



Área: Engenharia de Alimentos

DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DA BIOMASSA MICROALGAL CULTIVADA NA PRESENÇA DE FÁRMACOS

Júlia Pedó Gutkoski*, Gabrielle Nadal Biolchi, Alan Rempel, Luciane Maria Colla

Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: 136213@upf.br

RESUMO – A recente detecção de contaminantes emergentes em solos, águas e efluentes, os quais podem apresentar efeitos adversos aos organismos e ao meio ambiente, vem desencadeando inúmeros estudos visando a remoção e degradação destes contaminantes. As microalgas são um tratamento alternativo para remoção dos contaminantes e, com a biomassa restante, pode-se produzir subprodutos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição celular de microalgas após o cultivo em meio sintético contendo diferentes misturas de fármacos. A *Chlorella homosphaera* e a *Scenedesmus obliquus* foram cultivadas em erlenmeyers de 250 ml, alocados em mesa agitadora com controle de temperatura e fotoperíodo, durante 20 dias. Foram realizados 5 ensaios adicionados dos fármacos cafeína, ácido acetilsalicílico (AAS), diazepam, paracetamol e fluoxetina, juntamente com 2 ensaios controle. Ao fim dos 20 dias, o cultivo foi centrifugado para separação da biomassa e posterior preparação do extrato para quantificação dos carboidratos e proteínas por métodos espectrofotométricos. A *Chlorella* apresentou maior quantificação de carboidratos no ensaio contendo diazepam, cafeína e AAS (37%), em contraste com os ensaios contendo fluoxetina, cafeína e AAS (20,58%) e do ensaio com os 5 fármacos (20,69%). Já a *Scenedesmus* possuiu valores expressivos de proteína, sendo que a maior quantificação foi encontrada no ensaio contendo fluoxetina (82,72%) e o menor valor no ensaio com os 5 fármacos (54,85%). O cultivo na presença dos fármacos alterou a composição bioquímica das microalgas, sendo possível sua aplicação para manufatura de produtos como biocombustíveis, por exemplo. Para uso em outras matrizes, é necessário investigar a toxicidade da biomassa.

Palavras-chave: composição celular, biorremediação, contaminantes emergentes.

1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes são uma nova classe de compostos que estão sendo detectados no ambiente, como fármacos, cosméticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, agrotóxicos, entre outros, os quais possuem efeitos prejudiciais ao ambiente devido a sua toxicidade (GARCÍA-GALÁN et al., 2018; BILAL et al., 2019). Os fármacos são utilizados para tratamento e prevenção de doenças na medicina humana e veterinária. Entretanto, devido às altas dosagens e automedicação, os fármacos não são totalmente metabolizados pelo organismo e entram nas redes de esgoto via fezes e urina com seus metabólitos ainda ativos. Além disso, esses contaminantes podem chegar às estações de tratamento devido à constante descarga de efluentes provenientes de hospitais, veterinárias e indústrias farmacêuticas (TOLBOOM et al., 2019).

As estações de tratamento são projetadas para tratar da carga orgânica patogêna e de parâmetros mais simples, como a demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO), fósforo, nitrogênio e sólidos suspensos (CHANGOTRA et al., 2019). Porém, para conseguir remover essa nova classe de contaminantes, etapas adicionais de pós-tratamento são necessárias, as quais precisam de altos investimentos para implantação por serem tecnologias que ainda não são acessíveis e, em alguns casos, possuindo boa eficiência apenas em escala laboratorial (TAHERAN et al., 2016; CHTOUROU et al., 2018; PEI et al., 2019).

Estudos demonstram que os fármacos já foram identificados na escala de ng.L^{-1} a ug.L^{-1} em solos, águas superficiais, subterrâneas e efluentes (GOTTSCHALL et al., 2012; ASHFAQ et al., 2017; ALI et al., 2017). Mesmo que sejam detectados em baixas concentrações, Bai e Acharya (2016) verificaram que os fármacos podem persistir no ambiente a longo prazo. Além disso, é importante ressaltar que os contaminantes não são encontrados individualmente, mas sim em misturas complexas que podem resultar em efeitos adversos aos organismos aquáticos e microrganismos presentes no ambiente (GREENHAM et al., 2019; PEI et al., 2019). Magdaleno et al. (2015) constataram que a mistura binária de fármacos como ampicilina e amoxicilina demonstraram efeitos sinérgicos quando presentes em cultivo com a microalga *Pseudokichneriella subcapitata*, o que denota que a toxicidade de um composto individual não é suficiente para prever a toxicidade de misturas em ambientes aquáticos.

Um tratamento alternativo para remoção dos fármacos presentes em águas residuais são as microalgas, organismos fotossintetizantes e adaptáveis a diferentes condições ambientais. A biorremediação por microalgas já foi apontada como um tratamento que pode alcançar até 100% de eficiência de remoção dependendo da espécie da microalga utilizada e do fármaco presente no meio (MATAMOROS et al., 2016; GENTILI; FICK, 2017). Ainda, as



microalgas não necessitam de grandes áreas para cultivo, possibilitam a geração de outros produtos após seu cultivo e são muito resistentes, sendo assim mais interessantes que fungos e bactérias (LI et al., 2016).

Uma das principais vantagens da utilização das microalgas é a possibilidade de adaptação para crescimento em fontes alternativas de nitrogênio e fósforo, os quais estão presentes nos efluentes domésticos e municipais (GENTILI; FICK, 2017), além da presença de diversos tipos de contaminantes emergentes, juntamente com os fármacos (GOJKOVIC et al., 2019). Este cenário reforça a importância do estudo prévio do comportamento da microalga em um meio com a mistura de fármacos ao se almejar a sua utilização para tratamento de poluentes. Ainda, as microalgas podem alterar sua composição celular dependendo das condições de crescimento, o que é algo interessante de se observar conforme o tipo de produto que pretende-se obter no fim do processo com a biomassa restante (DE BHOWMICK et al., 2019).

Algumas estratégias podem ser empregadas para as microalgas acumularem o nutriente de interesse, como no caso do cultivo na ausência de nitrogênio, que estimula o acúmulo de carboidratos e lipídios (PANCHI et al., 2014). Estudos reportam o uso da biomassa da *Spirulina platensis* para enriquecimento de alimentos, tendo em vista que é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (MARGARITES et al., 2016; ZEN et al., 2020; LAFARGA et al., 2020). Outras pesquisas a utilizam também para produção de biocombustíveis, como Rempel et al. (2019), que produziram bioetanol proveniente da biomassa de *Spirulina platensis*, composta por 46% de carboidratos, e com os resíduos da sacarificação e fermentação, produziram biometano. Ainda, as microalgas possuem compostos como carotenóides e clorofilas que podem ser empregadas como pigmentos na indústria alimentícia (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018). É importante atentar-se à forma de cultivo da microalga, já que se ela for cultivada juntamente com efluentes, por exemplo, a biomassa restante pode conter toxicidade residual, pois as microalgas possuem um mecanismo de bioacumulação dos nutrientes presentes no meio (BAI; ACHARYA, 2017). Assim, uma biomassa proveniente de um cultivo atrelado à efluentes e à bioremediação de contaminantes emergentes provavelmente não poderá ser utilizada no enriquecimento de alimentos por não ser segura para consumo.

Diante desse contexto, objetivou-se avaliar a composição celular de microalgas após o cultivo em meio sintético contendo diferentes misturas de fármacos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das microalgas

Foram utilizadas duas microalgas, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella homosphaera*, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo (UPF). A *Chlorella* foi cultivada em meio de cultivo Bristol's Modificado (MBM) (WATANABE, 1960) e a *Scenedesmus* em meio BG-11 (RIPKA et al., 1979).

2.2 Fármacos

Os fármacos utilizados foram diazepam com pureza de 99% (Pharma nostra), paracetamol com pureza de 99,46% (Infinity pharma), fluoxetina com pureza de 99,64% (Purifarma), ácido acetilsalicílico (AAS) com pureza de 99,75% (Valde Química) e cafeína com pureza de 99,1% (Valde Química). Uma solução de etanol 10% (v/v) foi preparada para aumentar a solubilidade do diazepam, os outros fármacos foram solubilizados em água destilada. As concentrações adicionadas já foram previamente estudadas pelo grupo de pesquisa do laboratório, sendo escolhidas de acordo com o crescimento máximo da microalga em cada contaminante individual, que foram 10 mg.L⁻¹ de diazepam, 30 mg.L⁻¹ de paracetamol, 1 mg.L⁻¹ de fluoxetina, 100 mg.L⁻¹ de AAS e 100 mg.L⁻¹ de cafeína.

2.3 Condições experimentais

Os experimentos foram conduzidos em reatores descontínuos por um período de 20 dias ou até que as microalgas atingissem a fase estacionária ou morte celular. As condições experimentais de crescimento ocorreram em erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio de cultivo adequado, colocados em agitador orbital a 170 rpm, 30 °C e controle da luminosidade realizado com lâmpadas de LED (1800 lux), com fotoperíodo de 12 h claro/escuro. A concentração inicial de inóculo foi de 0,20 g.L⁻¹.

Foram realizados 7 ensaios em duplicata com cada microalga, sendo o primeiro com o cultivo da microalga sem os fármacos (BI), o segundo com a solução de etanol 10% (BIE), o terceiro com AAS e cafeína (AC), o quarto com AAS, cafeína e fluoxetina (ACF), o quinto com AAS, cafeína e diazepam (ACDE), o sexto com AAS, cafeína e paracetamol (ACP) e o último com a adição de todos os fármacos (5C), totalizando 41 ensaios.

2.4 Determinação dos teores de carboidratos e proteínas

Após o término dos 20 dias, o cultivo foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos para separação da biomassa, que foi seca em estufa a 50 °C por 24h e passou por processos de ruptura celular via sonda ultrassônica. Posteriormente, a biomassa seca foi caracterizada em relação aos teores de carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e proteínas (LOWRY et al., 1951).



2.5 Análise dos dados

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 95% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela I.

Tabela I. Teor de carboidratos e proteínas de cada microalga após 20 dias de cultivo

<i>Chlorella homosphaera</i>		
Ensaio	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
BI	29,448±0,255 ^b	39,941±0,000 ^b
BIE	32,923±0,535 ^{bc}	27,492±3,876 ^a
AC	35,716±1,989 ^{bc}	25,482±3,464 ^a
ACF	20,584±0,501 ^a	41,503±1,334 ^b
ACDE	37,001±4,244 ^c	27,728±0,000 ^a
ACP	21,739±1,443 ^a	66,255±0,000 ^c
5C	20,694±2,631 ^a	43,243±2,463 ^b
<i>Scenedesmus obliquus</i>		
Ensaio	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
BI	7,321±1,066 ^a	73,202±8,036 ^{ab}
BIE	9,729±2,191 ^a	68,897±3,688 ^{ab}
AC	8,160±0,868 ^a	59,747±2,180 ^{ab}
ACF	8,307±0,238 ^a	82,722±0,000 ^b
ACDE	7,266±0,828 ^a	61,291±4,737 ^{ab}
ACP	6,605±1,018 ^a	73,964±17,417 ^{ab}
5C	8,412±1,193 ^a	54,848±5,713 ^a

BI: branco+inóculo; BIE: branco+inóculo+etanol; AC: ácido acetilsalicílico+cafeína; ACF: ácido acetilsalicílico+cafeína+fluoxetina; ACDE: ácido acetilsalicílico+cafeína+diazepam+etanol; ACP: ácido acetilsalicílico+cafeína+paracetamol; 5C: 5 contaminantes. Valores seguidos de letras iguais na coluna para cada microalga não apresentam diferença significativa entre si num intervalo de confiança de 95% pelo teste de Tukey. (média±desvio padrão).

A maior porcentagem obtida para carboidratos pela microalga *Chlorella* foi no ensaio ACDE (37%) e, para proteínas, no ensaio ACP (66,25%) em comparação com o BI (29,45 e 39,94%). A composição química de cada microalga é muito variável, inclusive entre o mesmo gênero e espécie, pois depende das condições de cultivo, mas geralmente é composta grande parte por proteínas, depois carboidratos, lipídeos e cinzas (RICHMOND; HU, 2013; LI et al., 2019). Para a *Chlorella* sp., os valores de carboidratos variam normalmente entre 12 a 17% e proteína entre 51 a 58% (MATA et al., 2010; CAI et al., 2013).

As microalgas podem alterar suas reservas energéticas em situações de estresse causadas por substâncias tóxicas (MARKOU et al., 2012). Os resultados de carboidratos para a *Chlorella* apresentaram valores maiores dos que normalmente são encontrados na microalga inata, provavelmente devido ao meio conter vários fármacos e ao tempo de exposição da microalga a esses poluentes (IUMMATO et al., 2019). Ainda, dentre os fatores mais comuns para alteração do conteúdo de carboidratos está a falta/limitação de nutrientes (DRAGONE et al., 2011), o que pode ter ocorrido nos ensaios.

O conteúdo protéico da *Chlorella* nos ensaios AC, ACDE e BIE não possui diferença significativa ($p > 0,05$), apresentando as menores porcentagens, em torno de 25 a 27%. Entretanto, esses mesmos ensaios obtiveram valores maiores para carboidratos (32 a 37%). Isso pode ter ocorrido porque nesses ensaios a microalga consumiu maiores concentrações de carbono orgânico provenientes do AAS, cafeína e etanol, o qual levou à preferência da acumulação dos carboidratos. Surkatti e Al-Zuhair (2018) observaram que a *Chlorella* sp. sofreu um decréscimo de proteínas à medida que a concentração de p-cresol, um composto orgânico, aumentou no meio, sendo que o contrário ocorreu para a acumulação de lipídios.

Diversos poluentes podem induzir o estresse oxidativo em organismos, o qual ocorre quando a formação de espécies reativas de oxigênio supera as defesas antioxidantes, causando dano em lipídios, proteínas e DNA (IUMMATO et al., 2019). Entretanto, o ensaio ACP apresentou a maior porcentagem de proteínas (66,7%). A falta de alguns nutrientes no meio pode resultar na acumulação de nutrientes de reserva da microalga. A limitação de nitrogênio causa uma mudança na rota fotossintética de carbono, ou seja, a via metabólica de síntese da proteína altera-se para a via de síntese de lipídeos ou carboidratos, ocorrendo a acumulação destes (HU, 2004). Como no ensaio houve uma maior acumulação de proteínas, pode-se inferir que, no meio, poderia haver uma maior concentração de nitrogênio, ao invés da falta do mesmo.



Para a *S. obliquus*, em condições normais de cultivo, os teores de carboidratos variam de 10 a 17% (MATA et al., 2010; CAI et al., 2013). Nos ensaios, a *Scenedesmus* apresentou teores de carboidratos similares em comparação com sua forma inata, sendo que os percentuais ficaram entre 6,6 e 9,7%, sem diferença significativa entre si ($p > 0,05$). No estudo de Nayak et al. (2016), os autores avaliaram o crescimento da *Scenedesmus* em efluente doméstico e obtiveram um teor de carboidratos em torno de 10%, parecido com os encontrados neste trabalho.

No estudo realizado por Afify et al. (2018), a microalga *S. obliquus* cultivada em meio padrão obteve um percentual de 40,7% de proteína. Outras pesquisas reportam porcentagens ainda maiores, em torno de 56% (BRUTON et al., 2009; CAI et al., 2013). O ensaio ACF obteve o maior teor de proteína (82,72%), já os ensaios 5C e AC foram os que obtiveram os menores percentuais (54,8% e 59,74%), em contraste com o BI, que apresentou uma porcentagem mediana (73,2%). Esses altos valores de proteína encontrados nos ensaios podem ser devido a um mecanismo de defesa ao meio tóxico que a *Scenedesmus* desenvolveu durante o cultivo, acumulando a proteína como um nutriente de reserva.

Para ocorrer acumulação de proteínas, pode-se alterar a concentração de nitrato no meio, intensidade da luz e/ou concentração de CO_2 (MANIRAFASHA et al., 2016), além do tempo certo da colheita. A microalga começa a acumular carboidratos ou lipídeos quando o nitrogênio fica em falta no meio, por isso que o momento certo para interromper o cultivo é antes do conteúdo de nitrogênio ficar deficiente, caso o objetivo for acumular proteína (TAN et al., 2019; HO et al., 2012). Neste estudo, não houve alteração nas concentrações de substrato, logo, não ocorreu restrições nutricionais, por isso que a alteração nos carboidratos não foi observada para a *Scenedesmus*.

Os carboidratos e proteínas possuem dois papéis principais na microalga, que são na estruturação da parede celular e na reserva de energia. Os carboidratos, proteínas e lipídios atuam como componentes de reserva e permitem que a microalga reajuste seu crescimento em condições anormais, como ocorridos neste estudo, em que as microalgas estavam em um ambiente atípico e, por esse motivo, apresentaram maiores teores de carboidratos nos ensaios contendo compostos tóxicos (MARKOU et al., 2012; TAN et al., 2019). Essa biomassa rica em carboidratos, no caso da *Chlorella*, e rica em proteínas, no caso da *Scenedesmus*, poderia ser utilizada para enriquecimento de produtos alimentícios. Entretanto, como as microalgas foram cultivadas em meio contendo fármacos, é necessário investigar se esses compostos tóxicos foram acumulados pelas células microalgais, pois sabe-se que a bioacumulação é um dos mecanismos no qual a microalga remove os contaminantes do meio. O mais seguro seria empregar essa biomassa em outros subprodutos, como biocombustíveis, por exemplo.

4 CONCLUSÃO

O cultivo das microalgas em meio sintético alterou sua composição celular quando comparada com os ensaios que não continham a adição de fármacos, o que levanta uma possibilidade de tratamento de águas residuais contendo esses compostos e posterior uso da biomassa restante para produzir outros produtos e, assim, promover um contexto sustentável e incentivar o desenvolvimento de uma biorrefinaria microalgal.

5 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UPF por disponibilizar o local para realização das análises e à Fapergs pela bolsa de iniciação científica.

6 REFERÊNCIAS

- AFIFY, A. E. M. R.; BAROTY, G. S. E.; BAZ, F. K. E.; BAKY, H. H. A. E.; MURAD, S. M. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 399–408, 2018.
- ALI, A. M.; RØNNING, H. T.; ALARIF, W.; KALLENBORN, R.; AL-LIHAIBI, S. S. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in effluent-dominated Saudi Arabian coastal waters of the Red Sea. **Chemosphere**, v. 175, p. 505-513, 2017.
- ASHFAQ, M.; LI, Y.; WANG, Y.; CHEN, W.; WANG, H.; CHEN, X.; WU, W.; HUANG, Z.; YU, C.; SUN, Q. Occurrence, fate, and mass balance of different classes of pharmaceuticals and personal care products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment plant in Xiamen, China. **Water research**, v. 123, p. 655-667, 2017.
- 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.
- BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochloris* sp. **Journal of hazardous materials**, v. 315, p. 70-75, 2016.
- BILAL, M.; ADEEL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. M. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation—a review. **Environment international**, v. 124, p. 336-353, 2019.
- BRUTON, T.; LYONS, H.; LERAT, T.; STANLEY, M.; RASMUSSEN, M. B. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. Glasnevin, **Sustainable Energy Ireland**, 2009.
- CAI, T.; PARK, S.Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.



- CHANGOTRA, R.; RAJPUT, H.; GUIN, J. P.; VARSHNEY, L.; DHIR, A. Hybrid coagulation, gamma irradiation and biological treatment of real pharmaceutical wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 370, p. 595-605, 2019.
- CHTOUROU, M.; MALLEK, M.; DALMAU, M.; MAMO, J.; SANTOS-CLOTAS, E.; SALAH, A. B.; WALHA, K.; SALVADÓ, V.; MONCLÚS, H. Triclosan, carbamazepine and caffeine removal by activated sludge system focusing on membrane bioreactor. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p. 1–9, 2018.
- DE BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; SEN, R. Zero-waste algal biorefinery for bioenergy and biochar: A green leap towards achieving energy and environmental sustainability. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 2467–2482, 2019.
- DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, p. 3331–3335, 2011.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; MITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- GARCÍA-GALÁN, M. J.; GUTIÉRREZ, R.; UGETTI, E.; MATAMOROS, V.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Use of full-scale hybrid horizontal tubular photobioreactors to process agricultural runoff. **Biosystems engineering**, v. 166, p. 138-149, 2018.
- GENTILI, F. G.; FICK, J. Algal cultivation in urban wastewater: an efficient way to reduce pharmaceutical pollutants. **Journal of applied phycology**, v. 29, p. 255-262, 2017.
- GOJKOVIC, Z.; LINDBERG, R. H.; TYSKLIND, M.; FUNK, C. Northern green algae have the capacity to remove active pharmaceutical ingredients. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 644–656, 2019.
- GOTTSCHALL, N.; TOPP, E.; METCALFE, C.; EDWARDS, M.; PAYNE, M.; KLEYWEGT, S.; RUSSEL, P.; LAPEN, D. R. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. **Chemosphere**, v. 87, p. 194-203, 2012.
- GREENHAM, R. T.; MILLER, K. Y.; TONG, A. Removal efficiencies of top-used pharmaceuticals at sewage treatment plants with various technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 103294, 2019.
- HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244–252, 2012.
- HU, Q. Environmental effects on cell composition. In: Richmond, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2004.
- IUMMATO, M. M.; FASSIANO, A.; GRAZIANO, M.; AFONSO, M. S.; MOLINA, M. C. R.; JUÁREZ, A. B. Effect of glyphosate on the growth, morphology, ultrastructure and metabolism of *Scenedesmus vacuolatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 471–479, 2019.
- LAFARGA, T.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. *Spirulina* for the food and functional food industries. **Food Research International**, p. 109356, 2020.
- LI, C.; XIAO, S.; JU, L. K. Cultivation of phagotrophic algae with waste activated sludge as a fast approach to reclaim waste organics. **Water research**, v. 91, p. 195-202, 2016.
- LI, K.; LIU, Q.; FANG, F.; LUO, R.; LU, Q.; ZHOU, W.; HUO, S.; CHENG, P.; LIU, J.; ADDY, M.; CHEN, P.; CHEN, D.; RUAN, R. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, 2019.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MAGDALENO, A.; SAENZ, M. E.; JUÁREZ, A. B.; MORETTON, J. Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 72-78, 2015.
- MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, p. 282-296, 2016.
- MARGARITES, A. C.; VOLPATO, N.; ARAÚJO, E.; CARDOSO, L. G.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* is more efficient than *Chlorella homosphaera* in carbohydrate productivity. **Environmental Technology**, v. 38, p. 2209- 2216, 2016.
- MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 631–645, 2012.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217–232, 2010.
- MATAMOROS, V.; UGETTI, E.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. 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.
- NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Sustainable valorization of flue gas CO₂ and wastewater for the production of microalgal biomass as a biofuel feedstock in closed and open reactor systems. **RSC Advances**, v. 6, p. 91111–91120, 2016.



- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource technology**, v. 156, p. 146-154, 2014.
- PEI, M.; ZHANG, B.; HE, Y.; SU, J.; GIN, K.; LEV, O.; SHEN, G.; HU, S. State of the art of tertiary treatment technologies for controlling antibiotic resistance in wastewater treatment plants. **Environment international**, v. 131, p. 105026, 2019.
- REMPEL, A.; DE SOUZA SOSSELLA, F.; MARGARITES, A. C.; ASTOLFI, A. L.; STEINMETZ, R. L. R.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy efficient approach. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121588, 2019.
- RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. John Wiley & Sons, 2013.
- RIPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; AVALOS, J.; BONET, M. L.; BORONAT, A.; GOMEZ-GOMEZ, L.; HORNERO-MENDEZ, D.; LIMON, M. C.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; PALOU, A.; RIBOT, J.; RODRIGO, M. J.; ZACARIAS, L.; ZHU, C. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in lipid research**, v. 70, p. 62-93, 2018.
- SURKATTI, R.; AL-ZUHAIR, S. Effect of cresols treatment by microalgae on the cells' composition. **Journal of Water Process Engineering**, v. 26, p. 250-256, 2018.
- TAHERAN, M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y.; ZHANG, T. C.; VALÉRO, J. R. Membrane processes for removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) from water and wastewaters. **Science of the Total Environment**, v. 547, p. 60-77, 2016.
- TAN, C. H.; SHOW, P. L.; LAM, M. K.; FU, X.; LING, T. C.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Examination of indigenous microalgal species for maximal protein synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 154, 2019.
- TOLBOOM, S. N.; CARRILLO-NIEVES, D.; DE JESÚS ROSTRO-ALANIS, M.; DE LA CRUZ QUIROZ, R.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H. M.; PARRA-SALDIVAR, R. Algal-based removal strategies for hazardous contaminants from the environment—a review. **Science of The Total Environment**, v. 665, p. 358-366, 2019.
- WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of applied microbiology University of Tokyo. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 6, p. 1-4, 1960.
- ZEN, C. K.; TIEPO, C. B. V.; DA SILVA, R. V.; REINEHR, C. O.; GUTKOSKI, L. C.; ORO, T.; COLLA, L. M. Development of functional pasta with microencapsulated *Spirulina*: Technological and sensorial effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 2018-2026. 2020.