

EFEITOS DA CAFEÍNA NO CRESCIMENTO E NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MICROALGAS

EFFECTS OF CAFFEINE ON GROWTH AND CHEMICAL COMPOSITION OF MICROALGAE

Samuel Teixeira Lopes¹, Gabrielle Nadal Biolchi¹, Alan Rempel², Luciane Maria Colla²

¹Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Curso de Engenharia Química, Passo Fundo – RS – Brasil. E-mails: samueltlopes1@gmail.com; gabbebiolchi@gmail.com

²Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Passo Fundo – RS – Brasil. E-mails: alan.rempel@hotmail.com; lmcolla@upf.br

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a remoção da cafeína e seus efeitos sobre o crescimento e composição química de microalgas. As cepas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* foram cultivadas durante 40 dias em meio contendo 20 (C20) e 40 mg.L⁻¹ (C40) de cafeína (Etapa 1). A fotodegradação da cafeína foi avaliada durante 20 dias nos meios de cultivo sem a presença das cepas. Ensaio em aumento de escala (Etapa 2) foram realizados com *S. platensis* e cafeína nas mesmas concentrações. Foi avaliada a composição química das biomassas ao final dos cultivos em ambas as etapas. As microalgas apresentaram crescimento em C20 e C40, sendo *S. platensis* a cepa mais resistente. Ainda, *S. obliquus* foi capaz de remover 13,66% da concentração inicial da cafeína em C20. A *S. platensis* apresentou maior crescimento na Etapa 2 em comparação à Etapa 1, o que resultou na maior eficiência de remoção na segunda etapa (25,64% para C20, 13,33% para C40) do que na primeira (0,18% para C20, 12,31% para C40). Não ocorreu fotodegradação durante o período de 20 dias. A cafeína induziu o acúmulo de proteínas nas biomassas, com valores de até 57% (*S. obliquus*, C20). Os altos valores de proteínas possibilitam utilizar as biomassas para a geração de biometano e biofertilizantes. As microalgas foram capazes de crescer em concentrações elevadas de cafeína, mostrando-se promissoras para a sua remoção e aproveitamento das biomassas geradas, havendo necessidade de mais estudos a fim de melhorar as eficiências de remoção durante os processos de biorremediação microalgal.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; toxicidade; composição bioquímica, cinética de crescimento; biorremediação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the removal of caffeine and its effects on growth and chemical composition of microalgae. The strains *Spirulina platensis* and *Scenedesmus obliquus* were cultivated for 40 days in medium with 20 (C20) and 40 mg.L⁻¹ (C40) of caffeine (Stage 1). Caffeine photodegradation was evaluated for 20 days in microalgae culture media without the presence of strains. Scale-up cultivations (Stage 2) were performed with *S. platensis* and caffeine at the same concentrations. The chemical composition of the biomasses was evaluated at the end of the cultivations in both stages. The microalgae showed ability to grow in C20 and C40, with *S. platensis* being the most resistant strain. Furthermore, *S. obliquus* was able to remove 13.66% of the initial concentration of caffeine in C20, while *S. platensis* showed a greater growth in Stage 2 compared to Stage 1, which resulted in higher removal efficiency in the second stage (25.64% for C20; 13.33% for C40) than in the first stage (0.18% for C20; 12.31% for C40). There was no photodegradation observed in 20 days. Caffeine induced the accumulation of proteins in the biomasses, with values up to 57% (*S. obliquus*, C20). The high values of proteins demonstrate the possibility of using these biomasses to generate products such as biomethane and biofertilizers. The microalgae were able to grow in high concentrations of caffeine, showing promising for its removal and use of the generated biomasses, requiring further studies in order to improve the removal efficiencies during the microalgal bioremediation processes.

Keywords: emerging contaminants, toxicity, biochemical composition, growth kinetic; bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes (CEs) são uma classe de poluentes oriundos de indústrias farmacêuticas, clínicas veterinárias, hospitais e efluentes domésticos, que contemplam fármacos, cosméticos, pesticidas e hormônios sintéticos (Bilal et al., 2019). Os CEs despertaram maior preocupação em função dos avanços de técnicas de quantificação, a avaliação dos seus efeitos nos diferentes corpos hídricos e os potenciais efeitos maléficos à vida aquática e humana (Hidayati et al., 2021; Vieira et al., 2022). A cafeína é um CE pertencente à classe dos fármacos e está presente em diversos alimentos e bebidas, como no café, chimarrão, chás, chocolate e energéticos, além de fazer parte da composição de medicamentos analgésicos (Korekar et al., 2020). O consumo diário expressivo de cafeína devido à automedicação faz com que parte da dose ingerida seja excretada com seus metabólitos ainda ativos, chegando nas estações de tratamento de águas residuárias (ETARs) (Fekadu et al., 2019; Vassalle et al., 2020). Nesse sentido, é um dos CEs comumente detectados nas ETARs em concentrações na ordem de ng.L^{-1} e $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Peña-Guzmán et al., 2019). Durante o tratamento de efluentes, a cafeína apresenta uma alta eficiência de remoção (>95%), porém, devido ao seu consumo significativo e crescente, a entrada dessa substância em sistemas hídricos é maior do que a sua degradação (Vieira et al., 2022). Dessa forma, ocorre sua entrada contínua no meio ambiente, apresentando toxicidade a organismos como algas, peixes e crustáceos devido à sua exposição crônica, afetando diretamente o meio ambiente (Xiong et al., 2017a; Patel et al., 2019).

Dado o exposto, é evidente a necessidade de tecnologias eficientes no tratamento de CEs em águas residuárias. Estratégias estudadas para a remoção de cafeína de meios contaminados envolvem os processos oxidativos avançados (POAs) (Wang et al., 2019), filtração por membranas (Lopera et al., 2019) e processos de adsorção (Ravi et al., 2020). Porém, essas tecnologias podem ser impeditivas para a aplicação em larga escala, pois no caso dos POAs há a possível geração de compostos de degradação mais tóxicos e uma baixa eficiência de remoção em baixas concentrações de CEs (Teodosiu et al., 2018). Além disso, nas membranas e nos processos de adsorção, ocorre apenas a transferência de fase do contaminante, necessitando o posterior descarte desse material (Rodriguez-Narvaez et al., 2017; Nie et al., 2020).

A biorremediação através do metabolismo microalgal é uma alternativa para os processos de pós-tratamento de águas residuárias, devido à possibilidade de cultivar esses microrganismos em ambientes adversos, como nos efluentes industriais e domésticos, o que contribui para a diminuição dos custos de tratamento (Vassalle et al., 2020). As microalgas têm potencial para a remediação de águas residuárias devido à sua capacidade de eliminar uma ampla variedade de CEs através da bioadsorção, bioacumulação e biodegradação intra e extracelular (Xiong et al., 2018). O gênero *Scenedesmus* é bastante utilizado em estudos de biorremediação (Matamoros et al., 2016; Sutherland and Ralph, 2019), visto que são resistentes a ambientes inóspitos, além de possuírem a capacidade de crescer em cultivo mixotrófico, no qual essas microalgas podem assimilar moléculas orgânicas como açúcares simples, além de CEs como possíveis nutrientes (Sutherland; Ralph, 2019; Rempel et al., 2021a). Outrossim, dentro do contexto de biorrefinarias, uma das vantagens da utilização de microalgas para a biorremediação de CEs é a possibilidade da posterior utilização da biomassa microalgal na geração de bioprodutos (Sutherland et al., 2018).

A síntese de bioprodutos a partir da biomassa microalgal está relacionada à sua composição bioquímica, visto que para cada produto é necessário um composto de interesse entre carboidratos, lipídeos e/ou proteínas (Magro et al., 2021). Dentre os produtos que podem ser gerados a partir da biomassa microalgal, se encontram o bioetanol, biodiesel, biofertilizantes e biogás (Ahmad et al., 2022). Como a presença de CEs pode induzir alterações na composição bioquímica das microalgas devido ao estresse celular, pode ocorrer o acúmulo de diferentes teores de carboidratos, lipídeos ou proteínas (Rempel et al., 2021b).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a remoção de cafeína via metabolismo microalgal e os possíveis efeitos do contaminante no crescimento celular e na composição bioquímica de microalgas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microalgas e cafeína

Foram utilizadas as microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* do banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo (UPF). Para o cultivo de *S. platensis*, foi utilizado o meio padrão Zarrouk diluído a 50% (Zarrouk, 1956) e para *S. obliquus*, foi utilizado o meio padrão BG-11 (Ripka et al., 1979).

A cafeína utilizada nos cultivos com pureza de 99,1% foi obtida do fornecedor Valde Química®. As concentrações de cafeína (20 e 40 mg.L⁻¹) foram escolhidas a partir de estudos preliminares do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UPF.

2.2 Condições experimentais

Foram realizadas duas etapas de cultivos microalgais, sendo elas em escala laboratorial (Etapa 1) e no aumento de escala (Etapa 2). Durante a Etapa 1, as microalgas *S. platensis* e *S. obliquus* foram cultivadas durante 40 dias na presença de 20 (C20) e 40 (C40) mg.L⁻¹ de cafeína, a fim de avaliar os efeitos do contaminante no crescimento microalgal, nas eficiências de remoção de cafeína pelas microalgas e na influência da cafeína na composição bioquímica dessas biomassas. Além disso, foi realizado um ensaio Controle com a ausência do contaminante no meio de cultivo. Foi avaliada, também, a fotodegradação da cafeína nos respectivos meios de *S. platensis* e *S. obliquus* ao longo de 20 dias. Durante a Etapa 2, cultivou-se a microalga *S. platensis* em maiores escalas, também na presença de 20 e 40 mg.L⁻¹ de cafeína, mais o ensaio Controle, até a fase estacionária de crescimento.

Os experimentos da Etapa 1 foram conduzidos ao longo de 40 dias em biorreatores descontínuos com volume útil de 150 mL, mantidos em mesa agitadora (170 rpm), fotoperíodo claro/escuro de 12:12 h e luminosidade de 1800 lux fornecida por lâmpadas LED, com temperatura controlada a 30±2 °C. Para os ensaios microalgais foi utilizada uma concentração inicial dos inóculos de 0,2 g.L⁻¹. Os ensaios de fotodegradação com os respectivos meios de cada microalga foram conduzidos ao longo de 20 dias em biorreatores descontínuos com volume útil de 200 mL. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Durante a Etapa 2, a *S. platensis* foi cultivada em biorreatores do tipo *raceway* com volume útil de 10 L. Esses biorreatores foram alocados em estufa de hidroponia com temperatura entre 20 e 30 °C, luminosidade natural e agitação por bombas de aeração submersa com vazão de 220 L.h⁻¹.

2.3 Determinação da concentração celular

As concentrações celulares dos cultivos de *S. platensis* e *S. obliquus* foram avaliadas a cada 48 h, em triplicata, por espectrofotômetro a 670 nm, com base nas curvas padrões de biomassa seca para *S. platensis* ($y = 0,6941x - 0,00371$, $R^2 = 0,9929$) e *S. obliquus* ($y = 0,3279x - 0,0093$, $R^2 = 0,9917$). Ao final dos cultivos, foram avaliadas a concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g.L⁻¹) e a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹).

2.4 Determinação da concentração de cafeína

As amostragens para a avaliação da remoção de cafeína foram realizadas a cada 5 dias e analisadas em triplicata por espectrofotometria com base na curva de calibração do CE em cada meio de cultivo ($y = 19,735x + 0,4356$, $R^2 = 0,9998$ em Zarrouk 50% e $y = 19,237x - 0,1293$, $R^2 = 0,9997$ em BG-11), em comprimento de onda de 273 nm.

2.5 Colheita e caracterização bioquímica das biomassas

A colheita das biomassas foi realizada a partir da centrifugação dos cultivos a 3500 rpm durante 10 minutos. As biomassas foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C por 24 h e congeladas a -4 °C até utilização. Após, foi realizada a ruptura celular das biomassas através de sonda ultrassônica em potência máxima, com 10 ciclos intercalados de 1 minuto de sonicação e 1 minuto de repouso. As biomassas obtidas na Etapa 1 foram caracterizadas quanto ao teor de carboidratos (Dubois et al., 1956) e proteínas (Lowry et al., 1951). Para as biomassas obtidas nos cultivos da Etapa 2, foi realizada a caracterização da biomassa em carboidratos (Dubois et al., 1956), proteínas (Lowry et al., 1951), lipídeos (Colla et al., 2004) e cinzas (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da concentração celular

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento das microalgas *S. obliquus* (a) e *S. platensis* (b) referentes aos ensaios da Etapa 1 e *S. platensis* (c) referente à Etapa 2. A Tabela 1 apresenta os valores de velocidade específica máxima e a concentração máxima de biomassa de *S. platensis* e *S. obliquus* nessas mesmas condições, tanto em escala laboratorial quanto no aumento de escala.

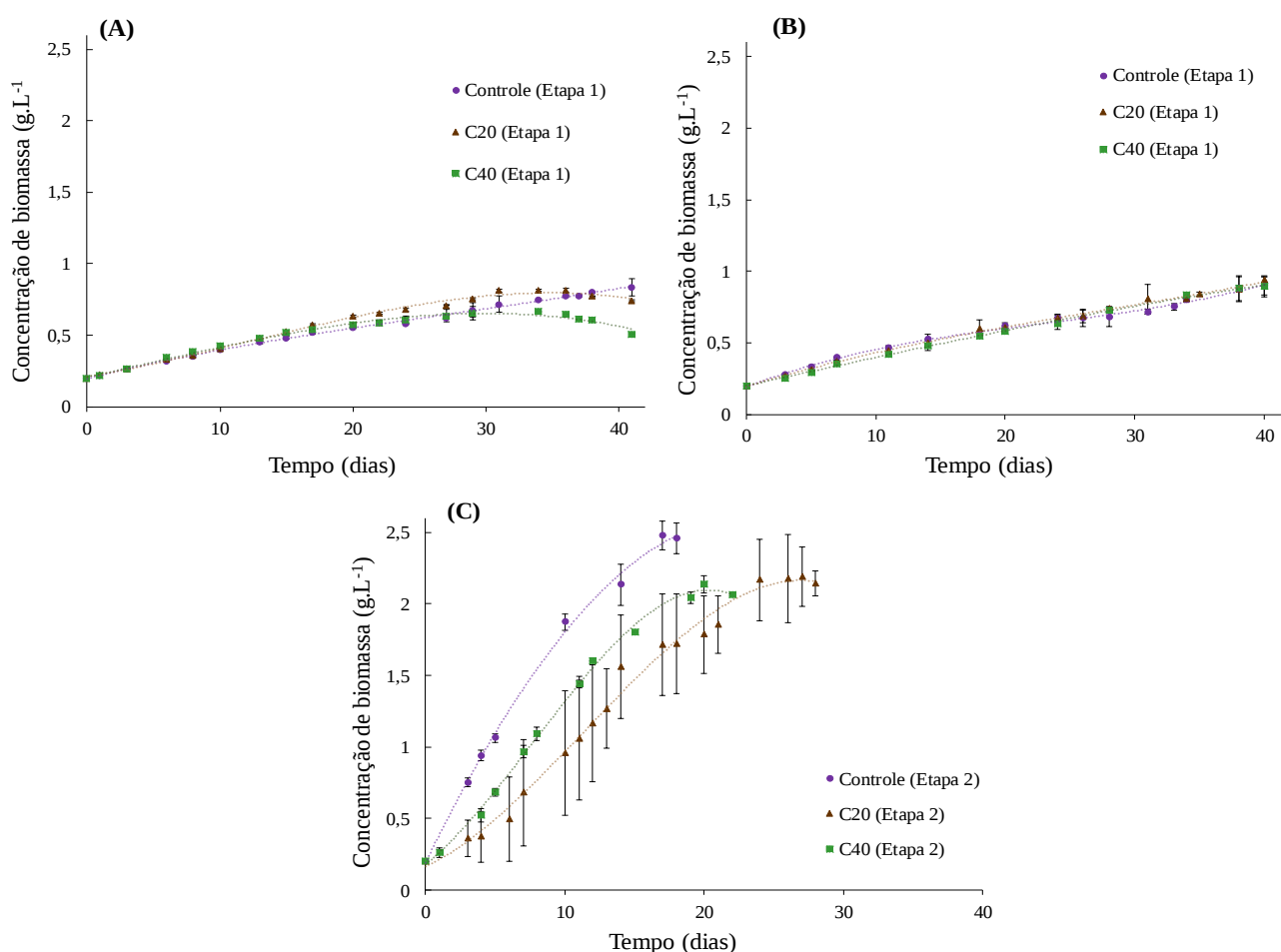


Figura 1: Curvas de crescimento das microalgas

● Controle: Ensaios sem adição de cafeína; ▲ C20: Ensaios com adição de 20 mg.L⁻¹ de cafeína; ■ C40: Ensaios com adição de 40 mg.L⁻¹ de cafeína. (A)- *Scenedesmus obliquus* em escala laboratorial; (B)- *Spirulina platensis* em escala laboratorial; e (C)- *Spirulina platensis* no aumento de escala.

O gênero *Scenedesmus* é estudado devido à sua resistência em ambientes inóspitos. Entretanto, os ensaios C20 e C40 apresentaram declínio na concentração celular a partir do 36º dia de cultivo (Figura 1a). Em comparação ao ensaio Controle e aos cultivos com *S. platensis* (Figura 1b), a *S. obliquus* demonstrou menor resistência ao contaminante a longo prazo. A cafeína pode inibir o crescimento de microalgas dos gêneros *Scenedesmus* e *Raphidocelis*, como observado em estudos anteriores (Tousova et al., 2018; Sousa et al., 2021). Isso corrobora com os resultados obtidos para os cultivos de *S. obliquus*, visto que em comparação ao ensaio Controle, C20 e C40 apresentaram declínio na concentração celular nos tempos finais de cultivo (dia 36 ao 40).

Tabela 1: Velocidades específicas máximas de crescimento e concentrações finais de biomassa

Escala laboratorial				
Ensaio	<i>Scenedesmus obliquus</i>		<i>Spirulina platensis</i>	
	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	X _f (g.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	X _f (g.L ⁻¹)
Controle	0,069±0,0009 ^b	0,8342±0,0607 ^a	0,095±0,0004 ^a	0,8987±0,0612 ^a
C20	0,074±0,0089 ^b	0,7422±0,0076 ^b	0,088±0,0055 ^a	0,9412±0,0219 ^a
C40	0,080±0,0039 ^a	0,5085±0,0031 ^c	0,081±0,0031 ^a	0,8941±0,0732 ^a
Aumento de escala				
Controle	---	---	0,349±0,0069 ^a	2,4781±0,1005 ^a
C20	---	---	0,193±0,0257 ^b	2,1909±0,2081 ^a
C40	---	---	0,223±0,0069 ^b	2,1366±0,0422 ^a

---: experimentos com *Scenedesmus obliquus* não foram realizados no aumento de escala. Resultados expressos pela média±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna (em cada etapa) não apresentam diferença significativa frente ao teste de Tukey (p>0,05).

Como apresentado na Tabela 1, os ensaios de *S. obliquus* com cafeína (C20 e C40) apresentaram X_f menores em comparação ao Controle (p<0,05). O ensaio C40 obteve a menor X_f (0,5085±0,0031 g.L⁻¹) seguido de C20 (0,7422±0,0076), demonstrando que conforme o aumento na concentração de cafeína o efeito tóxico no crescimento de *S. obliquus* nos tempos finais foi maior. Segundo Zarrelli et al. (2014), a cafeína não demonstra toxicidade para espécies aquáticas em exposição aguda, sendo necessárias elevadas concentrações do contaminante para surtir efeitos significativos (>150 mg.L⁻¹). Entretanto, os autores avaliaram a toxicidade sobre o crescimento microalgal apenas durante a fase exponencial e o estudo toxicológico apenas em uma fase de crescimento pode resultar na superestimação ou subestimação dos efeitos (Chaithawiwat et al., 2016). Os efeitos toxicológicos podem ser diferentes durante as fases finais do cultivo quando há menor concentração de nutrientes. Isso torna a cafeína potencialmente mais tóxica à microalga em comparação às fases iniciais de crescimento, quando há o crescimento celular exponencial em um meio nutricional mais concentrado. Verifica-se que não ocorreu diferença estatística nos resultados de $\mu_{\text{máx}}$ para *S. obliquus*, reforçando a hipótese de que a cafeína não apresentou toxicidade durante o período exponencial de crescimento.

A adição de cafeína nos cultivos de *S. platensis* não apresentou toxicidade à microalga na Etapa 1 (Figura 1a), visto que não foi observada diferença significativa em X_f e $\mu_{\text{máx}}$ entre os cultivos Controle, C20 e C40 durante os 40 dias de cultivo (Tabela 1). Segundo Pollack et al. (2009), algumas espécies aquáticas são mais resistentes aos efeitos tóxicos da cafeína. Os autores mostraram que diferentes concentrações do contaminante (30, 50 e 75 mg.L⁻¹) foram inibitórias ao crescimento de microalgas endossimbiontes de corais (*Symbiodinium goreau*, *Symbiodinium microadriaticum*, *Symbiodinium* sp, respectivamente).

Entretanto, através dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos nos cultivos de *S. platensis* na Etapa 2 (Tabela 1), nota-se que a adição da cafeína apresentou influência no desenvolvimento da microalga nos tempos iniciais (0-7). Destaca-se o ensaio C20, o qual apresentou fase de adaptação entre 0 e 7 dias, possivelmente devido à presença de cafeína, o que ocasionou em uma menor velocidade específica de crescimento. Ao final dos cultivos, não foi observada diferença estatística para X_f entre Controle, C20

e C40, mostrando que a microalga foi capaz de se desenvolver na presença de cafeína, embora em taxas de crescimento mais baixas. Assim, pode-se levantar a hipótese de a cafeína atuar como fonte de carbono orgânico nos meios de cultivo, visto que as microalgas podem ser cultivadas de maneira mixotrófica (Xiong et al., 2018; Maryjoseph; Ketheesan, 2020). A assimilação da cafeína pode ocorrer através do processo de desmetilação, propiciando o crescimento microbiano (Korekar et al., 2018).

Observa-se que no ensaio Controle da Etapa 2 de *S. platensis* (Figura 1c) a fase de declínio celular ocorreu a partir do 18º dia. Isso pode estar relacionado com a redução nutricional no meio de cultivo à medida que os nutrientes são consumidos ao longo do crescimento das microalgas. Ainda, o declínio celular pode ocorrer devido à elevada concentração de biomassa. A partir de uma determinada densidade celular, há a possibilidade do autossombreamento quando as células se sobrepõem umas às outras afetando a distribuição uniforme de luz e ocasionando morte celular (Temnov et al., 2021; Thulasidharan et al., 2021).

Os resultados dos cultivos da *S. platensis* observado nas Etapas 1 e 2 mostram um maior crescimento microalgal no aumento de escala (Figura 1c) em comparação à escala laboratorial (Figura 1ª). Isso pode ter relação com a intensidade luminosa, uma vez que os cultivos laboratoriais de *S. platensis* (Etapa 1) foram iluminados artificialmente, com uma incidência luminosa de 1800 lux. Já durante o aumento de escala, foi utilizada iluminação natural em estufa de hidroponia, não havendo controle sobre a incidência luminosa ou fotoperíodo. As radiações solares médias nos dias nos quais os ensaios foram realizados estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Radiação solar média nas datas de realização dos ensaios do aumento de escala

Ensaios	Período	Luminosidade
Controle	30/03/2021 a 15/04/2021	24613
C20	16/04/2021 a 14/05/2021	34725
C40	26/02/2021 a 19/03/2021	39130

Luminosidade média considerando as transmissividades da tela anti-granizo (82%) e plástico filme (80%) presentes na estufa de hidroponia. Fontes: Magro (2016) e Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil (2021).

Em ambientes naturais, as intensidades luminosas e fotoperíodos são afetadas em decorrência da sazonalidade, o que influencia os processos fotossintéticos e, conseqüentemente, o crescimento microalgal (Siddiki et al., 2022). Verifica-se que os ensaios C20 e C40 apresentaram crescimento durante um período maior (>25 dias) com menores $\mu_{\text{máx}}$ do que o ensaio Controle (18 dias), embora expostos à luminosidade média maior. Esse fator, associado a possível diminuição ou falta de nutrientes após o 18º dia, pode ocasionar no stress celular dos cultivos microalgais e, dessa forma, a microalga é instigada à excreção de enzimas específicas para a biotransformação da cafeína (Xiong et al., 2018). Assim, pode-se inferir que nos cultivos C20 e C40 da Etapa 2, a *S. platensis* pôde assimilar a cafeína como fonte nutricional, estendendo seu crescimento durante períodos maiores que o ensaio Controle.

3.2 Determinação da concentração de cafeína nos cultivos

Os resultados de quantificação de cafeína nos cultivos C20 e C40 de *S. platensis* e *S. obliquus* da escala laboratorial estão apresentados na Figura 2. No aumento de escala, a microalga *S. platensis* foi cultivada até atingir a fase estacionária e os dados de quantificação de cafeína nesses cultivos estão apresentados na Figura 3.

A Figura 2 mostra que após 40 dias de incubação, *S. obliquus* apresentou eficiências de remoção de cafeína de 10,67% e 13,66% em C20 e C40, respectivamente. Para a *S. platensis* cultivada em escala laboratorial, as eficiências de remoção foram 0,18% em C20 e 12,31% em C40. Esses resultados estão de acordo com o relatado por Matamoros et al. (2016), no qual as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. apresentaram eficiência de remoção de cafeína de 17%. Os autores sugerem a

biodegradação como via de remoção do CE, apresentando as microalgas como potencializadoras da biorremediação.

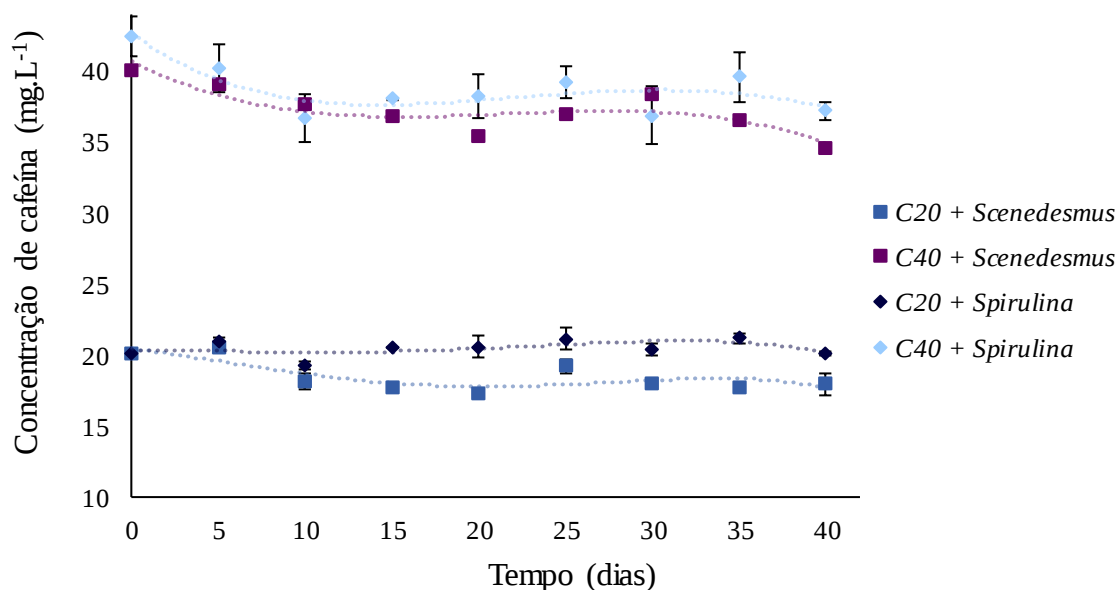


Figura 2: Quantificação de cafeína nos cultivos microalgais ao longo de 40 dias

◆ C20: *S. platensis* e 20 mg.L⁻¹ de cafeína; ◆ C40: *S. platensis* e 40 mg.L⁻¹ de cafeína. ■ C20: *S. obliquus* e 20 mg.L⁻¹ de cafeína; ■ C40: *S. obliquus* e 40 mg.L⁻¹ de cafeína. Resultados expressos pela média±desvio padrão.

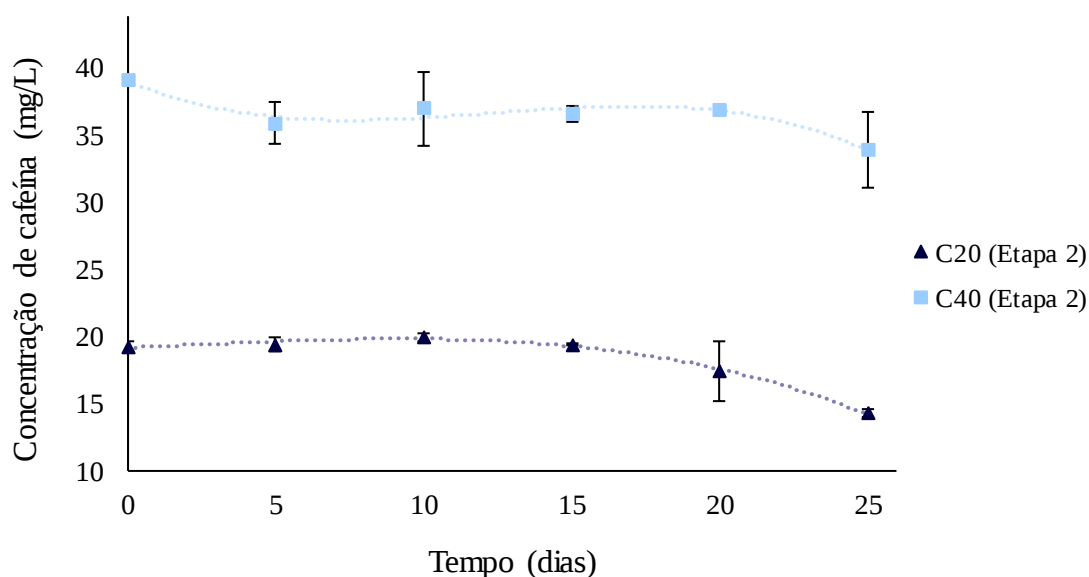


Figura 3: Quantificação de cafeína nos cultivos de *Spirulina platensis* no aumento de escala

▲ C20: Ensaio com adição de 20 mg.L⁻¹ de cafeína; ■ C40: Ensaio com adição de 40 mg.L⁻¹ de cafeína. Resultados expressos pela média±desvio padrão.

A eficiência de remoção de cafeína nos cultivos de *S. platensis* foi mais elevada no aumento de escala (Figura 3), no qual C20 apresentou uma eficiência de remoção de 25,64% e C40 de 13,33%. Isso pode ter relação com a concentração de biomassa, visto que, em comparação aos cultivos laboratoriais, o crescimento microalgal foi mais acentuado. Em estudo de Gojkovic et al. (2019), a remoção de CEs farmacêuticos por diferentes cepas de microalgas aumentou proporcionalmente à concentração final de biomassa dos cultivos. Isso pode ocorrer pela maior demanda de nutrientes conforme o crescimento

celular das microalgas, o que aumenta a possibilidade de remoção das moléculas de CEs. No presente trabalho, os ensaios com maior concentração final de biomassa também apresentaram uma remoção de cafeína mais elevada. Isso corrobora com a afirmação de que maiores concentrações de biomassa favorecem a assimilação de cafeína devido à maior demanda por nutrientes (Gojkovic et al., 2019).

Dentre os processos de biorremediação microalgal, a bioadsorção é o processo menos viável pela estabilidade da cafeína em soluções aquosas ($\log K_{OW}$ de -0,07 a 0,16) e sua não-ionização em água, apresentando baixa afinidade com a célula microalgal (Švorc, 2013; Mojiri et al., 2021). Entretanto, as microalgas podem remover a cafeína através da bioacumulação e posterior biodegradação intracelular ou pela excreção de complexos enzimáticos (biodegradação extracelular) (Matamoros et al., 2016; Xiong et al., 2018).

3.3 Ensaios de fotodegradação

A Figura 4 traz os dados de fotodegradação de cafeína na presença dos meios de cultivo Zarrouk 50% e BG-11, realizados nas mesmas condições luminosas dos cultivos microalgais.

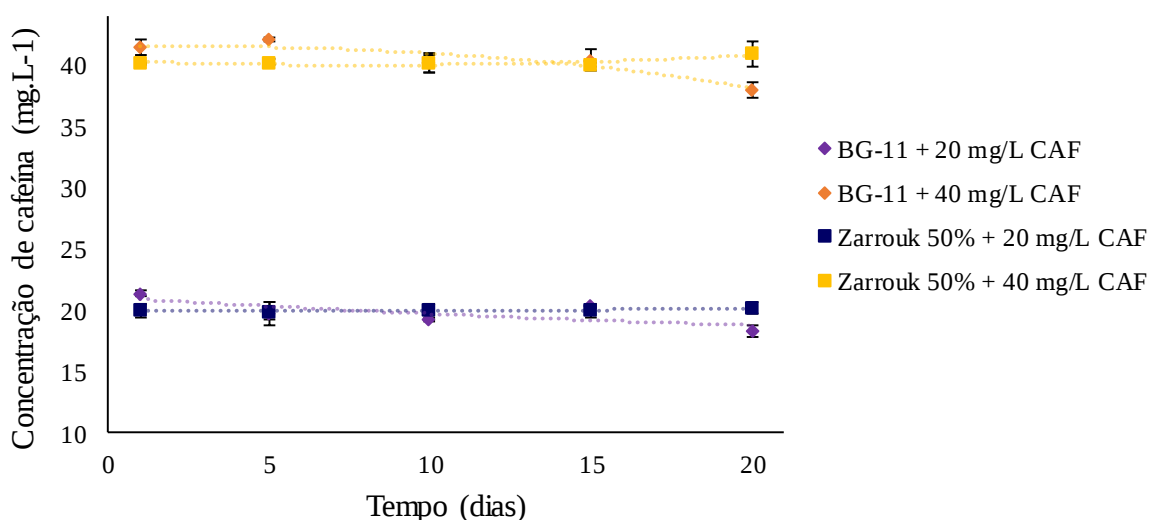


Figura 4: Ensaios de fotodegradação de cafeína nos meios de cultivo

Os ensaios de fotodegradação tiveram duração de 20 dias, pois a partir do 15º dia houve um aumento da turbidez nos meios dos biorreatores, o que acabava influenciando as leituras em espectrofotômetro. Esse aumento de turbidez pode estar relacionado à oxidação dos sais presentes nos meios de cultivo Zarrouk 50% e BG-11.

Alguns agentes fotossensibilizadores, isto é, que induzem a fotodegradação através da formação de espécies reativas de oxigênio, incluem nitratos, carbonatos e sais de ferro (Liu et al., 2021). Todos esses compostos são encontrados nos meios de cultivo de *S. platensis* e *S. obliquus*. Entretanto, nos ensaios realizados na presença dos meios de cultivo de ambas as microalgas, não foi observada fotodegradação da cafeína em 20 dias sob iluminação de LED e luminosidade de 1800 lux. Esses resultados estão de acordo com o exposto por Gojkovic et al. (2019), que observaram uma remoção via fotodegradação entre 0 e 10% para a cafeína. Zhang et al. (2013) afirmam que a cafeína apresenta fotólise sob uma taxa muito baixa no meio ambiente. Ainda, Matamoros et al. (2016), em estudo que avaliou mecanismos de remoção de CEs por microalgas, não observaram fotodegradação para a cafeína e, segundo os autores, a cafeína não é fotodegradável.

3.4 Caracterização da biomassa microalgal

A Tabela 3 apresenta os resultados de carboidratos e proteínas presentes nas biomassas de *S. obliquus* e *S. platensis* durante os cultivos da Etapa 1.

Tabela 3: Caracterização bioquímica das biomassas microalgais em base úmida (escala laboratorial)

Ensaio	<i>Scenedesmus obliquus</i>		<i>Spirulina platensis</i>	
	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
Controle	13,40±0,45 ^b	47,12±0,91 ^b	14,54±0,49 ^a	36,43±0,77 ^b
C20	16,15±0,83 ^a	57,77±0,38 ^a	13,73±0,49 ^{ab}	41,36±0,95 ^a
C40	14,09±0,40 ^b	46,96±0,23 ^b	12,05±0,6 ^b	29,34±0,01 ^c

Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa frente ao teste de Tukey ($p>0,05$).

No aumento de escala (Etapa 2), a biomassa colhida foi submetida à caracterização quanto ao teor de carboidratos, lipídeos, proteínas e cinzas. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a biomassa de *S. platensis* para os ensaios Controle, C20 e C40.

Tabela 4: Caracterização bioquímica da biomassa de *S. platensis* em base seca (aumento de escala)

Ensaio	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)
Controle	17,33±0,41 ^b	39,56±0,37 ^b	2,35±0,40 ^b	21,53±0,66 ^b
C20	11,72±0,29 ^c	41,25±1,59 ^a	5,42±0,03 ^a	22,78±0,01 ^b
C40	21,32±0,58 ^a	34,35±0,32 ^c	1,88±0,33 ^b	31,71±0,57 ^a

Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa frente ao teste de Tukey ($p>0,05$).

Grande parte das microalgas são fontes de proteínas, embora alterações nos cultivos possam induzir alterações na sua composição bioquímica através do acúmulo lipídico ou de carboidratos (Margarites, 2014). Pode-se observar que em ambas as microalgas o acúmulo de proteínas foi elevado em comparação ao teor de carboidratos intracelulares. Os cultivos C20 apresentaram o maior acúmulo de proteínas para ambas as microalgas, com diferença estatística frente aos ensaios Controle e C40. Especificamente para *S. obliquus*, não houve diferença estatística na porcentagem de proteínas entre Controle e C40 ($p>0,05$). O mesmo ocorre para a porcentagem de carboidratos para essa microalga. Já para *S. platensis* o conteúdo proteico foi significativamente diferente entre todos os cultivos, com C20 apresentando os maiores valores, seguido de, respectivamente, Controle e C40. De modo geral, a presença de 20 mg.L⁻¹ de cafeína no cultivo C20 de *S. obliquus* favoreceu a síntese de carboidratos, o que não foi observado para a maior concentração do contaminante em C40. Além disso, os teores de proteínas de *S. obliquus* foram semelhantes aos obtidos por Rempel et al. (2021b) ao cultivar essa microalga na presença de 30 e 50 mg.L⁻¹ de cafeína.

Em relação aos cultivos com *S. platensis*, conforme o aumento da concentração de cafeína, ocorreu a diminuição dos teores de carboidratos das biomassas em escala laboratorial (Tabela 3). Todavia, no aumento de escala (Tabela 4), o cultivo C40 apresentou o maior teor de carboidratos, enquanto C20 apresentou o maior teor lipídico entre as biomassas ($p<0,05$). Isso pode ter acontecido devido ao estresse celular ocasionado pela intensidade luminosa, em conjunto com a presença de cafeína nos cultivos e a redução nutricional nos tempos finais de cultivo (acima de 18 dias). Como a microalga não está adaptada ao meio com esse contaminante, há uma indução na formação de compostos de armazenamento como os carboidratos (Debnath et al., 2021). Assim, esses microrganismos adaptam seu metabolismo às diferentes condições ambientais, favorecendo a síntese de compostos de armazenamento energético como carboidratos e lipídeos (Margarites, 2014; Rempel et al., 2021b).

Quanto ao teor de cinzas apresentado pelos ensaios Controle, C20 e C40 da *S. platensis* na Etapa 2, verifica-se valores acima de 20% para todos os cultivos. Segundo Sossella et al. (2020), o teor de

cinzas para biomassa de *S. platensis* é de aproximadamente 10%. Com isso, pode-se inferir que os altos teores de cinzas obtidos podem ser devido às frações residuais de nutrientes presentes no meio de cultivo na forma de sais, os quais podem ser carregados após a separação da biomassa e quantificados na forma de cinzas (Sossella et al., 2020).

O nitrogênio é um macronutriente essencial para o desenvolvimento de microalgas, regulando suas atividades metabólicas e favorecendo a síntese de proteínas (Yakoob et al., 2021). Como o acúmulo de proteínas para as biomassas de ambas as microalgas foi elevado, pode-se inferir que não ocorreu a falta desse macronutriente nos meios de cultivo. Dessa forma, como os teores de proteínas nas biomassas de ambas as microalgas foram elevados para todos os cultivos, pode-se sugerir a aplicação desta biomassa para a geração de biocombustíveis como o biometano ou na síntese de biofertilizantes, após a avaliação da necessidade de um pré-tratamento devido à possível presença de cafeína nas biomassas (Rempel et al., 2021b).

4. CONCLUSÃO

As microalgas *S. platensis* e *S. obliquus* apresentaram capacidade de crescimento em um meio contendo elevadas concentrações de cafeína (20 e 40 mg.L⁻¹) ao longo de até 40 dias. As concentrações finais de biomassa e velocidades específicas máximas de crescimento obtidas evidenciaram a capacidade das microalgas de se adaptarem à presença do contaminante. Pode-se destacar os ensaios com a *S. platensis* devido ao elevado crescimento da microalga nos cultivos tanto em escala laboratorial ($X_{\text{máx}} = 0,9412 \pm 0,0219$ g.L⁻¹ para C20) quanto no aumento de escala ($X_{\text{máx}} = 2,4781 \pm 0,1005$ g.L⁻¹ para Controle).

As eficiências de remoção de cafeína apresentadas pelas microalgas foram de até 25% e os ensaios em que a microalga apresentou maior crescimento celular obtiveram as maiores remoções, demonstrando a capacidade das cepas em utilizar a cafeína como fonte de nutrientes. Não foi observada fotodegradação, o que corrobora com a literatura de que a cafeína não é fotodegradável.

Para os ensaios de caracterização da composição química, verificou-se que a presença de cafeína induziu o acúmulo de proteínas em ambas as etapas. Destaca-se o ensaio C20 de *S. obliquus* (Etapa 1) que apresentou teor de proteínas de $57,77 \pm 0,38\%$. O elevado acúmulo de proteínas nas biomassa torna-se interessante para aplicações como a geração de biometano ou biofertilizantes, embora sejam necessários estudos devido à possível presença de cafeína nessas biomassas.

O uso das microalgas *S. platensis* e *S. obliquus* mostra-se relevante para a remoção de cafeína em efluentes contaminados, visto que apresentaram resistência às concentrações bastante elevadas em comparação às encontradas no meio ambiente, além da capacidade de remover o contaminante ao longo dos cultivos. Além disso, a remoção de cafeína por microalgas gera biomassas com potencial para a geração de outros produtos, podendo auxiliar para a viabilidade desse processo, mas havendo a necessidade de outros estudos a fim de melhorar as eficiências de remoção.

5. REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; BANAT, F.; ALSAFAR, H.; HASAN, S. W. Algae biotechnology for industrial wastewater treatment, bioenergy production, and high-value bioproducts. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 150585, 2022.

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.

CHAITHAWIWAT, K.; VANGNAI, A.; MCEVOY, J. M.; PRUESS, B.; KRAJANGPAN, S.; KHAN E. Impact of nanoscale zero valent iron on bacteria is growth phase dependent. **Chemosphere**, v. 144, p. 352-359, 2016.

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty Acids Profile of *Spirulina platensis* Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, p. 55-59, 2004.

DANESHVAR, E.; ZARRINMEHR, M. J.; HASHTJIN, A. M.; FARHADIAN, O.; BHATNAGAR, A. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. **Bioresource Technology**, v. 268, p. 523-530, 2018.

DEBNATH, C.; BANDYOPADHYAY, T.; BHUNIA, B.; MISHRA, U.; NARAYANASAMY, S.; MUTHURAJ, M. Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111464, 2021.

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.

FEKADU, S.; ALEMAYEHU, E.; DEWIL, R.; VAN DER BRUGGEN, B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of the Total Environment**, v. 654, p. 324-337, 2019.

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.

GRUHLIK, Y.; LINGE, K.; JOLL, C. Removal of organic micropollutants in waste stabilisation ponds: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 202-214, 2018.

HIDAYATI, N. V.; SYAKTI, A. D.; ASIA, L.; LEBARILLIER, S.; KHABOUCI, I.; WIDOWATI, I.; SABDONO, A.; PIRAM, A.; DOUMENQ, P. Emerging contaminants detected in aquaculture sites in Java, Indonesia. **Science of the Total Environment**, v. 773, p. 145057, 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª ed, v. 1, São Paulo, 1985.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA DO BRASIL – INMET. **Dados meteorológicos - Tabela de Dados das Estações**. Disponível em: tempo.inmet.gov.br. Acesso em 22 de nov. de 2020.

KOREKAR, G.; KUMAR, A.; UGALE, C. Occurrence, fate, persistence and remediation of caffeine: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-19, 2019.

LIU, R.; LI, S.; TU, Y.; HAO, X. Capabilities and mechanisms of microalgae on removing micropollutants from wastewater: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 285, p. 112149, 2021.

LOPERA, A. E.; RUIZ, S. G.; ALONSO, J. M. Q. Removal of emerging contaminants from wastewater using reverse osmosis for its subsequent reuse: Pilot plant. **Journal of Water Process Engineering**, v. 29, p. 100800, 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.

MAGRO, F. G. **CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM RACEWAYS PARA A OBTENÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

MAGRO, F. G.; FREITAG, J. F.; BERGOLI, A.; CAVANHI, V. A. F.; COLLA, L. M. Microalgae consortia cultivation using effluents for bioproduct manufacture. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 20, p. 865-886, 2021.

MARGARITES, A. C. F. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

MARYJOSEPH, S.; KETHEESAN, B. Microalgae based wastewater treatment for the removal of emerging contaminants: A review of challenges and opportunities. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 2, p. 100046, 2020.

MATAMOROS, V.; GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 288, p. 34-42, 2015.

MATAMOROS, V.; UGGETI, 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.

MOJIRI, A.; ZHOU, J. L.; RATNAWEERA, H.; REZANIA, S.; V, M. N. Pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and their removal by algae-based systems. **Chemosphere**, p. 132580, 2021.

NIE, J.; SUN, Q.; ZHOU, Y.; KUMAR, M.; USMAN, M.; LI, J.; SHAO, J.; WANG, L.; TSANG, D. C. W. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research. **Science of the Total Environment**, v. 707, p. 136080, 2020.

OLIVEIRA, M.; ATALLA, A. A.; FRIHLING, B. E. F.; CAVALHERI, P. S.; MIGLIOLO, L.; FILHO, F. J. C. M. Ibuprofen and caffeine removal in vertical flow and free-floating macrophyte constructed wetlands with *Heliconia rostrata* and *Eichornia crassipes*. *Chemical Engineering Journal*, v. 373, p. 458-467, 2019.

PATEL, M.; KUMAR, R.; KISHOR, K.; MLSNA, T.; PUTTMAN, C. U.; MOHAN, D. Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects and Removal Methods. **Chemical Review**, v. 119, p. 3510-3673, 2019.

PEÑA-GUZMÁN, C.; ULLOA-SÁNCHEZ, S.; MORA, K.; HELENA-BUSTOS, R.; LOPEZ-BARRERA, E.; ALVAREZ, J.; RODRIGUEZ-PINZÓN, M. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 408-423, 2019.

POLLACK, K.; BALAZS, K.; OGUNSEITAN, O. Proteomic assessment of caffeine effects on coral symbionts. **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 2085-2091, 2009

RAVI, S.; CHOI, Y.; CHOE, J. K. Novel phenyl-phosphate-based porous organic polymers for removal of pharmaceutical contaminants in water. **Chemical Engineering Journal**, v. 379, p. 122290, 2020.

REMPEL, A.; GUTKOSKI, J. P.; NAZARI, M. T.; BIOLCHI, G. N.; CAVANHI, V. A. F.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Current advances in microalgae-based bioremediation and other technologies for emerging contaminants treatment. **Science of The Total Environment**, p. 144918, 2021a.

REMPEL, A.; BIOLCHI, G. N.; ANTUNES, A. C. F.; GUTKOSKI, J. P.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Cultivation of Microalgae in Media Added of Emergent Pollutants and Effect on Growth, Chemical Composition, and Use of Biomass to Enzymatic Hydrolysis. **Bioenergy Research**, v. 14, p. 265-277, 2021b.

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.

RODRÍGUEZ-GIL, J.; CÁCERES, N.; DAFOUZ, R.; VALCÁRCEL, Y. Caffeine and paraxanthine in aquatic systems: Global exposure distributions and probabilistic risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1058-1071, 2018.

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M.; PERALTA-HERNANDEZ, J. M.; GOONETILLEKE, A.; BANDALA, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361-380, 2017.

SIDDIKI, S. Y. A.; MOFIJUR, M.; KUMAR, P. S.; AHMED, S. F.; INAYAT, A.; KUSUMO, F.; BADRUDDIN, I. A.; KHAN, T. M. Y.; NGHIEM, L. D.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, p. 121782, 2022.

SOSSELLA, F. S.; REMPEL, A.; NUNES, J. M. A.; BIOLCHI, G.; MIGLIAVACA, R.; ANTUNES, A. C. F.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Effects of harvesting *Spirulina platensis* biomass using coagulants and electrocoagulation–flotation on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123523, 2020.

SOUSA, M. L.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F.; POMPEO, M. L. M. Caffeine as a contaminant of periphyton: ecological changes and impacts on primary producers. **Ecotoxicology**, v. 30, p. 599-609, 2021.

SUTHERLAND, D. L.; HEUBECK, S.; PARK, J.; TURNBULL, M. H.; CRAGGS, R. J. Seasonal performance of a full-scale wastewater treatment enhanced pond system. **Water Research**, v. 136, p. 150-159, 2018.

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

ŠVORC, L. Determination of Caffeine: A Comprehensive Review on Electrochemical Methods. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 5755-5773, 2013.

TEMNOV, M.; USTINSKAYA, Y.; ESKOVA, M.; MERONYUK, K.; GOLUBYATNIKOV, O.; DVORETSKY, S.; DVORETSKY, D. Analysing the Influence of Cultivation Conditions on the Activity of Metabolic Pathways of Bcaa Biosynthesis in *Chlorella Vulgaris* Microalgae. **Chemical Engineering Transactions**, v. 86, p. 169-174, 2021.

TEODOSIU, C.; GILCA, A. F.; BARJOVEANU, G.; FIORE, S. Emerging pollutants removal through advanced drinking water treatment: a review on processes and environmental performances assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 197, p. 1210-1221, 2018.

THULASIDHARAN, D.; ARUMUGAM, A.; UPPULURI, Kiran Babu. Research and economic perspectives on an integrated biorefinery approach for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and biohydrogen. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], Novembro, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.025>

TOUSOVA, Z.; FROMENT, J.; OSWALD, P.; SLOBODNÍK, J.; HILSCHEROVA, K.; THOMAS, K. V.; TOLLEFSEN, K. E.; REID, M.; LANGFORD, K.; BLAHA, L. Identification of algal growth inhibitors in treated waste water using effect-directed analysis based on non-target screening techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 358, p. 494-502, 2018.

VASSALLE, L.; SUNYER-CALDÚ, A.; UGGETTI, E.; DÍEZ-MONTERO, R.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; GÁRCIA, J.; GÁRCIA-GALÁN, M. J. Bioremediation of emerging micropollutants in irrigation water. The alternative of microalgae-based treatments, **Journal of Environmental Management**, v. 274, p. 111081, 2020.

VIEIRA, L. R.; SOARES, A. M. V. M.; FREITAS, R. Caffeine as a contaminant of concern: A review on concentrations and impacts in marine coastal systems. **Chemosphere**, v. 286, p. 131675, 2022.

WANG, C.; MOORE, N.; BIRCHER, K.; ANDREWS, S.; HOFMANN, R. Full-scale comparison of UV/H₂O₂ and UV/Cl₂ advanced oxidation: The degradation of micropollutant surrogates and the formation of disinfection byproducts. **Water Research**, v. 161, p. 448-458, 2019.

XIONG, J.; KURADE, M. B.; JEON, B. Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1251-1257, 2017a.

XIONG, J. Q.; KURADE, M. B.; JEON, B. H. Can microalgae remove pharmaceutical contaminants from water? **Trends in biotechnology**, v. 36, p. 30-44, 2018.

XIONG, J. Q.; JU, L. X.; LIU, Y. S.; ZHAO, J. L.; HE, L. Y.; YING, G. G. Microalgae-based technology for antibiotics removal: From mechanisms to application of innovational hybrid systems. **Environment International**, v. 155, p. 106594, 2021.

YAKOOB, M. A.; MOHAMED, R. M. S. R.; AL-GHEETI, A.; GOKARE.; AMBATI, R. R. Influence of Nitrogen and Phosphorus on Microalgal Growth, Biomass, Lipid, and Fatty Acid Production: An Overview, **Cells**, v. 10, p. 393, 2021.

YÜCETEPE, A.; SAROĞLU, Ö.; ÖZÇELİK, B. Response surface optimization of ultrasound-assisted protein extraction from *Spirulina platensis*: investigation of the effect of extraction conditions on techno-functional properties of protein concentrates. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 3282-3292, 2019.

ZARRELLI, A.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; LAVORGNA, M.; TEMUSSI, F.; SCHIAVONE, L.; CRISCUOLO, E.; PARRELLA, A.; PREVITERA, L.; ISIDORI, M. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, p. 453-458, 2014.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une Cyanophyce**: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*. Tese (Doutorado). Universidade de Paris, Paris, 1966.

ZERAATKAR, A. K.; AHMADZADEH, H.; TALEBI, A. F.; MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 817-831, 2016.

ZHANG, D. Q.; HUA, T.; GERSBERG, R. M.; ZHU, J.; NG, W. J.; TAN, S. K. Fate of caffeine in mesocosms wetland planted with *Scirpus validus*. **Chemosphere**, v. 90, p. 1568-1572, 2013.