também obtiveram o melhor crescimento da microalga *Navicula sp.* com até $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ibuprofeno no meio. Por outro

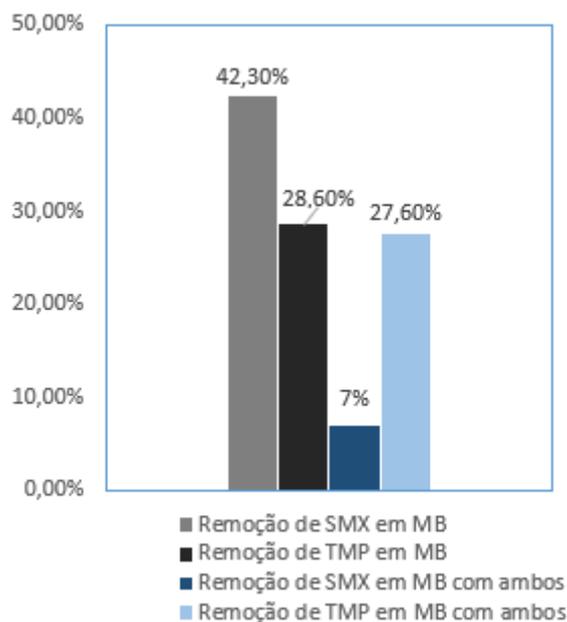
lado, considerando que, quando houve a adição simultânea dos dois antibióticos, o crescimento da microalga foi igual ao crescimento no meio padrão, pode-se inferir também que esse maior crescimento com adição de trimetoprim é resultado de uma variação biológica.

4.3 Quantificação da remoção dos antibióticos por HPLC-UV

Através da análise por HPLC-UV, foram obtidos os valores da concentração de antibióticos no início e final dos cultivos e, conseqüentemente, a porcentagem de remoção destes pelas microalgas. Os valores podem ser vistos na Figura 8.

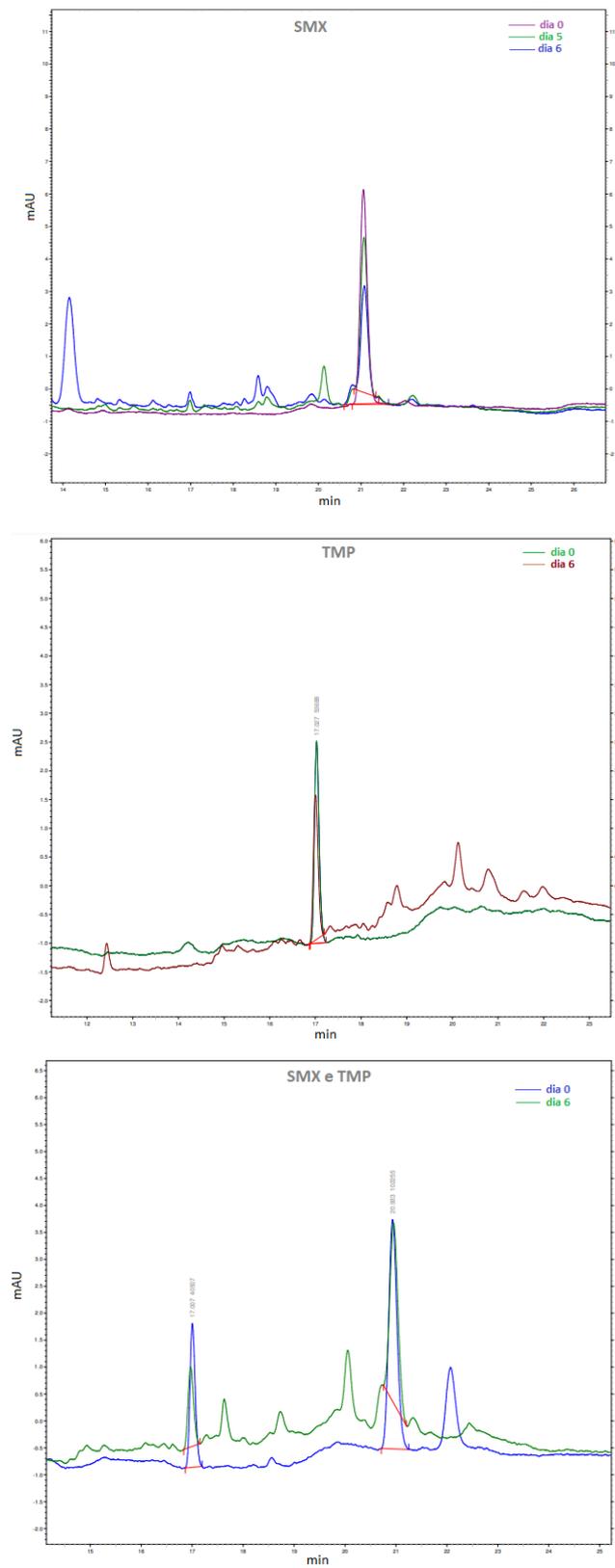
Alguns dos cromatogramas dos experimentos realizados podem ser exemplificados na Figura 9, onde o tempo de retenção do SMX foi aproximadamente 21 minutos e do TMP de 17 minutos.

Figura 8: Quantificação da remoção dos antibióticos no meio de cultivo



Fonte: Autora (2024)

Figura 9: Cromatogramas dos experimentos com SMX, TMP e SMX-TMP



Fonte: Autora (2024)

Primeiramente, para o experimento realizado em efluente sintético, não houve remoção do sulfametoxazol adicionado ao meio. Neste cultivo também não foi observado um crescimento expressivo da biomassa de microalgas. Como a remoção pode estar associada às enzimas de biodegradação, o crescimento deficiente do cultivo por conta da falta de nutrientes, e consequente não produção destas enzimas, pode justificar a não remoção de SMX. Por esse motivo, os demais ensaios de remoção foram realizados apenas nos cultivos em meio Bold.

Observa-se que houve remoção dos antibióticos para a maioria dos cultivos analisados. No cultivo em meio Bold com sulfametoxazol houve uma redução de 42,3% da concentração de SMX no final do experimento, enquanto no cultivo com trimetoprim houve 28,6 %. Quando o cultivo foi feito na presença de ambos os antibióticos, observa-se que houve uma diminuição na remoção de SMX (7% de remoção), enquanto a concentração removida de TMP permaneceu próxima à anterior (27,6%).

A remoção de sulfametoxazol foi analisada durante 12 dias por Xiong et al. (2019), onde obtiveram uma remoção de 46,8% através da microalga *Scenedesmus obliquus*. Gojkovic et al. (2019) estudaram a remoção de 19 fármacos distintos e, dentre eles, o trimetoprim obteve uma remoção de 3%, 33% e 21% nos cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella saccharophyla* e *Coelastrum astroideum*, respectivamente. A microalga *Chlorella sorokiniana* removeu cerca de 60% de trimetoprim após 31 dias de cultivo (WILT et al., 2016).

Os cultivos abióticos realizados apenas com meio Bold e com os antibióticos, não apresentaram uma diminuição na concentração dos antibióticos ao final dos experimentos. Assim, observa-se que não houve fotodegradação dos antibióticos ao longo dos dias analisados e a remoção apresentada nos demais experimentos está associada à presença da microalga no meio. Yu et al. (2017) ao analisarem a remoção de ceftazidima e 7-ACA na presença e ausência de algas verdes, também atribuíram a remoção dos fármacos ao tratamento biótico. Song et al. (2019) também constataram que a biodegradação, bioacumulação e bioadsorção, vias de remoção bióticas, foram identificadas na remoção de florfenicol por meio do cultivo de *Chlorella sp.* Assim, observa-se que os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os esperados, onde pode-se obter uma diminuição da concentração dos micropoluentes no meio através do cultivo de microalgas.

Observa-se também que o trimetoprim se mostrou mais recalcitrante em relação ao sulfametoxazol. Tal resultado também pode ser visto nos estudos de Bai e Acharya

(2017) que analisaram a remoção dos antibióticos SMX e TMP através do cultivo da microalga *Nannochloris sp* e obtiveram a remoção de 40% e 10%, respectivamente após 14 dias de experimento. SMX e TMP também foram analisados em um mix de 10 antibiótico por Kiki et al. (2020) utilizando quatro espécies diferentes de microalgas, e a média de remoção obtida foi de 74% para o SMX e 37% para TMP.

Na Figura 9, tem-se os cromatogramas dos cultivos realizados neste trabalho. Observa-se que, para os três experimentos, diversos novos picos em diferentes tempos de retenção aparecem nas curvas inerentes ao dia final, enquanto na curva do início do cultivo é visto apenas os picos relacionados aos antibióticos. Neste caso, esses novos picos podem estar associados a produtos da biodegradação dos antibióticos, indicando que a microalga *Monoraphidium contortum* pode produzir enzimas com capacidade de degradar antibióticos.

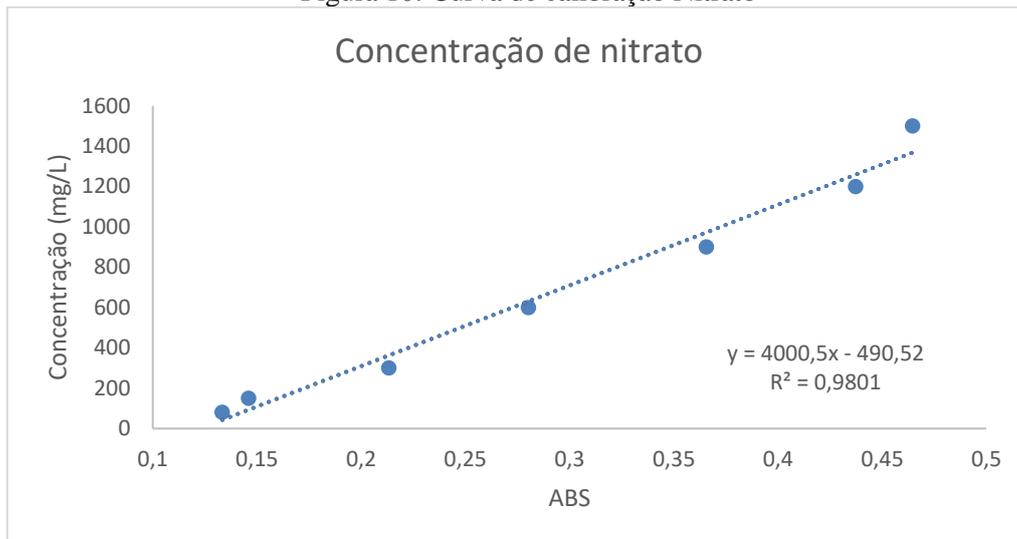
Diversas pesquisas anteriores que analisaram a remoção de micropoluentes utilizando cultivos de microalgas atribuíram à biodegradação o principal mecanismo de remoção (SONG et al., 2019; da SILVA RODRIGUES et al., 2020). A remoção de SMX e TMP estudada por Kiki et al. (2020) também indicou a biodegradação como principal meio de remoção para o cultivo das 4 espécies de microalgas analisadas.

Estes resultados apresentados mostram a necessidade de verificar a capacidade da microalga *M. contortum* em produzir tais enzimas com capacidade de degradar contaminantes emergentes.

4.4 Análise da remoção de nitrogênio total

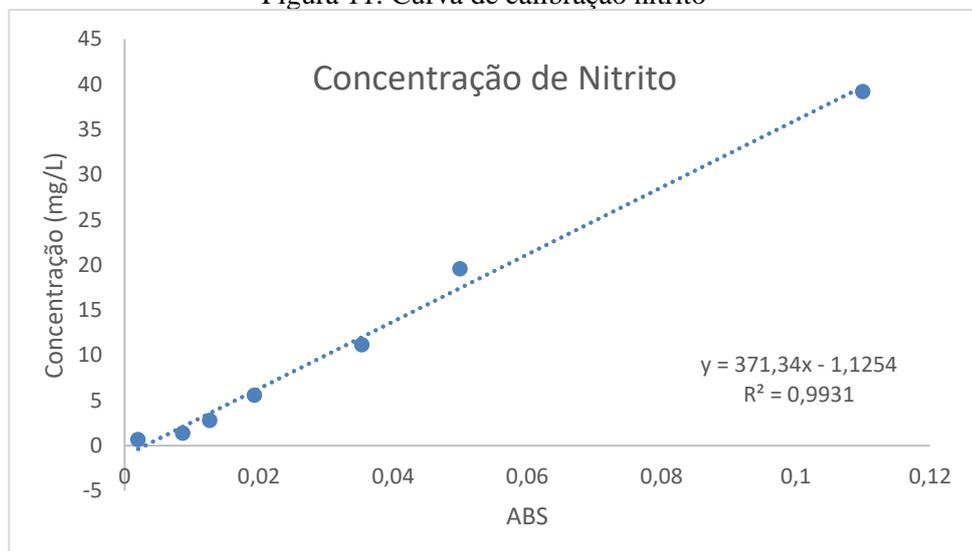
As curvas de calibração para a quantificação de Nitrato e Nitrito, podem ser vistas na Figura 10 e 11, respectivamente.

Figura 10: Curva de calibração Nitrato



Fonte: Autora (2024)

Figura 11: Curva de calibração nitrito



Fonte: Autora (2024)

Por meio das análises feitas no início e final dos cultivos, tem-se os valores da concentração de nitrogênio total no meio, que podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de Nitrogênio antes e depois dos cultivos

Nitrogênio Total			
Cultivo	Conc. Inicial (mg·L⁻¹)	Conc. Final (mg·L⁻¹)	Remoção
Meio Bold	10,0	0,008	>99 %
Meio Bold com SMX	8,66	0,124	99 %
Meio Bold com TMP	5,32	0,537	90 %
Meio Bold com SMX e TMP	5,61	0,072	99 %

Fonte: Autora (2024)

Em relação à remoção de nitrogênio, os cálculos foram efetuados tendo por base a concentração de nitratos e nitritos no meio. As eficiências de remoção foram de mais de 90% nos experimentos em meio Bold, obtendo aproximadamente uma remoção total nos experimentos com SMX e ambos os antibióticos.

Outros estudos reportam eficiências similares de remoção do nitrogênio através do cultivo de microalgas. Wilt et al. (2016) analisaram a remoção de nutrientes através do cultivo de *Chlorella sorokiniana* em urina sintética, meio M8a e em efluente tratado anaerobicamente proveniente de um reator UASB e, nos três meios de cultivo, a eficiência de remoção de nitrogênio foi de aproximadamente 100%. Silva et al. (2015) analisaram a remoção de nitrato e amônia, através do cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, e obtiveram uma remoção completa (100%) de amônia e altas eficiências de remoção foram observadas para o nitrato (acima de 95%). Uma remoção de 98% de N total através do cultivo de *Chlorella vulgaris* em Meio Bold também foi observada por Rodrigues-Sousa et al. (2021), demonstrando que os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, segundo a literatura.

Sendo assim, este fato indica a eficiência da microalga em remover nitrogênio do meio de cultivo, o que é de grande importância no tratamento de efluentes e demonstra o potencial de incluir tal tecnologia de cultivo como parte de um tratamento terciário.

4.5 Análise da composição bioquímica da biomassa

A Tabela 10 mostra os teores de lipídios e de proteínas obtidos por meio das análises da composição da biomassa para cada cultivo.

Tabela 10: Teores de proteína e de lipídios em biomassa de *Monoraphidium contortum* para diferentes meios de cultivo

Experimento	Proteínas (%)	Lipídios (%)
Controle (Meio Bold)	16,87 ± 1,10 ^A	41,17 ± 4,03 ^A
SMX em Meio Bold	17,47 ± 0,03 ^A	40,89 ± 2,34 ^A
TMP em Meio Bold	18,55 ± 0,92 ^A	34,75 ± 3,15 ^A
TMP e SMX em Meio Bold	16,77 ± 0,77 ^A	37,42 ± 4,68 ^A

* Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Fonte: Autor (2024)

** teor em % indica massa de proteínas e lipídios por massa de biomassa seca.

Observa-se que os teores de proteínas obtidos não sofreram variação estatisticamente significativa entre o cultivo controle e os cultivos com os antibióticos (ANOVA, $p > 0,05$). Resultados semelhantes podem ser vistos nos estudos de Mojiri et al. (2021), onde foi investigada a remoção de sulfametoxazol e ofloxacina através da diatomácea marinha *Chaetoceros muelleri* e percebeu-se que os teores de proteínas permaneceram moderadamente estáveis. Yang et al. (2020) analisaram a remoção de ofloxacina através do cultivo da microalga oleaginosa *Scenedesmus obliquus* e os resultados também indicaram que o teor de proteínas permaneceu relativamente estável. O teor de proteínas da biomassa de *Chlorella spp.* após a fitorremediação de águas residuárias com antibióticos veterinários foi analisado por Michelon et al. (2022) e não houve diferença significativa após o processo. Em estudos recentes, Ricky e Shanthakumar (2023) investigaram a remoção de ciprofloxacina e norfloxacina por cinco diferentes espécies de algas, dentre elas *Monoraphidium sp.*, e a concentração de proteínas da biomassa ficou similar ao controle para o intervalo de 1-25 mg·L⁻¹ da mistura dos antibióticos.

Entretanto, os valores obtidos do teor de proteínas no presente estudo ficaram abaixo dos encontrados por Becker (1994) para diferentes espécies de microalgas verdes. Resultados semelhantes podem ser vistos nos estudos de Choi et al. (2023) que estudaram o cultivo de *M. contortum* para o tratamento terciário de efluentes de laticínios e os resultados obtidos foram justificados pelo propósito do estudo, que foi investigar a remoção de nitrogênio, e por isso não incluiu a suplementação desse nutriente.

Em relação aos teores de lipídios, observa-se que não houve variação estatística para os cultivos analisados (ANOVA, $p > 0,05$), com valores variando entre 34,75 ± 3,15 e 41,17 ± 4,03. Composição similar foi encontrada por Ricky e Shanthakumar (2023) que, ao analisarem a bioquímica da biomassa de *Monoraphidium sp.* após o cultivo na presença de antibióticos, encontraram uma porcentagem de 35,5%. Contudo, esses

valores são superiores aos teores lipídicos encontrados nos estudos de Bogen et al. (2013) que, dentre 30 espécies de microalgas analisadas, *Chloridella simplex* e *Monoraphidium tortile* apresentaram os maiores níveis de lipídios, com 31,8% e 31,5%, respectivamente. Por outro lado, *Monoraphidium contortum* registrou um teor lipídico de apenas 22% neste mesmo estudo.

Guo et al. (2016) ao estudarem a remoção de antibióticos cefalosporínicos 7-ACA de águas residuais durante o cultivo de três cepas de microalgas (*Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.* e *Mychonastes sp.*), também observaram que o conteúdo lipídico das três microalgas foi semelhante com ou sem a presença de 7-ACA. O efeito da azitromicina na microalga *Chlorella pyrenoidosa* também foi analisado por Mao et al. (2021) e, para a concentração de $5\mu\text{gL}^{-1}$ do fármaco, o conteúdo lipídico foi semelhante ao controle. Os lipídios da biomassa de *Chlorella spp.* também permaneceram semelhantes ao controle após a fitorremediação dos antibióticos tetraciclina e doxiciclina (MICHELON et al., 2022). Sendo assim, estes resultados apontam que os antibióticos tiveram efeitos insignificantes na acumulação lipídica da microalga.

Os perfis de ácidos graxos das frações lipídicas obtidos por meio de cromatografia a gás estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Perfil de ácidos graxos (%) das frações lipídicas de cada cultivo

Ácidos graxos (%)*	Controle (Meio Bold)	SMX em MB	TMP em MB	TMP e SMX em MB
C12:0	0,31 ± 0,02	0,13 ± 0,18	-	0,56 ± 0,20
C16:0	32,16 ± 1,78	41,86 ± 4,70	32,72 ± 4,05	39,48 ± 9,74
N.I.**	1,38 ± 0,07	0,91 ± 0,53	0,87 ± 0,32	1,12 ± 0,58
C17:1	1,02 ± 0,00	0,80 ± 0,47	1,25 ± 0,42	0,86 ± 0,47
N.I.**	2,48 ± 0,47	1,46 ± 1,03	1,72 ± 0,42	1,41 ± 1,99
C18:0	1,70 ± 0,01	3,03 ± 2,93	3,28 ± 0,81	3,25 ± 1,77
C18:1n9C	35,72 ± 2,28	33,97 ± 6,72	35,93 ± 0,29	29,64 ± 1,71
C18:2n6C	5,81 ± 0,02	4,18 ± 0,06	6,56 ± 0,67	5,24 ± 0,84
C18:3n6	12,51 ± 2,50	7,00 ± 1,90	11,43 ± 2,95	9,88 ± 6,45
N.I.**	3,14 ± 1,09	1,38 ± 0,51	2,39 ± 0,68	2,22 ± 2,29
C18:3n3	3,18 ± 0,10	2,75 ± 0,43	3,21 ± 0,04	3,22 ± 0,50
N.I.**	0,61 ± 0,01	2,56 ± 2,98	0,67 ± 0,94	3,15 ± 2,12

* Porcentagem de ácidos graxos em relação ao total (massa/massa)

C12:0 ácido láurico; C16:0 ácido palmítico; C17:1 ácido cis-10-heptadecanoico; C18:0 ácido esteárico; C18:1n9C ácido oleico; C18:2n6C ácido linoleico; C18:3n6 ácido γ -linolênico; C18:3n3 ácido α -linolênico. N.I.: não identificado.

-: não detectado.

Fonte: Autora (2024)

Os perfis de ácidos graxos obtidos são similares entre os cultivos e observa-se a presença de ácidos saturados e insaturados. As maiores proporções observadas foram de ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1n9C), seguido de ácido γ -linolênico (C18:3n6). Perfil semelhante de ácidos graxos com maior proporção de ácido palmítico e ácido oleico, seguido do ácido linolênico foi relatado em estudos anteriores por Choi et al. (2023), Singh et al. (2023) e Sarpal et al. (2016). Yang et al. (2020), após cultivarem *Scenedesmus obliquus* em meio contendo ofloxacina, também identificaram que a grande maioria dos ácidos graxos sintetizados tinham comprimentos de cadeia de carbono na faixa de C16 a C18. Esses ácidos graxos foram reconhecidos como tendo os comprimentos de cadeia ideais para serem utilizados na produção de biodiesel (ZHANG et al., 2018).

Para a produção de biodiesel a partir do óleo de microalgas deve-se considerar que a qualidade do biocombustível é afetada diretamente pelo perfil de ácidos graxos presentes. As propriedades físico-químicas, como estabilidade oxidativa, número de cetanos e temperatura de entupimento a frio são influenciadas pelo comprimento da cadeia de carbono e o número de insaturações dos ácidos graxos (WANG et al., 2017). Os óleos saturados apresentam boa resistência à degradação, o que proporciona ao biodiesel alta estabilidade oxidativa. Além disso, o elevado número de cetano obtido pelos óleos saturados de cadeia longa está relacionado à liberação de menor emissão de NO_x (SINGH et al., 2023). Porém, por serem menos propensos ao estado sólido em baixas temperaturas, os óleos insaturados conferem melhores características de fluidez a frio (ROHIT e MOHAN, 2018).

Uma vez que os ácidos graxos poli-insaturados são muito susceptíveis à oxidação e podem gerar instabilidade quando o tempo de armazenamento é longo, é importante observar que o teor de ácido γ -linolênico está no limite de 12% estabelecido pelas Normas Europeias (KNOTHE et al., 2006). Portanto, considerando o objetivo de utilização deste óleo para biodiesel, deve-se considerar um tratamento adicional por hidrogenação catalítica, a fim de gerar ácidos graxos saturados e tornar o combustível mais estável (CONVERTI et al., 2009; CHOI et al., 2023).

Segundo Patel et al. (2020) e Singh et al. (2023), a elevada quantidade de ácidos graxos de cadeia longa pode elevar a qualidade do biodiesel, que não pode ser satisfeita apenas com a classe de éster metílico de ácido graxo único. Sendo assim, o lipídio

derivado da *Monoraphidium contortum*, que contém uma boa quantidade e variedade de ácidos graxos de cadeia longa, é promissor para a produção do biodiesel.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de remoção dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, através do cultivo da microalga *Monoraphidium contortum*. Primeiramente, a adição dos antibióticos no meio não inibiu o crescimento da microalga, além da adição do TMP ter aumentado a concentração e produtividade em biomassa desta. O cultivo se mostrou eficiente em remover os antibióticos analisados, onde foram alcançadas remoções de 42,3% do SMX e 28,6% do TMP. Neste caso, o TMP se mostrou mais recalcitrante comparado ao SMX. Apesar de não ter sido realizado uma análise detalhada dos mecanismos de remoção, os cromatogramas analisados indicam a formação de produtos de biodegradação dos antibióticos ao longo do cultivo, indicando ser este um dos mecanismos de remoção. Remoções de mais de 90% da concentração de nitrogênio total foram encontradas para os cultivos realizados em meio Bold, com ou sem a presença dos antibióticos. A análise bioquímica da biomassa evidencia que a elevada concentração de lipídios e o perfil favorável de ácidos graxos tornam a biomassa de *M. contortum* uma opção viável e promissora para a produção de biocombustíveis. Sendo assim, o cultivo de microalgas deste estudo demonstra ser um potencial para a biorremediação de efluentes contendo antibióticos, remoção de nitrogênio de efluentes e produção de biomassa de interesse comercial. Como a diversidade desses microrganismos é abundante, os resultados alcançados são promissores e merecem mais estudos para o desenvolvimento de alternativas de tratamentos terciário eficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, E.; BULA, L.; MERCADO, I.; MONTAÑO, A.; CUBILLÁN, N. Bioremediation of Cephalexin with non-living *Chlorella* sp., biomass after lipid extraction. **Bioresource Technology**, 257(), 17–22, 2018.

AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th ed., American Public Health Association, Arlington, 1984.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed., American Public Health Association, Washington, 2005.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, p. 187-204, 2013.

ARBIB Z, RUIZ J, ALVAREZ-DIAZ P, et al. Long-term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. **Ecological Engineering**. 52:143–153, 2013.

BAI, X.; ACHARYA, K. Algae-mediated removal of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from Lake Mead water. **Science of the Total Environment**, v. 581, p. 734-740, 2017.

BECKER, E. Wolfgang. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, 1994.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, London, pp 312–351, 2004.

BHATTACHARJEE M. K. Antimetabolites: antibiotics that inhibit nucleotide synthesis. **Springer International Publishing**, Basel, pp 95–108, 2016.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. Be.; CARISSIMI, E.. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v. 66, n. 210, p. 78-95, 2018.

BOGEN, C. et al. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technology**. V. 133, p. 622–626, 2013.

BROWN, E., WRIGHT, G. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature** v. 529, p. 336–343, 2016.

CAI, T., PARK, S. Y., e LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 19, 360-369, 2013.

CARVALHO, A. P., MEIRELES, L. A., e MALCATA, F. X. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology progress**, 22(6), 1490-1506, 2006.

CAVAZOS-ROCHA, N. et al. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 5, p. 1775-1781, 2007.

CHALLIS, J. K. et al. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 4, p. 672-696, 2014.

CHATTERJEE P, GRANATIER M, RAMASAMY P, KOKKO M, LAKANIEMI AM, RINTALA J. Microalgae grow on source separated human urine in Nordic climate: outdoor pilot-scale cultivation. **J Environ Manag**. 237:119–127, 2019.

CHATURVEDI, P. et al. Recent advancement in remediation of synthetic organic antibiotics from environmental matrices: Challenges and perspective. **Bioresource Technology**, v. 319, p. 124161, 2021.

CHEN, C.-Y.; YEH, K.-L.; AISYAH, R.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHOI H.J, LEE S.M. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. **Bioprocess Biosyst Eng**. 38:761–766, 2015.

CHOI, N. et al. Evaluation of *Monoraphidium contortum* for the tertiary treatment of dairy industry wastewater and biomass production with nitrogen supplementation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 2, p. 265-271, 2023.

CHU, YUHAO et al. New insight into the concentration-dependent removal of multiple antibiotics by *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 129409, 2023.

CONVERTI A., CASAZZA A.A., ORTIZ E.Y. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering Process Intensification** 48:1146–1151, 2009.

DA SILVA RODRIGUES, D. A. et al. Biodegradation of sulfamethoxazole by microalgae-bacteria consortium in wastewater treatment plant effluents. **Science of The Total Environment**, v. 749, p. 141441, 2020.

DANESHGAR, S., CALLEGARI, A., CAPODAGLIO, A. G., & VACCARI, D. The potential phosphorus crisis: resource conservation and possible escape technologies: a review. **Resources**, 7(2), 37, 2018.

DEMIRBAS, A.; E DEMIRBAS, M. F. **Algae energy: algae as a new source of biodiesel**. Springer Science & Business Media, 204p, 2010.

DIAS, G. et al. Biorremediation of industrial effluent using microalgae. **Química Nova [online]**, v. 42, n. 8, 2019.

DING, T.; YANG, M.; ZHANG, J.; YANG, B.; LIN, K.; LI, J.; GAN, J.. Toxicity, degradation and metabolic fate of ibuprofen on freshwater diatom *Navicula* sp. **Journal of Hazardous Materials**, 330(), 127–134, 2017.

DITTAMI SM, HEESCH S, OLSEN JL, COLLÉN JJ. Transitions between marine and freshwater environments provide new clues about the origins of multicellular plants and algae. **J Phycol.** 53:731–745, 2017.

DRUGBANK. **Database Source.** 2022. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00440>. Acesso em: 23 de jun. de 2022.

EGUCHI, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y. S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., & Yoshimura, H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, 57(11), 1733–1738, 2004.

EL-SHEEKH, M.M., GALAL, H.R., MOUSA, A.S.H. et al. Coupling wastewater treatment, biomass, lipids, and biodiesel production of some green microalgae. **Environ Environmental Science and Pollution Research** 30, 35492–35504, 2023.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of nocost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379-385, 2012.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource technology**, v. 160, p. 3-14, 2014.

GARCIA-RODRÍGUEZ, A. et al. The influence of light exposure, water quality and vegetation on the removal of sulfonamides and tetracyclines: a laboratory-scale study. **Chemosphere**, v. 90, n. 8, p. 2297-2302, 2013.

GOJKOVIC, Zivan et al. Northern green algae have the capacity to remove active pharmaceutical ingredients. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 644-656, 2019.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva; PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUO, W.-Q. et al. Removal of cephalosporin antibiotics 7-ACA from wastewater during the cultivation of lipid-accumulating microalgae. **Bioresource technology**, v. 221, p. 284-290, 2016.

HARTMAN L., LAGO R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices* 22 (1973): 475-476, 1973.

HENA, S.; GUTIERREZ, L.; CROUÉ, J.P. Removal of metronidazole from aqueous media by *C. vulgaris*. **Journal of hazardous materials**, v. 384, p. 121400, 2020.

HENA, S.; GUTIERREZ, L.; CROUÉ, J.P. Removal of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from wastewater using microalgae: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 124041, 2021.

HERNÁNDEZ, F; SANCHO, J.V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466–485, 2007.

HUANG, J.; KANKANAMGE, N. R.; CHOW, C.; WELSH, D. T.; LI, T.; TEASDALE, P. R. Removing ammonium from water and wastewater using cost-effective adsorbents: a review. **Journal Of Environmental Sciences**, [s.l.], v. 63, p. 174-197, 2018.

HUANG, R. et al. Keystone microalgae species determine the removal efficiency of sulfamethoxazole: a case study of *Chlorella pyrenoidosa* and microalgae consortia. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.

HUO S, WANG Z, ZHU S, et al. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. **Bioresour Technol.** 121:76–82, 2012.

ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A., PASCARELLA, L., & PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment**, 346(1–3), 87–98, 2005.

IWA, International Water Association. Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater. VIRKUTYTE, J.; VARMA, R.S.; JEGATHEESAN, V. (Eds.). London. 483p, 2010.

JIANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J.. Mechanisms for the stimulatory effects of a five-component mixture of antibiotics in *Microcystis aeruginosa* at transcriptomic and proteomic levels. **Journal of Hazardous Materials**, v. 406, p. 124722, 2021.

KIKI, C.; RASHID, A.; WANG, Y.; LI, Y. et al. Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways. **Journal of Hazardous Materials**, v. 387, p. 121985, 2020.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1834-1846, 2015.

KNOTHE G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 83:823–833., 2006.

KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, 75(4), p. 417–434, 2009.

KURAVI, Sri Divya; MOHAN, S. Venkata. Mixotrophic cultivation of *Monoraphidium* sp. In dairy wastewater using Flat-Panel photobioreactor and photosynthetic performance. **Bioresour Technol**, v. 126671, 2022.

- LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae-a literature review. **Vatten**, v. 62, n. 1, p. 31, 2006.
- LENG, L.; WEI, L.; XIONG, Q.; XU, S. et al. Use of microalgae-based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 238 p. 124680, 2019.
- LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in Brazilian surface waters using liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385-393, 2011.
- MACKERETH F. J., HERON J., TALLING J. F. Water analysis: some revised methods for limnologists. **Freshwater Biological Association**, Ambleside 36:117, 1978.
- MAO, Y. et al. Azithromycin induces dual effects on microalgae: Roles of photosynthetic damage and oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 222, p. 112496, 2021.
- MATAMOROS, V. et al. Assessment of the mechanisms involved in the removal of emerging contaminants by microalgae from wastewater: a laboratory scale study. **Journal of hazardous materials**, v. 301, p. 197-205, 2016.
- MATSUDO, M.C.; SANT'ANNA, C.L.; PÉREZ-MORA, L.S.; SILVA, R.C.; CARVALHO, J.C.M. Evaluation of green microalgae isolated from central and north coast of Sao Paulo as source of oil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 9, n.1, p. 12-19, 2021.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p.85-93, 2004.
- MICHELON, W. et al. Removal of veterinary antibiotics in swine wastewater using microalgae-based process. **Environmental Research**, v. 207, p. 112192, 2022.
- MOJIRI, A.; BAHARLOOEIAN, M.; ZAHED, M. A. The potential of *Chaetoceros muelleri* in bioremediation of antibiotics: performance and optimization. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 977, 2021.
- NEVES E CASTRO, P.B.; DA SILVA RODRIGUES, D.A.; ROESER, H.M.P. et al. Antibiotic consumption in developing countries defies global commitments: an overview on Brazilian growth in consumption. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 21013–21020 2020.
- NGUYEN TT, BUI XT, NGO HH, NGUYEN TTD, NGUYEN KQ, NGUYEN HH, HUYNH KPH, NÉMERY J, FUJIOKA T, DUONG CH, DANG BT, VARJANI S: Nutrient recovery and microalgae biomass production from urine by membrane photobioreactor at low biomass retention times. **Sci Total Environ**. 785, 147423, 2021.

NOGUEIRA, G. H. S; MATSUDO, M. C. Avaliação do efeito inibitório dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim sobre a microalga *Monoraphidium contortum*. V Simpósio de Iniciação Científica, 2022, Unifei, Itajubá/MG. 2022.

PATEL, A. K.; JOUN, J.; SIM, S. J. A sustainable mixotrophic microalgae cultivation from dairy wastes for carbon credit, bioremediation and lucrative biofuels. **Bioresource technology**, v. 313, p. 123681, 2020.

PELIZER L. H., et al. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. *Farmácia e Química* 32:37- 40, 1999.

PENG, F.-Q. et al. Biotransformation of progesterone and norgestrel by two freshwater microalgae (*Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*): transformation kinetics and products identification. **Chemosphere**, v. 95, p. 581-588, 2014.

PENG, Y.Y., GAO, F., HANG, W.J.W., YANG, H.L., JIN, W.H., LI, C. Effects of organic matters in domestic wastewater on lipid/carbohydrate production and nutrient removal of *Chlorella vulgaris* cultivated under mixotrophic growth conditions. **J. Chem. Technol. Biot.** 94(11), 3578-3584, 2019.

PÉREZ-MORA, L.S.; MATSUDO, M.C.; CEZARE-GOMES, E.A.; CARVALHO, J. C. M. An investigation into producing *Botryococcus braunii* in a tubular photobioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 12, p. 3053-3060, 2016.

POSADAS E, DEL MAR MORALES M, GOMEZ C, et al. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**. 265:239–248, 2015.

RAMOS et al. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus* from the Pantanal dos Marimbus, BA. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Ecologia - Universidade Estadual de Feira de Santana, São Paulo, 2012.

REZAEI, A., KOSARI-NASAB, M. & MOVAFEGHI, A. Cellular toxicity of cefazolin sodium to the green microalga *Chlorella vulgaris*: evaluation of biological responses. **Biologia**, 2023.

RICKY, R.; SHANTHAKUMAR, S. An investigation on removal of ciprofloxacin and norfloxacin by phycoremediation with an emphasis on acute toxicity and biochemical composition. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 13911, 2023.

RODRIGUES, D. A. S. **Remoção de antibióticos em efluentes secundários utilizando fotobiorreatores microalgas-bactérias**. 2020. 166p. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Ouro Preto, 2020.

RODRIGUES-SOUSA, A. E. et al. Nitrogen supplementation for the production of *Chlorella vulgaris* biomass in secondary effluent from dairy industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 165, p. 107818, 2021.

ROHIT, M. V.; VENKATA M., S. Quantum yield and fatty acid profile variations with nutritional mode during microalgae cultivation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 111, 2018.

ROY, M., & MOHANTY, K. A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. **Algal Research**, 44, 101683, 2019.

RUAS, Grazielle et al. Influence of the hydraulic retention time on the removal of emerging contaminants in an anoxic-aerobic algal-bacterial photobioreactor coupled with anaerobic digestion. **Science of The Total Environment**, v. 827, p. 154262, 2022.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.Y.; VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SARPAL, A. S. et al. Investigation of biodiesel potential of biomasses of microalgae *chlorella*, *spirulina* and *tetraselmis* by NMR and GC-MS techniques. **J Biotechnol Biomater**, v. 6, n. 220, p. 2, 2016.

SASABUCHI, Isabela et al. Sustentabilidade no uso de fósforo: uma revisão bibliográfica com foco na situação atual do estado de São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v. 46, p. 185-198, 2023.

SCHERER, M. D. **Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) da produção de biodiesel de microalgas cultivadas em fotobiorreatores compactos industriais**. 2015. 163p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Tecnologia, Curitiba 2015.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C.; COLLA, L. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 21, p. 48-60, 2012.

SENGUPTA, A., LYONS, J.M., SMITH, D.J., DREWES, J.E., SNYDER, S.A., HEIL, A., MARUYA, K.A. The occurrence and fate of chemicals of emerging concern in coastal urban rivers receiving discharge of treated municipal wastewater effluent. **Environ. Toxicol. Chem.** 33, 350–358, 2013.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z. J.; WU, Q.; MAO, E. Microalgae Mass Production Methods. **Transactions of the ASABE**, 52(4), 1275–1287, 2009.

SIEDLEWICZ, G.; BORECKA, M.; BIAŁK-BIELIŃSKA, A.; SIKORA, K. et al. Determination of antibiotic residues in southern Baltic Sea sediments using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Oceanologia**, v. 58, n. 3, p. 221-234, 2016.

SILVA, N. F. P. et al. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. **Algal Research**, 11(), 350–358, 2015.

SINGH, P.; MOHAN, S. V.; MOHANTY, Kaustubha. Dairy wastewater treatment using *Monoraphidium sp.* KMC4 and its potential as hydrothermal liquefaction feedstock. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128877, 2023.

SMITAL, T. et al. Emerging contaminants—pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 552, n. 1-2, p. 101-117, 2004.

SONG, CHUNFENG et al. Biodegradability and mechanism of florfenicol via *Chlorella sp.* UTEX1602 and L38: experimental study. **Bioresource technology**, v. 272, p. 529-534, 2019.

SOUSA, H. et al. Microalgal-based removal of contaminants of emerging concern. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 127153, 2022.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1049–1056, 2006.

STRICKLAND J. D., PARSONS T. A Manual of Seawater Analysis. **Bull Fish Res Board Canada** 125:1–185, 1960.

SU, Y. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 762, p. 144590, 2021.

SUN, M.; LIN, H.; GUO, W.; ZHAO, F.; LI, J. Bioaccumulation and biodegradation of sulfamethazine in *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Ocean University of China**, 16(6), 1167–1174, 2017.

SUTHERLAND, D. L.; RALPH, P. J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants. Opportunities and challenges. **Water research**, v. 164, p. 114921, 2019.

UTEX. The Culture collection of algae. University of Texas at Austin. <<http://web.biosci.utexas.edu/utex/Media%20PDF/bold-1nv-medium.pdf> > Acesso em 29/03/2023

VALITALO, P., KRUGLOVA, A., MIKOLA, A., VAHALA, R.. Toxicological impacts of antibiotics on aquatic micro-organisms: a mini-review. **Int. J. Hyg Environ. Health** 220, 558e569, 2017.

VILLAR-NAVARRO, E.; BAENA-NOGUERAS, R.M.; PANIW, M.; PERALES, J.A.; LARA-MARTÍN, P.A. Removal of pharmaceuticals in urban wastewater: high-rate algae pond (HRAP) based technologies as an alternative to activated sludge based processes. **Water Research**, v. 139, p. 19-29, 2018.

WANG H.; ZHOU W.; SHAO H.; LIU T. A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema sp.* vstrains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivation. **Algal Research**. 24 284–289. 2017.

WANG, J.; WANG, S. Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, p. 3573-3582, 2018.

WATKINSON, A.; MURBY, E.; COSTANZO, S. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4164-4176, 2007.

WILKINSON, J.; HOODA, P. S.; BARKER, J.; BARTON, S. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 954-970, 2017.

WILT, A., BUTKOVSKYI, A., TUANTET, K., LEAL, L. H., FERNANDES, T. V., LANGENHOFF, A., & ZEEMAN, G. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. **Journal of hazardous materials**, 304, 84-92, 2016.

WU, S., ZHANG, J., XIA, A., HUANG, Y., ZHU, X., ZHU, X., & LIAO, Q. Microalgae cultivation for antibiotic oxytetracycline wastewater treatment. **Environmental Research**, 214, 113850, 2022.

XIONG, J.-Q.; KIM, S.-J.; KURADE, M. B.; GOVINDWAR, S. et al. Combined effects of sulfamethazine and sulfamethoxazole on a freshwater microalga, *Scenedesmus obliquus*: toxicity, biodegradation, and metabolic fate. **Journal of hazardous materials**, v. 370, p. 138-146, 2019.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; JEON, B.-H. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1251-1257, 2016.

XIONG, J.-Q.; KURADE, M. B.; JEON, B.-H. Ecotoxicological effects of enrofloxacin and its removal by monoculture of microalgal species and their consortium. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 486- 493, 2017.

XU J, ZHAO Y, ZHAO G, et al. Nutrient removal and biogas upgrading by integrating freshwater algae cultivation with piggery anaerobic digestate liquid treatment. **Appl Microbiol Biotechnol**. 99:6493–6501, 2015.

XU M.; BERNARDS M.; HU, Z. Algae-facilitated chemical phosphorus removal during highdensity *Chlorella emersonii* cultivation in a membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 153, p.383–387, 2014.

YANG, K. et al. An integrated view of the intimate coupling UV irradiation and algal treatment on antibiotic: Compatibility, efficiency and microbial impact assessment. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 5, n. 5, p. 4262-4268, 2017.

YANG, L. et al. Removal of ofloxacin with biofuel production by oleaginous microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource technology**, v. 315, p. 123738, 2020.

YIN, Z.; ZHU, L.; LI, S.; HU, T.; CHU, R.; MO, F.; HU, D.; LIU, C.; LI, B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel

production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122804, 2020.

YU, Y. et al. Investigation of the removal mechanism of antibiotic ceftazidime by green algae and subsequent microbial impact assessment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

ZHANG, JINGMIAO et al. Biobased carbon dots production via hydrothermal conversion of microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. **Science of The Total Environment**, v. 839, p. 156144, 2022.

ZHANG, L. et al. Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae. **Bioresource technology**, v. 250, p. 449-456, 2018.

ZHAO, H., HU, J., & ZHAO, L. The effect of drug dose and duration of adjuvant Amoxicillin-plus-Metronidazole to full-mouth scaling and root planing in periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, 25, 5671-5685, 2021.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1, p. 1042-1048, 2010.

ANEXO

Anexo 1 – Composição do meio Bold - Bold 1NV Medium esterilizado

Composição meio Bold segundo UTEX (2010):

$NaNO_3$ 250 mg·L⁻¹

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 25 mg·L⁻¹

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75 mg·L⁻¹

K_2HPO_4 75 mg·L⁻¹

KH_2PO_4 175 mg·L⁻¹

$NaCl$ 25 mg·L⁻¹

Composição PIV solução de metais

Na_2EDTA 750 mg·L⁻¹

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 97 mg·L⁻¹

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 41 mg·L⁻¹

$ZnCl_2$ 5 mg·L⁻¹

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 mg·L⁻¹

Na_2MoO_4 4 mg·L⁻¹

Composição Mix de vitaminas

Vitamina B12 135 mg·L⁻¹

Tiamina 25 mg·L⁻¹

Biotina 1100 mg·L⁻¹

Para o preparo do Meio Bold estéril, autoclavou-se o meio contendo as soluções estoques de sais com 6 mL·L⁻¹ da solução de metais (PIV). Após o esfriamento da solução, adicionou-se, em câmara de fluxo laminar, 1 mL·L⁻¹ do Mix de vitaminas por meio de um filtro de 0,22 µm.

Anexo 2 – Composição do Efluente Sintético – (Xu et al., 2014)

NaNO ₃ -		73,1 (mg·L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	-	33,1 (mg·L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	25 (mg·L ⁻¹)
NaCl	-	25,2 (mg·L ⁻¹)
MgSO ₄	-	36 (mg·L ⁻¹)
NaHCO ₃	-	84 (mg·L ⁻¹)
FeCl ₂ .4H ₂ O	-	2 (mg·L ⁻¹)
MnSO ₄ .H ₂ O	-	3,38 (mg·L ⁻¹)
EDTA.2Na	-	8,7 (mg·L ⁻¹)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O-		1,24 (mg·L ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	1,73 (mg·L ⁻¹)
CuSO ₄ Sulfato de cobre		0,8 (mg·L ⁻¹)
NiSO ₄ .6H ₂ O	-	0,26 (mg·L ⁻¹)