

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tecnologias emergentes para cultivo e colheita de microalgas: co-tratamento de efluentes para adequação da razão C/N e otimização da eletrocoagulação

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira
Doctor Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025

ALEXIA SALEME AONA DE PAULA PEREIRA

Tecnologias emergentes para cultivo e colheita de microalgas: co-tratamento de efluentes para adequação da razão C/N e otimização da eletrocoagulação

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Lucia Calijuri

Coorientador: Eduardo de Aguiar do Couto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P436t
2025

Pereira, Alexia Saleme Aona de Paula, 1994-

Tecnologias emergentes para cultivo e colheita de microalgas: co-tratamento de efluentes para adequação da razão C/N e otimização da eletrocoagulação / Alexia Saleme Aona de Paula Pereira. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (201 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Civil, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.389>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico.
2. Água - Purificação - Coagulação.
3. Algas - Cultura e meios de cultura.
4. Biomassa. I. Calijuri, Maria Lúcia, 1955-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. III. Título.

CDD 22. ed. 628.3

ALEXIA SALEME AONA DE PAULA PEREIRA

Tecnologias emergentes para cultivo e colheita de microalgas: co-tratamento de efluentes para adequação da razão C/N e otimização da eletrocoagulação

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de março de 2025.

Assentimento:

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira
Autora

Maria Lucia Calijuri
Orientadora

Essa tese foi assinada digitalmente pela autora em 06/06/2025 às 17:48:35 e pela orientadora em 06/06/2025 às 18:09:20. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **2JDE.DNTL.T1WA** e clique no botão 'Validar documento'.

A Deus,
aos meus pais e irmãos,
e ao meu amor, Otávio.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Toda chegada é fim de um caminho. Durante a construção deste trabalho, sempre estive bem acompanhada e, por isso, nada é mais honroso do que lembrar e agradecer aqueles que estiveram ao meu lado, oferecendo seu apoio, incentivo e companhia ao longo dessa jornada.

Agradeço primeiramente a Deus, que me iluminou durante toda a caminhada e permitiu que tudo fosse possível.

Ao meu pai, Alex Sandro de Paulo Pereira, e à minha mãe, Eduarda Mytsue Saleme Aona Pereira, por serem a base da minha vida, por acreditarem no meu potencial e por compreenderem os momentos em que estive fisicamente distante. Saibam que, mesmo longe, vocês sempre estiveram presentes em meu coração e pensamento.

Aos meus irmãos, Eduardo Saleme Aona de Paula Pereira e Alice Saleme Aona de Paula Pereira, por trazerem leveza e alegria à minha vida, seja nos momentos de festa em família ou nas videochamadas que encurtam a distância.

Ao meu amigo, meu amor e companheiro, Otávio Simões Silveira, por ser meu porto seguro, me trazer paz e tranquilidade e por estar sempre ao meu lado, incentivando a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus avós maternos, Maria da Penha Saleme Aona e Masashi Aona, e aos meus avós paternos, Maria Aparecida de Paula Pereira e Walter Francisco Pereira, que estiveram presentes ao longo desta caminhada ou vivem em meu coração: vocês estão eternizados em minha memória. Estendo também meu agradecimento a todos os meus tios e primos, que sempre me enviaram boas energias e me motivaram a seguir em frente.

À professora Maria Lúcia Calijuri por sua orientação, pela confiança e por me ensinar não apenas o conteúdo acadêmico, mas o valor da persistência e da busca pela excelência. Sua expertise e visão crítica me motivaram a superar desafios e a aprimorar minha capacidade de pesquisa.

Ao professor Eduardo de Aguiar do Couto e à professora Paula Peixoto Assemany, pela paciência e por compartilharem generosamente seus conhecimentos ao longo de todo este processo. A colaboração e incentivo constante de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que cruzaram o meu caminho, começando pelos que me ensinaram dentro de casa (minhas avós, mãe e tia/madrinha), passando pelos professores da minha infância, ensino fundamental, ensino médio, professores da UFV e por tantos outros que

me acolheram e compartilharam seus conhecimentos ao longo da minha trajetória. Vocês me mostraram o poder transformador da educação, e sem o apoio de cada um de vocês, eu não teria alcançado este momento.

À Iara Barbosa Magalhães e ao Thiago Abrantes Silva, pela amizade, cumplicidade e apoio durante a elaboração desta pesquisa. Sem vocês, eu não teria chegado tão longe nem seria tão feliz. Quem tem amigos, tem tudo.

Ao Arthur, Jéssica, Juliana, Matheus, Ana Paula, Bruno, Letícia e Nayara por serem amigos tão especiais ao longo dessa jornada. A companhia de vocês tornou tudo mais leve e divertido.

Aos demais amigos do SIGEOnpa, pelas conversas descontraídas durante o café e por compartilharem a rotina comigo.

Aos estagiários e servidores do LESA, pela amizade, apoio e parceria durante os dias no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, pela oportunidade de realizar este doutorado e pelo suporte acadêmico que contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desta jornada.

Por fim, expressei minha gratidão a todas as pessoas que, mesmo não mencionados nominalmente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Meu sincero e profundo agradecimento!

E, novamente, obrigada DEUS, Senhor da minha vida e do meu destino. Obrigada, muito obrigada!

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"A ciência não é apenas um
conjunto de conhecimentos,
mas uma maneira de pensar"
Carl Sagan

RESUMO

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2025. **Tecnologias emergentes para cultivo e colheita de microalgas: co-tratamento de efluentes para adequação da razão C/N e otimização da eletrocoagulação.** Orientadora: Maria Lucia Calijuri. Coorientador: Eduardo de Aguiar do Couto.

Esta tese investigou estratégias emergentes para o cultivo e colheita de biomassa de microalgas, visando à valorização de águas residuárias e geração de biocompostos de interesse econômico. Inicialmente, o Capítulo I apresenta o estado da arte sobre cultivo de biomassa em águas residuárias, abordando diferentes estratégias para aumento da produção e acúmulo de metabólitos. Adicionalmente, a revisão explora técnicas emergentes para a colheita de biomassa cultivadas em águas residuárias, como a eletrocoagulação (EC), apresentando benefícios e limitações do processo, além das principais oportunidades de pesquisa. No Capítulo II, foi analisado o impacto da razão mássica carbono/nitrogênio (C/N, m/m) no cultivo de biomassa microalgal, utilizando uma combinação de águas residuárias municipais com águas residuárias industriais do processamento de sucos. A pesquisa foi realizada em escala de bancada, visando determinar as proporções de águas residuárias que proporcionam o melhor desempenho no cultivo e acúmulo de biocompostos. Os resultados mostraram que as razões C/N de 30,67 e 7,52 resultaram nas maiores concentrações de Clorofila-a, sendo 1,47 e 1,54 vezes superiores às observadas no cultivo realizado exclusivamente com águas residuárias municipais (razão C/N de 1,75). Adicionalmente, a razão C/N elevada (30,67) favoreceu o acúmulo de lipídios (26,39%) e carboidratos (30,07%), enquanto C/N moderada (7,52) aumentou a fração proteica (33,00%). Em uma abordagem de aumento de escala, o Capítulo III investiga os efeitos da razão C/N no cultivo em escala piloto, usando lagoas de alta taxa. Avaliaram-se diferentes razões C/N (9,65; 25,31; 52,71), através da combinação de águas residuárias municipais com águas residuárias industriais. A menor razão C/N apresentou teor de proteínas superior (25,37%), enquanto a maior razão C/N proporcionou maior produção de ácidos graxos para C16:0 (40,39%) e C18:0 (10,08%), destacando seu potencial para produção de biocombustíveis. Essas descobertas reforçam a relevância do ajuste da razão C/N conforme o objetivo pretendido, seja para rotas energéticas ou agrícolas. Nos Capítulos IV e V, estudou-se a otimização da EC como tecnologia de colheita. O Capítulo IV avaliou o impacto de parâmetros operacionais (pH, densidade de corrente e tempo) na eficiência de colheita e na concentração de Alumínio na água residual

do processo. Os melhores resultados (até 92,61% de eficiência de colheita) ocorreram em pH 8, com 5 A e 7 minutos de operação. Posteriormente, a Metodologia de Superfície de Resposta (Capítulo V) permitiu encontrar a combinação de parâmetros operacionais que maximiza a eficiência de colheita (~75%) e minimiza a contaminação por alumínio. Além disso, a avaliação de ciclo de vida indicou o consumo energético como a principal fonte de impacto, recomendando o uso de energias renováveis para mitigação. Em síntese, esta tese demonstra que o ajuste da razão C/N, por meio da mistura de diferentes águas residuárias, pode aumentar a produção e o acúmulo de compostos de alto valor em microalgas, ao mesmo tempo em que aprimora a remoção de poluentes. Aliada a processos de eletrocoagulação otimizados, a abordagem proposta contribui para viabilizar a biotecnologia algal, criando uma alternativa sustentável no tratamento de efluentes e na obtenção de bioprodutos.

Palavras-chave: Tratamento de águas residuárias; Biomassa de microalgas; Recuperação de Recursos; Razão C/N; Eletrocoagulação; Avaliação do Ciclo de Vida

ABSTRACT

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2025. **Emerging Technologies for Microalgae Cultivation and Harvesting: Co-Treatment of Effluents for C/N Ratio Adjustment and Electrocoagulation Optimization.** Adviser: Maria Lucia Calijuri. Co-adviser: Eduardo de Aguiar do Couto.

This thesis investigated emerging strategies for microalgae biomass cultivation and harvesting, aiming to valorize wastewater and generate economically valuable biocompounds. Initially, Chapter I presents the state of the art of biomass cultivation in wastewater, addressing different strategies to enhance production and metabolite accumulation. Additionally, the review explores emerging techniques for harvesting biomass grown in wastewater, such as electrocoagulation-flotation (ECF), discussing the benefits and limitations of the process, as well as key research opportunities. In Chapter II, the impact of the carbon/nitrogen (C/N, m/m) ratio on microalgal biomass cultivation was analyzed by combining municipal wastewater with industrial wastewater from juice processing. The experiments were conducted at bench scale to determine which proportions of wastewater yield the best cultivation performance and biocompound accumulation. The results showed that C/N ratios of 30.67 and 7.52 led to the highest Chlorophyll-a concentrations, 1.47 and 1.54 times higher than those observed in cultivation carried out exclusively with municipal wastewater (C/N ratio of 1.75). Furthermore, a high C/N ratio (30.67) favored lipid (26.39%) and carbohydrate (30.07%) accumulation, whereas a moderate C/N ratio (7.52) increased the protein fraction (33.00%). Adopting a larger scale approach, Chapter III investigates the effects of the C/N ratio on pilot-scale cultivation using high-rate ponds. Different C/N ratios (9.65; 25.31; 52.71) were evaluated by combining municipal wastewater with industrial wastewater. The lowest C/N ratio achieved higher protein content (25.37%), whereas the highest C/N ratio promoted greater production of fatty acids for C16:0 (40.39%) and C18:0 (10.08%), demonstrating potential for biofuel production. These findings reinforce the importance of adjusting the C/N ratio according to the desired goal, whether for energy or agricultural routes. In Chapters IV and V, the optimization of ECF as a harvesting technology was studied. Chapter IV evaluated the impact of operational parameters (pH, current density, and time) on harvesting efficiency and aluminum concentration in the residual water. The best results (up to 92.61% harvesting efficiency) were obtained at pH 8, with 5 A and 7 minutes of operation. Subsequently, the Response Surface Methodology (Chapter V) identified the combination of operational parameters that maximizes harvesting efficiency (~75%)

and minimizes aluminum contamination. Moreover, the life cycle assessment indicated energy consumption as the main source of impact, highlighting the recommendation to use renewable energy for mitigation. In summary, this thesis demonstrates that adjusting the C/N ratio by mixing different wastewaters can increase microalgae production and the accumulation of high-value compounds, while also improving pollutant removal. Combined with optimized electrocoagulation-flotation processes, the proposed approach contributes to making algal biotechnology feasible, providing a sustainable alternative for wastewater treatment and bioproduct generation.

Keywords: Wastewater treatment; Microalgae biomass; Resource recovery; C/N ratio; Electrocoagulation; Life cycle assessment

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----|
| Figure 4.1. Strategies for enhancing microalgae biomass production and biocompounds accumulation. | 30 |
| Figure 4.2. Overview of innovative microalgae biomass harvesting technologies. | 48 |
| Figure 5.1. The effects of carbon/nitrogen ratio on removal efficiencies of the $N-NH_4^+$, SP, COD_t , COD_s , TDC, DIC and DOC. | 88 |
| Figure 5.2. Environmental conditions throughout the experimental period. (a) dissolved oxygen, (b) pH, and (c) air temperature (Max T and Min T) and sample temperature (Sample T)..... | 88 |
| Figure 5.3. Monitoring of Chlorophyll-a concentration ($mg L^{-1}$) and total carotenoids ($mg L^{-1}$) throughout the experiment period. | 93 |
| Figura 6.1. LATs no início (A, B e C) e final (D, E e F) da operação, com C/N igual a 9,65; 25,31 e 52,71, respectivamente. | 117 |
| Figura 6.2. Comunidade fitoplanctônica em termos de abundância relativa de indivíduos (A) e biovolume (B). | 121 |
| Figura 6.3. Histoquímica da biomassa de microalgas cultivadas em razão C/N 9,65 (A, B e C); 25,31 (D, E e F) e 52,71 (G, H e J) em fotomicroscópio Olympus BX53, usando uma objetiva de 100X. Coloração de azul de bromofenol de mercúrio para a detecção de proteínas totais (A, D e G); Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos (B, E e H); Coloração de azul do Nilo para detecção de lipídios totais (C, F e J). As setas contínuas indicam os autoesporângio, e as células pontilhadas indicam células novas..... | 123 |
| Figura 6.4. Monitoramento do pH (A), OD (B), Clorofila-a (C) e SSV (D) ao longo do período experimental..... | 124 |
| Figura 6.5. Remoção de $N-NO_3^-$ (A); $N-NH_4^+$ (B); CTD (C); COD (D) e CID (E) ao longo do tempo. | 126 |
| Figura 6.6. Perfil de ácidos graxos da BM cultivadas em diferentes proporções de ARM e ARIS (A) e proporção de ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (B). | 136 |
| Figura 7.1. Electrocoagulation performance in terms of harvesting efficiency (A, B, and C) and aluminum content (D, E, and F) with respect to the parameters observed in the study (electric current, pH, and time)..... | 151 |
| Figura 8.1. Esquema da eletrocoagulação. | 154 |

| | |
|---|-----|
| Figura 8.2 (a) Área Experimental, (b) Dimensões da LAT utilizada para a produção de biomassa de microalgas..... | 156 |
| Figura 8.3. Reator de eletrocoagulação e fonte de alimentação DC (A); e as dimensões do eletrodo de alumínio..... | 158 |
| Figura 8.4. Limite do sistema da avaliação do ciclo de vida..... | 163 |
| Figura 8.5. Gráfico de contorno das variáveis de resposta eficiência de colheita (DO e SST), remoção de DQO, teor de alumínio na fase líquida (Al_{Liq}) e na biomassa (Al_{Bio}) em função de diferentes parâmetros de operação. | 167 |
| Figura 8.6. Potencial zeta e condutividade após os ensaios de EC, em diferentes valores de pH..... | 171 |
| Figura 8.7. Dendrograma de ligação de Ward..... | 174 |
| Figura 8.8. Resultados normalizados a <i>nível mid point</i> (A) e <i>end point</i> (B), para os cenários avaliados: Colheita otimizada (C1); Colheita otimizada + energia fotovoltaica (C2); Colheita não otimizada (C3); Colheita não otimizada + energia fotovoltaica (C4). | 179 |
| Figura 8.9. Pontuação única, a nível <i>end point</i> , para os cenários avaliados: Colheita via EC otimizada (C1); Colheita via EC otimizada + energia fotovoltaica (C2); Colheita via EC não otimizada (C3); Colheita Via EC não otimizada + energia fotovoltaica (C4)... | 181 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Table 4.1. Cultivation strategies for microalgae biomass and main biocompounds produced. | 31 |
| Table 4.2. Microalgae biomass harvesting technologies. | 49 |
| Table 5.1. Main characteristics of the wastewaters containing different proportions of domestic and juice industry wastewaters. | 83 |
| Table 5.2. Average concentration (mg L^{-1}) and productivity ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) of VSS, Chlorophyll-a, and concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) of beta-carotene and lutein. | 92 |
| Table 5.3. Characterization of dry biomass in terms of Ultimate analysis, Proximate analysis, and Biochemical composition. | 98 |
| Table 5.4 Fatty acid methyl esters (FAME) profile of microalgae biomass cultivated in different proportions of municipal wastewater and industrial wastewater from juice processing (A) and proportion of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated acids (B). | 101 |
| Tabela 6.1. Características físicas e químicas dos meios de cultivos. | 116 |
| Tabela 6.2. Parâmetros cinéticos de remoção de carbono total dissolvido, ao longo dos primeiros 30 dias de experimento. | 129 |
| Tabela 6.3. Característica da biomassa de microalgas em termos de composição bioquímica, análise imediata e análise elementar. | 132 |
| Tabela 8.1. Características físicas e químicas das águas residuárias brutas, misturadas (60% ARM + 40% ARIS) e após o tratamento em lagoas de alta taxa. | 157 |
| Tabela 8.2. Delineamento rotacional composto central usado para avaliar a eletrocoagulação da biomassa de microalgas. | 160 |
| Tabela 8.3. Resultados da eletrocoagulação para colheita de microalgas em função dos parâmetros operacionais avaliados. | 165 |
| Tabela 8.4. Equações de regressão para as variáveis respostas. | 166 |
| Tabela 8.5. Matriz de correlação de Pearson pareadas. | 172 |
| Tabela 8.6. Cargas fatoriais rotacionadas e itens comuns rotação Varimax. | 173 |
| Tabela 8.7. Coeficientes de determinação dos modelos de fator 1 (F1) e do fator 2 (F2). | 175 |
| Tabela 8.8. Inventário de Ciclo de Vida dos cenários. | 178 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|---|
| ACV | Avaliação do Ciclo de Vida |
| Al | Alumínio |
| Al _{Bio} | Alumínio na Biomassa |
| Al _{Liq} | Alumínio na fase Líquida |
| ARIS | Água Residual Industrial do Setor de Sucos |
| ARM | Água Residuária Municipal |
| C | Carbono |
| C14:0 | Ácido Mirístico |
| C16:0 | Ácido Palmítico |
| C18:0 | Ácido Esteárico |
| C18:1 | Ácido Oleico |
| C18:2 | Ácido Linoleico |
| C18:3 | Ácido γ -Linolênico |
| CE | Condutividade Elétrica |
| CID | Carbono Inorgânico Dissolvido |
| COD | Carbono Orgânico Dissolvido |
| CTD | Carbono Total Dissolvido |
| DQO | Demanda Química de Oxigênio |
| EC | Eletrocoagulação |
| FAME | Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (Fatty Acid Methyl Esters) |
| Fe | Ferro |
| H | Hidrogênio |
| H ₂ | Gás hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| IJW | Industrial Juice Wastewater |
| LAT | Lagoas de Alta Taxa |
| Mg | Magnésio |
| MUFAs | Ácidos graxos monoinsaturados |
| MW | Municipal Wastewater |
| N | Nitrogênio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NKT | Nitrogênio Total Kjeldahl |
| N-NH ₄ ⁺ | Nitrogênio Amoniacal |

N-NO₃⁻ Nitrogênio Nitrato
N_{org} Nitrogênio Orgânico
O Oxigênio
O₂ Gás oxigênio
OD Oxigênio Dissolvido
P Fósforo
PAS Ácido Periódico de Schiff (Periodic Acid-Schiff)
pH Potencial Hidrogeniônico
P_s Fósforo Solúvel
P_T Fósforo Total
PUFAs Ácidos graxos poli-insaturados (Polyunsaturated Fatty Acids)
S Enxofre
SFAs Ácidos graxos saturados (Saturated Fatty Acids)
SST Sólidos em Suspensão Totais
SSV Sólidos Suspensos Voláteis
TDC Carbono Dissolvido Total

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| APRESENTAÇÃO..... | 19 |
| 1. Introdução Geral..... | 21 |
| 2. Hipóteses da pesquisa..... | 24 |
| 3. Objetivo Geral..... | 25 |
| 3.1. Objetivos específicos | 25 |
| 4. CAPÍTULO I – BIOCOMPOUNDS FROM WASTEWATER-GROWN MICROALGAE: A REVIEW OF EMERGING CULTIVATION AND HARVESTING TECHNOLOGIES..... | 26 |
| Abstract | 26 |
| 4.1. Introduction..... | 27 |
| 4.2. Cultivation strategies for increased productivity and biocompounds accumulation 29 | |
| 4.2.1. Wastewater blend | 37 |
| 4.2.2. Light control | 39 |
| 4.2.3. Nanoparticles | 42 |
| 4.2.4. Two-stages cultivation..... | 44 |
| 4.3. Emerging harvesting technologies | 47 |
| 4.3.1. Electrocoagulation-flocculation | 54 |
| 4.3.2. Biocoagulants and biofloculants..... | 57 |
| 4.3.3. Biofilm reactor | 59 |
| 4.4. Conclusions..... | 63 |
| References | 65 |
| 5. CAPÍTULO II - MUNICIPAL AND INDUSTRIAL WASTEWATER BLENDING: EFFECT OF THE CARBON/NITROGEN RATIO ON MICROALGAE PRODUCTIVITY AND BIOCOMPOUND ACCUMULATION..... | 77 |
| Abstract | 77 |
| 5.1. Introduction..... | 78 |
| 5.2. Material and Methods..... | 81 |
| 5.2.1. Experimental design and procedure..... | 81 |
| 5.2.2. Monitoring and Determination of Pigments | 84 |
| 5.2.3. Biochemical characterization, proximate and ultimate analysis ... | 85 |
| 5.2.4. Profile of fatty acid methyl esters (FAME) using gas chromatography..... | 86 |
| 5.2.5. Statistical analysis..... | 86 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.3. | Results and discussion..... | 86 |
| 5.3.1. | Environmental Conditions and Nutrient Removal Efficiency | 86 |
| 5.3.2. | Biomass and Pigment Production | 91 |
| 5.3.3. | Microalgae biomass biochemical composition | 97 |
| 5.3.4. | Fatty acid methyl esters (FAME) analysis | 100 |
| 5.3.5. | Limitations and future perspectives..... | 103 |
| 5.4. | Conclusions..... | 104 |
| | References | 105 |
| 6. | CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS E ACÚMULO DE LIPÍDIOS E CARBOIDRATOS: IMPACTO DA RELAÇÃO C/N EM LAGOAS DE ALTA TAXA COM ÁGUAS RESIDUÁRIAS MUNICIPAIS E INDUSTRIAIS MISTURADAS PARA APLICAÇÕES EM BIOCOMBUSTÍVEIS..... | 112 |
| | Resumo | 112 |
| 6.1. | Introdução | 113 |
| 6.2. | Material e Métodos..... | 114 |
| 6.2.1. | Cultivo de microalgas e delineamento experimental..... | 115 |
| 6.2.2. | Operação e monitoramento | 117 |
| 6.2.3. | Análise da diversidade da comunidade microbiana e histoquímica | 118 |
| 6.2.4. | Modelos cinéticos de biodegradação | 119 |
| 6.2.5. | Caracterização bioquímica, análises imediatas e elementares.. | 119 |
| 6.2.6. | Determinação do perfil de ácidos graxos | 120 |
| 6.2.7. | Análise estatística | 120 |
| 6.3. | Resultados e discussão | 121 |
| 6.3.1. | Comunidade fitoplanctônica e histoquímica..... | 121 |
| 6.3.2. | Produção de biomassa de microalgas | 124 |
| 6.3.3. | Remoção de poluentes e equações cinéticas..... | 126 |
| 6.3.4. | Mudança da composição bioquímica sob diferentes razões C/N | 131 |
| 6.3.5. | Perfil de ácidos graxos..... | 135 |
| 6.4. | Conclusão | 138 |
| 7. | CAPÍTULO IV – HARVESTING MICROALGAE BIOMASS FROM WASTEWATER VIA ELECTROCOAGULATION: OPERATIONAL PARAMETERS AND EFFICIENCY | 147 |
| 7.1. | Introduction..... | 147 |

| | |
|--|-----|
| 7.2. Methodology..... | 148 |
| 7.3. Results and Conclusions | 148 |
| References | 152 |
| 8. CAPÍTULO V – OTIMIZAÇÃO DA COLHEITA DE MICROALGAS POR ELETROCOAGULAÇÃO E ANÁLISE DA VIABILIDADE AMBIENTAL | 153 |
| 8.1. Introdução | 153 |
| 8.2 Material e Métodos | 155 |
| 8.1.1. Produção de biomassa | 155 |
| 8.1.2. Reator de eletrocoagulação (EC)..... | 158 |
| 8.1.3. Operação e monitoramento | 159 |
| 8.1.4. Otimização estatística da EFC..... | 159 |
| 8.1.5. Avaliação do ciclo de vida (ACV) | 162 |
| 8.2. Resultados e discussão | 164 |
| 8.2.1. Análise preliminar dos dados experimentais..... | 164 |
| 8.2.2. Eficiência de colheita e remoção de matéria orgânica | 168 |
| 8.2.3. Concentração de Alumínio na biomassa e na água residual | 169 |
| 8.2.4. Condutividade elétrica, potencial zeta..... | 170 |
| 8.2.5. Modelos de otimização e superfície resposta | 172 |
| 8.2.6. Viabilidade ambiental | 178 |
| 8.2.7. Perspectivas Futuras e Direções para Pesquisas em EC..... | 182 |
| 8.3. Conclusão | 183 |
| Referências bibliográficas | 185 |
| 9. CONCLUSÕES GERAIS | 190 |
| 10. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS | 191 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 192 |
| 12. APÊNDICE I | 196 |
| 13. APÊNDICE II | 197 |
| 14. APÊNDICE III | 198 |
| 15. APÊNDICE IV | 199 |
| 16. APÊNDICE V | 200 |
| 17. APÊNDICE VI..... | 201 |

APRESENTAÇÃO

Este estudo insere-se no contexto da biotecnologia de microalgas, com foco no aproveitamento de águas residuárias para a produção de biomassa e separação via eletrocoagulação (EC). Dessa forma, a pesquisa integra os projetos FAPEMIG APQ-03618-23 – Edital 06/2023 Ciência por Elas – Biorrefinarias Algais para a Produção Sustentável de Bioprodutos: aspectos técnicos, econômicos e ambientais, aprovado em 2023 sob coordenação da professora Maria Lúcia Calijuri, e FAPEMIG RED-00068-23 – Edital Nº 012/2023 – Estratégias emergentes e disruptivas para o saneamento sustentável no estado de Minas Gerais: Biorrefinaria de microalgas no contexto de redes de desenvolvimento tecnológico, também aprovado em 2023.

Ambas as iniciativas visam desenvolver processos industriais de baixo impacto ambiental, fundamentados em bioeconomia circular, promovendo tratamento de efluentes aliado à produção de bioprodutos de valor agregado. Este trabalho busca avaliar estratégias emergentes de cultivo, por meio da combinação de diferentes águas residuárias, e de colheita, via EC, contribuindo para a viabilização de biorrefinarias de microalgas em escala piloto e industrial. Para contemplar esses aspectos de forma estruturada, a tese está dividida em cinco capítulos, resumidos a seguir:

CAPÍTULO I – *Biocompounds from wastewater-grown microalgae: A review of emerging cultivation and harvesting technologies*. Apresenta uma revisão crítica sobre o estado da arte do cultivo de microalgas em águas residuárias, com foco em estratégias para otimizar a produção e o acúmulo de compostos de valor agregado. Além disso, explora tecnologias emergentes de colheita, discutindo suas vantagens e limitações, e destaca as principais oportunidades de pesquisa na área.

CAPÍTULO II – *Municipal and industrial wastewater blending: Effect of the carbon/nitrogen ratio on microalgae productivity and biocompound accumulation*. Aborda o efeito da razão C/N, ajustada pela combinação de águas residuárias domésticas e industriais, na produtividade e no acúmulo de lipídios e carboidratos pelas microalgas em escala laboratorial.

CAPÍTULO III – *Produção de biomassa de microalgas e acúmulo de lipídios e carboidratos: impacto da relação C/N em lagoas de alta taxa com águas residuárias municipais e industriais misturadas para aplicações em*

biofertilizantes e biocombustíveis. Analisa, em uma abordagem de aumento de escala, o desempenho do cultivo em lagoas de alta taxa em escala piloto, avaliando a produtividade e a composição bioquímica da biomassa, bem como as possíveis rotas de aplicação da biomassa produzida.

CAPÍTULO IV – *Harvesting microalgae biomass from wastewater via electrocoagulation: Operational parameters and efficiency*. Avalia o desempenho técnico da eletrocoagulação na separação de biomassa de microalgas cultivadas em águas residuárias, explorando parâmetros operacionais como pH, densidade de corrente e tempo de processo.

CAPÍTULO V – *Otimização da colheita de microalgas em reator de eletrocoagulação: aplicação da metodologia de superfície de resposta e análise de viabilidade ambiental*. Foca na otimização do processo de EC por meio de metodologia de superfície de resposta, visando maximizar a eficiência de colheita e minimizar a contaminação de metal no produto final, além de avaliar a viabilidade ambiental da tecnologia.

Com essa organização, pretende-se demonstrar como a biotecnologia de microalgas, aliada aos princípios da bioeconomia circular, pode impulsionar o aproveitamento de águas residuárias para a produção de bioprodutos de forma sustentável e inovadora. Ao abordar tópicos críticos de cultivo e colheita de biomassa, situados na fronteira do conhecimento, busca-se preencher as lacunas de pesquisa existentes e fortalecer as bases científicas para a aplicação em larga escala.

1. Introdução Geral

A biotecnologia de microalgas tem se destacado como uma abordagem promissora na prospecção de matérias primas sustentáveis, oferecendo uma alternativa viável à dependência de recursos não renováveis. Entre as diversas aplicações possíveis, incluem-se as rotas de biocombustíveis, biofertilizantes e pigmentos (CALIJURI et al., 2022; LIU et al., 2024). Entretanto, as etapas de cultivo e colheita de biomassa continuam sendo os principais gargalos, limitando a adoção dessas tecnologias em larga escala (JEEVANANDAM et al., 2020; SARATALE et al., 2022; XIE et al., 2019a).

O cultivo convencional de microalgas requer grandes quantidades de água pura, nutrientes, dióxido de carbono (CO₂) e energia (PAGELS et al., 2020). Além disso, a etapa subsequente de colheita e desaguamento pode representar de 20 a 30% dos custos totais (SINGH; PATIDAR, 2018). Apesar desses desafios, as microalgas apresentam diversas vantagens, como elevada taxa fotossintética, capacidade de reduzir emissões de gases de efeito estufa por meio do sequestro de CO₂ (ASSIS et al., 2019c; FAROOQ et al., 2022) e potencial de acúmulo de lipídios, carboidratos, proteínas, pigmentos e (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2019; MENDONÇA et al., 2021).

Para mitigar os obstáculos inerentes ao cultivo, o uso de águas residuárias desponta como alternativa, suprimindo a necessidade por nutrientes e água, reduzindo custos (CHOUDHARY et al., 2020) e impactos ambientais (HERRERA et al., 2021; LAM; ZLATANOVIĆ; VAN DER HOEK, 2020). Nesse processo, as microalgas assimilam nitrogênio (N) e fósforo (P) e, em consórcio com bactérias, auxiliam na degradação de matéria orgânica (FALLAHI et al., 2021; MORENO-GARCIA et al., 2021). Apesar dos benefícios econômicos e ambientais dessa estratégia, diversos fatores ainda limitam o uso em escala real.

A presença de altas concentrações de nutrientes (CHENG et al., 2020b), poluentes emergentes (SONG et al., 2023b), patógenos e corantes orgânicos (KONG et al., 2022), são alguns dos fatores que podem comprometer o crescimento microalgal (YOU et al., 2022). Adicionalmente, a composição bioquímica da biomassa é influenciada pelas fontes de carbono (C) e nutrientes disponíveis (REN et al., 2023; SONG et al., 2023b), bem como por fatores ambientais, como luz, temperatura e pH (LOGANATHAN et al., 2020; YANG; LI; WANG, 2019). Por esse motivo, otimizar essas

variáveis é essencial para maximizar a produção de biomassa e, simultaneamente, agregar valor para obtenção de biocombustíveis, biofertilizantes ou outros bioprodutos (FERREIRA et al., 2024; PEREIRA et al., 2024a).

Entre as estratégias de cultivo, destaca-se a adequação da razão Carbono/Nitrogênio (C/N, m/m), por meio da combinação de diferentes águas residuárias, que é um método sustentável para melhorar o desempenho do cultivo. Nesse sentido, ZHENG et al., (2018) alcançaram concentração máxima de biomassa de $2,85 \text{ g L}^{-1}$, com razão C/N de 7,9, ao combinar efluentes de suinocultura e cervejaria (1:5; pH 7,0). Por outro lado, YU et al., (2024) observaram produtividade de $2,69 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ em um reator operado sob alta carga (C/N \approx 36), ao misturar água residuária do processamento de grãos e água residuária doméstica (1:7). Essa abordagem pode reduzir custos de cultivo, como demonstrado por CAI et al., (2022), que relatam uma economia de 51,69 % ao empregar águas residuárias do processamento de arroz. No entanto, a seleção adequada dos efluentes conforme os compostos-alvo desejados é crucial para o sucesso da estratégia (PEREIRA et al., 2024a).

Em relação à colheita, os principais desafios decorrentes da carga negativa da superfície das células, pequeno tamanho celular (3 a 30 μm) e baixa densidade das microalgas (SINGH; PATIDAR, 2018; VISIGALLI et al., 2021). Nesse contexto, a eletrocoagulação (EC) surge como alternativa eficiente aos métodos tradicionais (KHATIB et al., 2021), pois a eletrólise neutraliza as cargas negativas das células e promove sua agregação (DAS; SHARMA; PURKAIT, 2022b; FIGUEIREDO et al., 2022).

A EC apresenta vantagens como ausência de ânions prejudiciais, menor risco de superdosagem e facilidade de controle operacional (HAWARI et al., 2020; MAHMOOD; HWAN KIM; PARK, 2021). Em comparação aos métodos convencionais, como floculação ou autofloculação, o processo é mais rápido e geralmente mais eficiente, além de reduzir custos energéticos em relação à centrifugação (NAJJAR; ABU-SHAMLEH, 2020; RAEISSADATI; MOHEIMANI; BAHRI, 2021). As eficiências de colheita relatadas variam entre 78,80 % e 98,70 %, dependendo do material do eletrodo (PRATAMA; HADIYANTO, 2024), enquanto os custos operacionais podem ser de 83 a 89 % menores em relação à centrifugação (LUCAKOVA et al., 2021).

Por outro lado, as limitações da EC incluem o consumo de energia, as variações da água residual em termos de pH e temperatura, além da dissolução do metal do eletrodo, que pode contaminar a biomassa e o efluente tratado (RAHMANI et al., 2017a). Soma-se a isso a ampla variação de parâmetros operacionais e a ausência de faixas ideais claramente definidas, dificultando a avaliação técnico-econômica quando comparada a métodos convencionais (VISIGALLI et al., 2021). Ademais, grande parte dos estudos aborda a separação de biomassa obtida em cultivos puros (HAWARI et al., 2020; KHATIB et al., 2021; LUCKAKOVA et al., 2021, 2022), reforçando a importância de avaliar águas residuárias reais para que a tecnologia seja no futuro integrada à biorrefinaria de microalgas, no contexto do saneamento.

esta pesquisa investigou como a razão C/N, ajustada pela combinação de águas residuárias municipais e industriais do setor de sucos, influencia a produtividade do cultivo, o acúmulo de compostos bioquímicos e a remoção de poluentes. Adicionalmente, avaliou-se o desempenho técnico e ambiental da EC como estratégia de colheita, considerando parâmetros operacionais (pH, densidade de corrente e tempo) para otimizar a eficiência do processo. O avanço dessas estratégias é fundamental para viabilizar a aplicação da biotecnologia de microalgas em larga escala, ao conciliar desenvolvimento técnico, viabilidade econômica e responsabilidade ambiental.

2. Hipóteses da pesquisa

- A adequação da razão C/N, por meio da estratégia de combinação de águas residuárias, pode melhorar a produtividade da biomassa de microalgas, em relação ao meio de cultivo composto exclusivamente por esgoto sanitário;
- O balanço da razão C/N, a partir da combinação de águas residuárias municipais e da indústria de sucos, pode influenciar a composição bioquímica da biomassa, de forma a aumentar a concentração de lipídios e carboidratos;
- A eletrocoagulação pode ser otimizada a partir da combinação dos parâmetros pH, densidade de corrente e tempo de reação, minimizando a contaminação do alumínio na biomassa e garantindo maior eficiência de colheita;
- A otimização do processo de eletrocoagulação pode diminuir a geração de impactos ambientais, melhorando a viabilidade ambiental do processo.

3. Objetivo Geral

Investigar o efeito da combinação de águas residuárias doméstica e da indústria de processamento de suco no cultivo de microalgas e o desempenho da eletrocoagulação na colheita de biomassa.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o impacto da razão C/N, ajustada pela combinação de águas residuárias domésticas e da indústria de processamento de suco, na produtividade da biomassa de microalgas;
- Analisar a influência da razão C/N na composição bioquímica das microalgas, com foco no acúmulo de lipídios e carboidratos;
- Avaliar o desempenho técnico da eletrocoagulação como método de colheita de biomassa de microalgas cultivadas em águas residuárias;
- Otimizar os parâmetros operacionais da eletrocoagulação para melhorar o desempenho em termos de eficiência de separação e minimizar a contaminação por alumínio, liberado durante o processo;
- Realizar uma avaliação ambiental da eletrocoagulação como tecnologia para colheita de biomassa de microalgas.

4. CAPÍTULO I – BIOCOMPOUNDS FROM WASTEWATER-GROWN MICROALGAE: A REVIEW OF EMERGING CULTIVATION AND HARVESTING TECHNOLOGIES

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira ¹, Thiago Abrantes Silva ¹; Iara Barbosa Magalhães ¹; Jessica Ferreira ¹; Matheus Quintão Braga ¹; Juliana Ferreira Lorentz ¹; Paula Peixoto Assemany²; Eduardo de Aguiar do Couto ³; Maria Lúcia Calijuri ¹.

¹Federal University of Viçosa, Department of Civil Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Federal University of Lavras, Department of Environmental Engineering, Lavras, Minas Gerais, Brazil

³Federal University of Itajuba, Institute of Pure and Applied Sciences, Itabira, Minas Gerais, Brazil

Versão publicada na revista *Science of the Total Environment* (Apêndice I) em 19 de fevereiro de 2024.

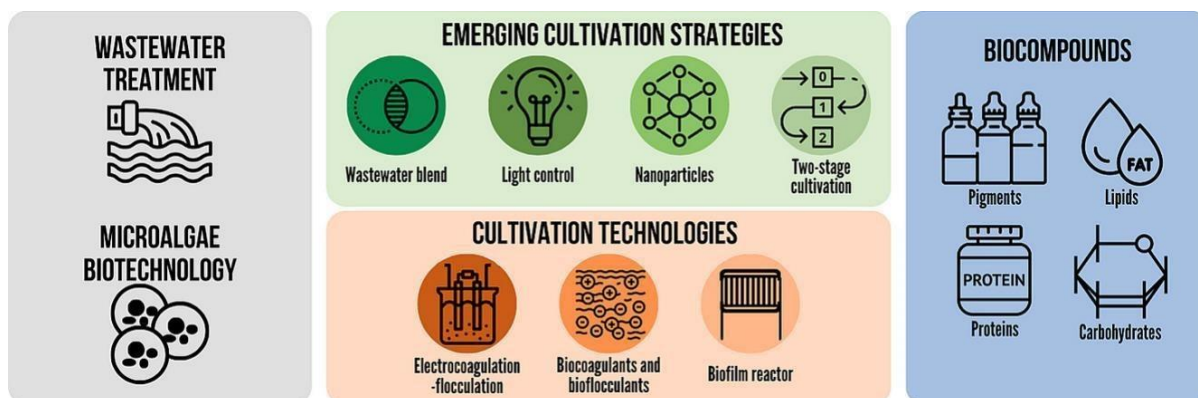
Abstract

Microalgae biomass has attracted attention as a feedstock to produce biofuels, biofertilizers, and pigments. However, the high production cost associated with cultivation and separation stages is a challenge for the microalgae biotechnology application on a large scale. A promising approach to overcome the technical-economic limitations of microalgae production is using wastewater as a nutrient and water source for cultivation. This strategy reduces cultivation costs and contributes to valorizing sanitation resources. Therefore, this article presents a comprehensive literature review on the status of microalgae biomass cultivation in wastewater, focusing on production strategies and the accumulation of valuable compounds such as lipids, carbohydrates, proteins, fatty acids, and pigments. This review also covers emerging techniques for harvesting microalgae biomass cultivated in wastewater, discussing the advantages and limitations of the process, as well as pointing out the main research opportunities. The novelty of the study lies in providing a detailed analysis of state-of-the-art and potential advances in the cultivation and harvesting of

microalgae, with a special focus on the use of wastewater and implementing innovative strategies to enhance productivity and the accumulation of compounds. In this context, the work aims to guide future research concerning emerging technologies in the field, emphasizing the importance of innovative approaches in cultivating and harvesting microalgae for advancing knowledge and practical applications in this area.

Keywords: Microalgae; Wastewater; Nutrient removal; Cultivation; Harvesting; Biomass production.

Graphical Abstract



4.1. Introduction

Microalgae cultivation in wastewater has emerged as a promising alternative, enabling the intersection of environmental sustainability and the production of valued compounds. This innovative approach could meet the growing demand for high-economic-value raw materials (MIN et al., 2022). However, some challenges must be overcome in the cultivation and harvesting stages to achieve better performance in biomass productivity and the generation of value-added products (DRAGONE, 2022; YOU et al., 2022).

Microalgae are known for their high photosynthetic rate and biomass productivity (COUTO et al., 2021; MENDONÇA et al., 2021), their ability to reduce greenhouse gas emissions (ASSIS et al., 2019c; FAROOQ et al., 2022) and their potential in producing a wide range of compounds of interest, such as lipids, carbohydrates, proteins, as well as value-added compounds like pigments (beta-carotene, astaxanthin, lutein), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), among others (CALIJURI et al., 2022; HE et al., 2023). Microalgae cultivation in wastewater represents a particularly attractive approach, as it combines wastewater treatment with biomass production (JAVED et al., 2019), thus contributing to environmental impacts

the mitigation (ASSIS et al., 2023; HERRERA et al., 2021; LAM; ZLATANOVIĆ; VAN DER HOEK, 2020).

However, obtaining this microalgae biomass requires the development of specific strategies to overcome some challenges when cultivating in wastewater. High nutrient concentrations (CHENG et al., 2020a), toxic emerging pollutants (SONG et al., 2023b), pathogens, and organic dyes such as azo dyes ((KONG et al., 2022) present in wastewater can limit photosynthetic activity and microalgae growth (YOU et al., 2022). The carbon and nitrogen sources made available in the culture medium can also impact the physiological and biochemical characteristics, such as microalgae's protein, carbohydrate, chlorophyll, and fatty acid compositions (REN et al., 2023; SONG et al., 2023a). In addition to these factors, microalgae strains and cultivation conditions, such as light availability, temperature, and pH, can also affect biomass production and biocompounds accumulation (LOGANATHAN et al., 2020; YANG; LI; WANG, 2019). In this context, the scientific advancements aimed at achieving higher yields of biocompounds can enable the production of high-quality biofuels, biofertilizers (PEREIRA et al., 2023; SILVA et al., 2022), and other bioproducts derived from microalgae (CALIJURI et al., 2022; FERREIRA et al., 2024; REN et al., 2023).

Another critical challenge is related to biomass harvesting. It is estimated that 20 to 30% of microalgae production costs are related to the drying and dewatering stage (SINGH; PATIDAR, 2018). The low microalgae concentration (less than 0.5 g L⁻¹ in open systems), the negative surface charge, the cells' small size (between 3 to 30 µm), and the microalgae low density compared to their cultivation medium are some factors that hinder biomass harvesting (MORAIS et al., 2023a; VISIGALLI et al., 2021; XU et al., 2021). Given their small size and fluctuation in cell density, separating the microalgae from the liquid phase can be complex and costly.

The present review compiles and discusses what the authors regarded as the most promising microalgae cultivation strategies to enhance growth and metabolite accumulation while exploring emerging separation technologies. For each technology, technical aspects are highlighted from updated research. The results found in the literature were contextualized to discuss their impact on biomass and biocompound accumulation, challenges, and future perspectives. In addition, the manuscript considers the context of wastewater treatment, strengthening the circular economy concept. This review aims to serve as an updated compilation of upcoming

technological processes for algae cultivation and harvesting while guiding future research on the hotspots of each strategy presented.

4.2. Cultivation strategies for increased productivity and biocompounds accumulation

Table 1 presents the results of different approaches for microalgae biomass production and biocompounds accumulation. In Figure 4.1, highlights of each microalgae biomass cultivation technology explored in this review article are presented. The data indicate that, concerning the wastewater blending strategy, the study conducted by ZHENG et al., (2018) showed the best result by combining pig farming and brewery wastewater for microalgae production, achieving a microalgae biomass concentration of 2.85 g L⁻¹. On the other hand, when evaluating the light control strategy, the study by QU et al., (2019) achieved a microalgae biomass concentration of 9.2 g L⁻¹ cultivated in pig farming wastewater at a light intensity of 600 μmol m⁻² s⁻¹. Regarding nanoparticles, REN et al., (2020) observed a microalgae *Scenedesmus* sp. H-1 concentration of 3.18 g L⁻¹ when cultivated in a synthetic medium supplemented with SiC nanoparticles. Finally, in the two-stage approach, a biomass yield of 2.29 g L⁻¹ was recorded when the microalgae were cultivated in anaerobically digested wastewater and supplemented with Bold's basal synthetic medium with triple nitrate (3NBBM) (POLAT; ALTINBAŞ, 2023).

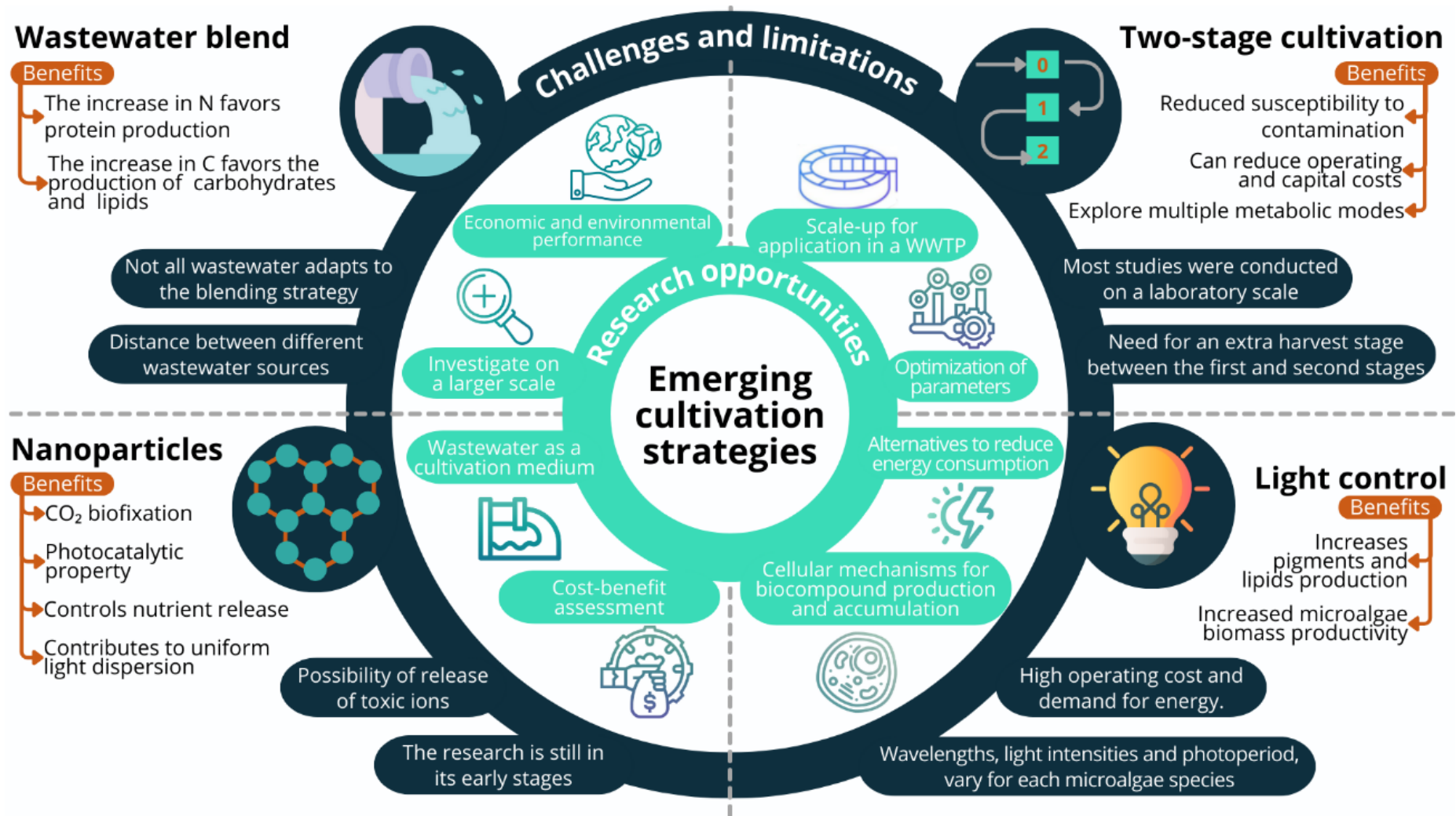


Figure 4.1. Strategies for enhancing microalgae biomass production and biocompounds accumulation.

Table 4.1. Cultivation strategies for microalgae biomass and main biocompounds produced.

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|----------------------|--|--------------------------------------|---|--|-------------------------|------------------------------|
| Wastewater blend | Wastewater from domestic wastewater (DW), digested liquid (DL), septic system wastewater (SSW) and water | <i>Chlorella vulgaris</i> | 13.33% DW, 13.33% DL, 13.33% SSW, 60% water | 21.94 mg L ⁻¹ d ⁻¹ | - | MORENO-GARCIA et al., (2019) |
| Wastewater blend | Wastewater from anaerobic digestion and rainwater | <i>Chlorella vulgaris</i> | 165.16 mg L ⁻¹ TN 60.12 mg L ⁻¹ TP 272.00 mg L ⁻¹ sCOD | - | 43.21% lipid | XIE et al., (2018) |
| Wastewater blend | Piggery wastewater (PW) and domestic wastewater (DW) | <i>Micractinium inermum</i> NLP-F014 | 95% DW and 5% PW | 1.03 g L ⁻¹ d ⁻¹ | 39.10% lipid | PARK et al., (2015) |
| Wastewater blend | Piggery wastewater (PW) and brewery wastewater (BW) | <i>Chlorella vulgaris</i> | 20% PW and 80% BW (C/N = 7.9) | 2.85 g L ⁻¹ | - | ZHENG et al., (2018) |

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|----------------------|--|---|------------------------------------|--|--|-----------------------|
| Wastewater blend | Domestic sewage (DS) and paint booth effluent (PBE) | <i>Tetradesmus coenobium</i> | 25% PBE and 75% DS | 570.8 mg VSS L ⁻¹ | 5.6 mg L ⁻¹ total carotenoids | BRAGA et al., (2023b) |
| | | | 50% PBE and 50% DS | 597,5 mg VSS L ⁻¹ | 3.9 mg L ⁻¹ total carotenoids | |
| Wastewater blend | Domestic sewage (DS) and paint booth effluent (PBE) | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Tetradesmus obliquus</i> , | 18.75 % PBE and 81.25 % DS | 0.08 g chl-a m ⁻² .day ⁻¹ and 2.0 g VSS m ⁻² .day ⁻¹ | 13.6 % total lipids, 11.2% carbohydrates, 24.9% proteins | BRAGA et al., (2023a) |
| | | <i>Tetradesmus sp.</i> , <i>Tetradesmus coenobium</i> | | | | |
| Wastewater blend | Wastewater from the food industry (FW) and wastewater from brewing industry (BW) | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Limnothrix planctonica</i> and <i>Pseudanabaena catenata</i> | 98.5% FW and 1.5 % BW (C/ N = 8.2) | 79.9 g VSS m ⁻² | - | GAMA et al., (2023) |

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|----------------------|---|---|--|-------------------------------------|--|---------------------------|
| Light control | Aquaculture wastewater | <i>Chlorella sorokiniana</i> | Cultivation under white light | 1.93 g L ⁻¹ | 55.52% carbohydrate, 28.55% lipid, 17.25% protein | HE et al., (2023) |
| Light control | Wastewater from the seafood processing industry | <i>Haematococcus</i> sp. | Two-stage lighting with red LED for 5 days followed by blue LED for 5 days | 2.55 mg L ⁻¹ | 3.39 mg L ⁻¹ astaxanthin | CHEIRSILP et al., (2022) |
| Light control | Dairy wastewater | <i>Chlorella variabilis</i> and <i>Scenedesmus obliquus</i> | Cultivation under white light (40 μM) with a 24-hour photoperiod and continuous illumination | 673 mg L ⁻¹ | 7.22 mg g ⁻¹ lutein, 56% protein, 24% carbohydrate | LOGANATHAN et al., (2020) |
| | | | Cultivation under amber light (40 μM) with a 24-hour photoperiod and continuous illumination | 30 mg L ⁻¹ | 5.96 mg g ⁻¹ lutein, 52 % protein, 35% carbohydrate | |

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|----------------------|---------------------------------|--|---|--|---|---------------------------|
| Light control | Dairy wastewater with melatonin | <i>Chlorella vulgaris</i> | Cultivation under red light (10 μ M) with a 16:8-hour photoperiod | 0.09 g L ⁻¹ d ⁻¹ | 2.61 mg L ⁻¹ carotenoid, 15.99% protein, 13.09% carbohydrate, 32.23% lipid | SAMANI; MANSOURI, (2023) |
| Light control | Pig farming wastewater | <i>Parachlorella kessleri</i> QWY28 | Cultivation under light intensity of 600 μ mol m ⁻² s ⁻¹ | 9.2 g L ⁻¹ | 54% carbohydrate | QU et al., (2019) |
| Light control | Domestic wastewater | <i>Desmodesmus</i> sp. and <i>Scenedesmus obliquus</i> | Cultivation under light intensity of 300 μ E m ⁻² s ⁻¹ | 1.1 g L ⁻¹ | 6.2 % fatty acid | NZAYISENGA et al., (2020) |
| Light control | Domestic wastewater | <i>Chlorella sorokiniana</i> | Cultivation with a 24-hour photoperiod under light intensity of 140 μ mol m ⁻² s ⁻¹ | 548 mg L ⁻¹ d ⁻¹ | 12 mg L ⁻¹ carotenoid, 15% protein, 5% carbohydrate | RANI; OJHA, (2021) |
| Light control | Domestic wastewater | <i>Chlorella vulgaris</i> | Cultivation with a 16:8-hour photoperiod | 0.89 g L ⁻¹ | 0.16 g L ⁻¹ lipid | LEONG et al., (2022) |

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--|--|---|-----------------------------------|
| Nanoparticles | Synthetic medium | <i>Desmodesmus subspicatus</i> | NP Fe (5.1 mg L ⁻¹) | 2.6 g L ⁻¹ | 38% lipid | PÁDROVÁ et al., (2015) |
| | | <i>Trachydiscus minutus</i> | | 13.7 g L ⁻¹ | 35% lipid | |
| Nanoparticles | Synthetic medium | <i>Scenedesmus</i> sp. H-1 | NP SiC | 3.18 g L ⁻¹ | 40.26% lipid | REN et al., (2020) |
| Nanoparticles | Synthetic medium | <i>Chlorella fusca</i> | NP Fe ₂ O ₃ (0.5 g L ⁻¹) | 130.9 mg L ⁻¹ d ⁻¹ | 16.7% lipid | VAZ; COSTA; MORAIS, (2020) |
| Nanoparticles | Synthetic medium | <i>Chlorella sorokiniana</i> F31 | TiO ₂ (50 mg L ⁻¹) | 12.87 mg L ⁻¹ d ⁻¹ | 15.55 mg g ⁻¹ lutein | ZHAO et al., (2022) et al. (2022) |
| Nanoparticles | Synthetic medium | <i>Tetraselmis suecica</i> | NP Fe (1.17 x 10 ⁻⁵ M) | - | 41.9% lipid | KADAR et al., (2012) |
| | | <i>Pavlova lutheri</i> | | - | 46.3% lipid | |
| Two-stage cultivation | Anaerobically digested wastewater | indigenous microalgal species | Stress with NaCl and FeCl ₃ | 2.29 g L ⁻¹ | 11-28% lipid, 34-45% protein, 23-53% carbohydrate | POLAT; ALTINBAŞ, (2023) |

| Cultivation strategy | Cultivation medium | Microalga strain | Observation | Biomass productivity/ production | Biochemical composition | Reference |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---------------------------|
| Two-stage cultivation | Food wastewater (10%) and sea water (90%) | <i>Tetraselmis tetrathele</i> | Salinity stress (40 g L ⁻¹) and fluorescent light (300 μmol m ⁻² s ⁻¹) | 1.23×10 ⁶ cells mL ⁻¹ | 0.32 mg mL ⁻¹ carotenoid | NEZAFATIAN et al., (2023) |
| | | | Salinity stress (40 g L ⁻¹) and LED light (300 μmol m ⁻² s ⁻¹) | 1,56×10 ⁶ cells mL ⁻¹ | 0.51 mg mL ⁻¹ carotenoid | |
| Two-stage cultivation | Urban wastewater | <i>Pseudoscillatoria coralii</i> BERC01 | Nutritional stress through the recycling of treated water | 106.24 mg L ⁻¹ | 148.95 mg g ⁻¹ phycocyanin, 51.92 mg g ⁻¹ allophycocyanin, and 470–490 mg g ⁻¹ lipid, 16.30 % de protein | KHAN et al., (2022) |
| Two-stage cultivation | Diluted palm oil wastewater | <i>Arthrospira platensis</i> | Nutritional stress through wastewater dilution | 70 mg L ⁻¹ d ⁻¹ | 4.43 mg L ⁻¹ d ⁻¹ C- phycocyanin | NUR et al., (2019) |

Note: TN: Total nitrogen; TP: Total phosphorus; sCOD: Soluble chemical oxygen demand; NP: Nanoparticle; NaCl: Sodium chloride; FeCl₃: Ferric chloride.

4.2.1. Wastewater blend

Culture medium composition plays a crucial role in microalgae biomass development and biocompounds accumulation such as lipids, proteins, carbohydrates and pigments. Microalgae can synthesize more lipids under stress conditions, which can be induced by the heavy metals present in wastewater (SONG et al., 2023b), or under mixotrophic conditions where excess organic carbon in the culture medium can be directed towards intracellular lipid storage (GAO et al., 2019).

FALLAHI et al., (2021) also point out that the C/N ratio is a key factor in the relative distribution of polymeric carbohydrates and proteins. With a C/N ratio < 5, the polymeric extracts have a high protein content. In this case, the presence of N is closely linked to protein production in microalgae because most of the intracellular N (87.5 - 97.1%) is in the form of proteins (amino acids) composed of nitrogenous primary molecules (LIANG et al., 2023). In contrast, at high C/N ratios > 20, the concentration of carbohydrates increases (FALLAHI et al., 2021). Therefore, nitrogen deficiency is a strategy employed in the microalgae industry to stimulate the production of compounds such as lipids (MOU et al., 2023) and carbohydrates (QU et al., 2019).

Many studies use synthetic wastewater to evaluate the C/N ratio effect on the accumulation of biocompounds ((DANG et al., 2022; GAO et al., 2019). This practice is attributed to the enhanced ease of controlling the evaluated parameters, thus ensuring the accurate supply of nutrients based on the C/N ratio to be studied. According to DANG et al., (2022), the highest biomass production, organic content, and nutrient removal were obtained at a 5 C/N ratio. On the other hand, GAO et al., (2019) found that C/N ratios of 24 and 30 showed superior performance in lipid accumulation (35.3 and 36.5%, respectively), while treatments with C/N ratios of 1 and 3 demonstrated lower lipid accumulation (16.4 and 18.1%, respectively). Despite the significance of the mentioned studies, the evaluated conditions are unlikely to be replicated on a larger scale in the practical use of wastewater. This limitation emphasizes the necessity to assess the impact of the C/N ratio by combining wastewaters with varying characteristics.

Regarding cultivation in wastewater, the C/N ratio may often not favor the production and accumulation of some biocompounds (XIE et al., 2018; ZHU et al., 2019). This imbalance in the C/N ratio is due to a high quantity of N and a

shortage of C, as is the case with domestic wastewater, or due to a high concentration of organic carbon and a deficiency of N, as is the case with brewery wastewater (ZHENG et al., 2018). Therefore, balancing the C/N ratio through the varying wastewater combination is a promising alternative to other technologies, such as CO₂ supplementation, as it is a simpler and less costly option.

MORENO-GARCIA et al., (2019) evaluated microalgae productivity by combining different wastewater sources. They observed the highest algal productivity (21.90 mg L⁻¹ d⁻¹) in a mixture of 13.33% liquid digestate, 13.33% landfill leachate, 13.33% septic system effluent, and 60% water. PARK et al., (2015) identified that a combination of domestic and pig farming wastewater (95:5 v/v) resulted in an increased specific growth rate (1.27 d⁻¹). According to the authors, nutrient concentrations (N and P) decreased by 90% after incubating for two days. This result may indicate that the rapid nutrient removal interrupted the microalgal cell division and simultaneously favored the accumulation of certain cellular components, such as lipids (39.1%). To increase *Chlorella vulgaris* production, ZHENG et al., (2018) proposed pig farming and brewery wastewater combinations to balance the C/N ratio. The highest biomass concentration (2.85 g L⁻¹) was observed at a 7.9 C/N ratio. However, VYAS et al., (2022) observed the best performance at C/N ratios of 20 and 60, representing productions of 8.71 and 8.28 g L⁻¹, respectively.

Furthermore, some studies evaluated the influence of the C/N ratio on accumulating value-added compounds by microalgae cultivated in wastewater. MOU et al., (2023) observed lipid content equal to 30.97 and 31.48% in treatments with C/N ratios of 20 and 30, respectively. This result occurred because as the C/N ratio increased, the excess organic carbon in the medium was used for intracellular lipid storage. This phenomenon was also observed by PARK et al., (2015). After cultivating for 10 days in blended wastewater, the authors identified an increase in the lipid content of *Micractinium inermum* NLP-F014 from 8.90 to 39.10%, as well as the major fatty acids C18:1, C16:0, C18:2, and C18:3. The nutrient restriction strategy, for N and P, is also explored to boost the production of other value-added compounds (FALLAHI et al., 2021). VYAS et al., (2022) achieved 6.40 mg g⁻¹ of lutein in microalgae biomass cultivated in fish farm wastewater with a 10 C/N ratio.

The strategy of blending wastewater is used to improve the characteristics of the culture medium, either by diluting potential toxic compounds present in the wastewater or by favoring the C/N ratio. However, BRAGA et al., (2023b) evaluated different mixtures of paint booth effluent and domestic sewage (C/N between 1 and 9) and did not observe a statistical difference in microalgae productivity. GAMA et al., (2023) used a blend of brewery and meat processing wastewaters to test the effects of their different C/N ratios (between 5.4 and 8.2). Also, they did not observe a difference between treatments regarding algal productivity. These studies highlight that microalgae biotechnology for wastewater treatment may only adapt to some types of wastewaters and show that the evaluation of the physicochemical composition is a crucial factor to be determined before applying the technology to estimate potential results.

Within this context, the strategy of wastewater blending is promising for increasing the production of biomass and biocompounds. However, current research is still occurring at a laboratory scale, demonstrating the need for large-scale studies. Despite this, the metabolisms of carbon, nitrogen, and phosphorus in microalgae for wastewater treatment are extensively explored in research, although the nutrient needs can be species-specific (SU, 2021). It is important to note that careful selection of the types of wastewaters is required, and understanding how nutrients are available in the culture medium is essential. However, the main challenge to be overcome for application in the context of wastewater treatment is its implementation on a large scale and the distance between the sites generating these wastewaters.

4.2.2. Light control

Given the abundant natural sunlight and decreasing costs of artificial LED lamps, light enhancement strategies are potential paths for scaling up microalgae biomass production. Light serves as the primary energy source for photoautotrophic microalgae metabolism, and photosynthesis involves capturing light through antenna complexes with pigments like chlorophylls, carotenoids, and phycobilins, each having distinct roles in processes such as oxygenic photosynthesis and protection of the photosynthetic apparatus (PAGELS et al., 2020). Carotenoids, crucial for light harvesting and energy transfer, play a significant role in shielding the photosynthetic apparatus from photooxidative damage (HENRÍQUEZ et al., 2016), and the accumulation of secondary

carotenoids like astaxanthin can be induced by specific stimuli such as nutrient or light stress in cultivation. Consequently, light characteristics, including intensity, duration, and specific wavelength of exposure, are decisive factors influencing the growth and cellular activity of microalgae (WANG et al., 2014).

Studying the effects of different wavelengths (white light, red light, blue light, and mixed red and blue light) on the growth of *Chlorella sorokiniana* in aquaculture wastewater, HE et al., (2023) identified that biomass production (1.93 g L^{-1}) was higher under white light. However, SAMANI; MANSOURI, (2023) observed that red light favored increased biomass productivity ($0.09 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) in *Chlorella vulgaris* cultivated in dairy wastewater. This result was attributed to the enhanced photosynthesis efficiency resulting from the species' chlorophyll pigments with the highest absorption in the red range (600–700 nm). In the metabolite accumulation under different wavelengths, white light favored carbohydrates, lipids, and protein productivity (121.26 , 64.79 , and $38.85 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectively) (HE et al., 2023).

LOGANATHAN et al., (2020) also found that cultivation under white light allowed for a higher protein accumulation (56%), while amber light favored carbohydrate content (32%). The authors also observed that under blue light (450 nm), the chlorophyll content was higher (10 mg L^{-1}) compared to other tested light wavelengths (amber - 595 nm; red - 650 nm; amber + blue; cool-white fluorescent light). This fact may be attributed to an increase in the number/size of light-harvesting units when the microalgae consortium was exposed to blue light. Additionally, the cells may have undergone chromatic adaptation that helped to maximize their photosynthetic capacity.

In the study by HE et al., (2023) blue light promoted nitrogen usage to produce pigments, including chlorophyll-*a*, chlorophyll-*b*, and carotenoids (5.13 , 3.53 , and 1.46 mg g^{-1} respectively), as well as proteins (21.54%) and fatty acids (13.56%). According to the authors, the photosynthetic pigments of *C. sorokiniana* may prefer to capture blue photons and the expression of genes involved in the photosystem. Furthermore, the authors observed that red light was beneficial for higher carbohydrate and protein productivity in the initial phase of cultivation. However, mixed red and blue light was more beneficial to the growth of *C. sorokiniana* CMBB276, promoted by the increase in photosynthetic efficiency.

The combined use of different wavelengths was studied by CHEIRSILP et al., (2022) where they observed higher astaxanthin production (3.39 mg L^{-1}) during two-stage cultivation (red LED for 5 days followed by blue LED for the next 5 days) for the microalga *Haematococcus* sp. using wastewater from a seafood processing industry as cultivation medium. However, LOGANATHAN et al., (2020) showed that white light favored the lutein accumulation (7.22 mg g^{-1}) for *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater.

Light intensity can also directly impact the photosynthetic kinetics of algal cells, thereby affecting cell growth and metabolite production. The ideal light intensity may vary among different microalgae species. Light intensities ($200, 400, 600, \text{ and } 800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) were investigated by QU et al. (2019), aiming to optimize pig farming wastewater treatment and maximize carbohydrate production by a newly isolated microalga (*Parachlorella kessleri* QWY28). The authors observed increased carbohydrate content from 38 to 56% as light intensity increased from 200 to $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. However, a further increase to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ resulted in lower carbohydrate content and productivity. NZAYISENGA et al. (2020) investigated the light intensity effect ($50, 150, \text{ and } 300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) on the development of four microalgal strains (*Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus* sp., *Ettlia pseudoalveolaris* and *Scenedesmus obliquus*) cultivated in wastewater). They concluded that higher intensities led to higher fatty acid contents. This is attributed to the defensive mechanism against photooxidation, where they convert surplus photoassimilates into fatty acids. Additionally, a lower protein content was observed in the biomass obtained from cultivation under high light intensity. According to the authors, lipid synthesis depends on protein degradation or protein synthesis inhibition, which may be attributed to nitrogen consumption. Another possibility raised by the authors is that the carbon used for amino acid and protein synthesis is diverted toward triglyceride production as a carbon and energy source (NZAYISENGA et al., 2020).

The effect of photoperiod, which refers to the light exposure period, on the behavior of microalgae biomass cultivated in wastewater may correlate with the abovementioned factors. At lower than-ideal intensities, longer photoperiods can benefit or even inhibit microalgae biomass development (KHOEYI; SEYFABADI; RAMEZANPOUR, 2012; LEONG et al., 2022). RANI; OJHA, (2021) studied the

effects of different photoperiods (light:dark of 12:12 and 24:0) on biomass production, photosynthetic pigments (chlorophyll and carotenoids), and value-added compounds production of *Chlorella sorokiniana* cultivated in tertiary wastewater (synthetic and real). Regarding pigments, chlorophyll levels increased significantly from 22 to 57 mg L⁻¹ under a continuous 24-hour light cycle and to 60 mg L⁻¹ under a 12:12 photoperiod. Finally, carotenoid production was around 10-11 mg L⁻¹, observed in *C. sorokiniana* when cultivated in real wastewater, with no statistically significant difference between the evaluated photoperiod regimes.

LEONG et al. (2022) studied the effects of different light:dark regimes (24:0; 0:24; 16:8; 12:12; 8:16) using *Chlorella vulgaris* cultivated in municipal wastewater. The results showed that longer exposure time to light increased biomass growth, while prolonged darkness increased lipid content in the cells. The authors concluded that a 16:8 (light:dark) hour/cycle photoperiod was ideal, providing high biomass and lipid production (0.89 and 0.16 g L⁻¹, respectively). Moreover, the dominant FAMES obtained from *Chlorella vulgaris* predominantly consisted of C16 and C18 fatty acids suitable for biodiesel production (LEONG et al., 2022).

Most of the technologies presented include the additional use of energy-driven lamps, which impacts the final cost. Although the prices for artificial lights significantly decreased in recent years, there is still the need for comprehensive economic assessments on these strategies. Research on the feasibility of implementing such systems in large-scale facilities, covering both investment and operational costs, is highly recommended. Moreover, including complementary environmental analysis, such as life cycle assessment with the associated impacts, is also desirable. Thus, the analysis of the trade-off between the technological gains, such as increased productivity, can be contrasted with the costs, and further conclusions can be drawn on the sustainability of the light control strategies.

4.2.3. Nanoparticles

Nanoparticles (NPs) have dimensions ranging from 1 to 100 nm (KHAN; SAEED; KHAN, 2019), and due to their small size, they possess a high surface area. In the microalgae biomass context, NPs can influence photosynthesis optimization, controlled nutrient delivery, and protection against environmental

stresses (ARATBONI et al., 2023). Various types of NPs can be used in microalgae cultivation. For example, titanium dioxide (TiO₂) can optimize photosynthesis by uniformly dispersing light (ZHAO et al., 2022). Other NPs, such as silver oxide (AgO) and copper oxide (CuO), have antimicrobial properties, controlling pathogens (KARUPPANNAN et al., 2021). NPs can also be a nutritional supplement, especially when the culture medium lacks sufficient calcium (Ca) and phosphorus (P). In such cases, NPs containing these micronutrients can promote algal growth and the accumulation of biocompounds (Vargas-Estrada et al., 2020). Furthermore, NPs can protect microalgae from environmental stresses such as ultraviolet (UV) radiation or toxic contaminants (SENDRA et al., 2017a).

NP interaction varies depending on the microalgal species, NP characteristics, and cultivation conditions; therefore, several studies have evaluated the interaction between microalgae and NPs. The response for the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* varies depending on the nanoparticle and its concentration. When interacting with chromium oxide (Cr₂O₃) NPs, concentrations of 10 mg L⁻¹ were neutral, 100 mg L⁻¹ were beneficial, and 1,000 mg L⁻¹ were harmful (COSTA et al., 2016; MELEGARI et al., 2013; SENDRA et al., 2017b). The size of the nanoparticle is also crucial. In this context, silver NPs (AgNPs) smaller than 15 nm inhibited the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. In comparison, sizes between 30-50 nm and concentrations between 0.01 and 0.30 mg L⁻¹ had positive effects (SENDRA et al., 2017b). However, microalgae *Chlorella* sp. and *Tetradismus* sp. showed negative sensitivities to TiO₂ NPs (SADIQ et al., 2011).

In addition to affecting microalgae growth, controlled exposure to NPs can induce stress conditions during cultivation, leading microalgae to accumulate more lipids as a defense mechanism. This stress can be carefully calibrated to maximize lipid production without significantly impairing algal growth rates (DEY et al., 2023). This result happens because NPs can induce stress conditions, such as oxidative stress from photocatalysts, similar to the high light stress caused by TiO₂ NPs (KANG et al., 2014), or nutritional stress caused by metallic NPs (ZnO-NP) (KALIAMURTHI et al., 2019). Additionally, NPs can transport genetic material or gene editing tools (such as CRISPR/Cas9) into microalgal

cells. This path could allow the creation of genetically modified microalgal strains that accumulate lipids at higher concentrations (MUTHUKRISHNAN, 2022).

Studies have shown that microalgae species like *Trachydiscus minutuslencia* and *Desmodesmus subspicatus*, when exposed to iron ($\text{Fe}_{(0)}$) NPs at a dose of 5.1 mg L^{-1} , exhibited an increase of 35 and 38% in lipid accumulation, respectively (PÁDROVÁ et al., 2015). The species *Scenedesmus* sp. H-1, when treated with 150 mg L^{-1} of silicon carbide (SiC), showed a 40% increase in lipid content (REN et al., 2020). Studies have shown that microalgae species like *Trachydiscus minutuslencia* and *Desmodesmus subspicatus*, when exposed to iron ($\text{Fe}_{(0)}$) NPs at a dose of 5.1 mg L^{-1} , exhibited an increase of 35 and 38% in lipid accumulation, respectively (PÁDROVÁ et al., 2015). Lastly, the microalga *Chlorella fusca*, when given a dose of 0.5 g L^{-1} of iron oxide (Fe_2O_3), had a 16.7% increase in lipid production (VAZ; COSTA; MORAIS, 2020). In addition to promoting lipid accumulation in microalgae, NPs have been shown to increase CO_2 biofixation and gas utilization efficiency, resulting in higher biomass productivity. Additionally, the discussion highlights those outdoor microalgae cultivation leverages natural sunlight and ambient temperature. Thus, incorporating NPs in outdoor systems may increase biomass yield and save costs, mainly those from artificial lighting and temperature control in indoor cultivation systems. Therefore, this path can provide a more cost-effective and sustainable solution. (VAZ; COSTA; MORAIS, 2020).

Therefore, the interaction between microalgae and NPs presents a promising opportunity to optimize biomass production and biocompounds accumulation. However, it is essential to consider the specificity of each microalgal species, the type of NP, and its concentration and dosage to achieve desirable results. Additionally, future research should evaluate the impact of using NPs during microalgae cultivation in wastewater, besides assessing the economic and environmental performance. Current findings underscore the necessity for continued research to deepen our understanding and optimize the use of NPs in microalgae biotechnology. This path will ensure sustainable and efficient practices, especially in wastewater treatment.

4.2.4. Two-stages cultivation

Two-stage cultivation is an alternative to overcome the low productivity of microalgae biomass and value-added compounds, such as lipids and

carbohydrates. Typically, the growth phase aims to achieve maximum biomass concentration, followed by a stress phase during which the target biomolecule is accumulated (CHEN et al., 2022; NAGAPPAN et al., 2019). Microalgae can be cultivated in several systems, each with different configurations and operational modes. Thus, reactors can be open or closed, operated continuously or in batches, and adapted to stimulate mixotrophic, phototrophic, or heterotrophic metabolisms (NAGAPPAN et al., 2019).

However, the choice of reactor and cultivation method (photoautotrophic, heterotrophic, mixotrophic) can influence the generation of the desired by-product. The system is operated under optimal lighting and nutrient availability conditions in the first stage. In the second stage, stress conditions are applied by excess or lack of nutrients, high or low lighting, and high or low salinity (LIYANAARACHCHI et al., 2021). Different combinations of these factors can produce various compounds from microalgae and simultaneously treat wastewater. Two-stage cultivation systems allow for exploring the advantages of each configuration while mitigating their disadvantages. In this context, studies have shown greater lipid productivity and economic viability by combining open ponds with photobioreactors, emphasizing that applying stress to increase lipid accumulation is not feasible exclusively with photobioreactors (NAGAPPAN et al., 2019; NARALA et al., 2016).

The search for higher accumulations of value-added compounds has stimulated various types of research using two-stage cultivation. POLAT AND ALTINBAS (2023) performed two-stage cultivation using anaerobic digestate, where microalgae culture was subjected to stress with sodium chloride (NaCl) and ferric chloride (FeCl₃). The authors observed that lipid content varied between 11-28%, while protein content was 34-45% and carbohydrates were 23-53%, respectively. NEZAFATIAN et al. (2023) also used the two-stage cultivation approach for marine microalgae (*Tetraselmis tetraethele*), using effluent from food processing as a medium to produce bioactive compounds. Moreover, the authors observed greater pigment production (0.59 mg mL⁻¹) under fluorescent light and exposed to saline stress during the second cultivation stage (NEZAFATIAN et al., 2023).

It is important to note that the synergistic effect of stresses should be studied to optimize biocompounds production and understand how these

stresses affect the metabolism of microalgae (AZIZ et al., 2020). To evaluate a new route for cyanobacteria-based biorefinery (BERC01) using urban wastewater, KHAN et al. (2022) utilized two-stage cultivation. In the first stage, the BERC01 strain was inoculated with domestic wastewater containing primary sludge, and when the medium became clear, the culture was harvested. In the second stage, the biomass was cultivated for 12 days in urban wastewater treated in the previous stage. The authors observed that this strategy improved metabolite biosynthesis, as cultivation in wastewater increased carbohydrate and protein productivity by 10 times and 3 times, respectively, compared to the synthetic medium. Additionally, cultivation in wastewater produced 37.66% saturated and 62.33% unsaturated FAMES (KHAN et al., 2022).

In another study, NUR et al. (2019) investigated the production of C-phycoerythrin, the main phycobiliprotein component, cultivated in palm oil mill effluent (POME) through different two-stage cultivation configurations. The best results were observed in saline growth medium containing 50% POME at the first stage and 100% POME supplemented with 800 mg L⁻¹ urea at the second stage. This approach led to the productivity of 70.0 and 4.43 mg L⁻¹ d⁻¹ for biomass and C-phycoerythrin, respectively.

Therefore, two-stage cultivation is a promising strategy to increase biomass and value-added compound production, such as lipids, carbohydrates, and pigments. The planned transition between growth and stress phases allows for exploiting the advantages of different cultivation systems and optimizing biocompound production. Moreover, using wastewater as a cultivation medium is a sustainable alternative. However, it is important to emphasize that the main limitation of this strategy is the need for an extra harvesting step between the first and second stages of cultivation, which can increase construction and operation costs. Additionally, although there are studies on applying two-stage cultivation at a commercial scale (PANIS; CARREON, 2016), investigations are still restricted to pure cultivation with the use of fertilizers and chemical compounds. Therefore, more studies are needed to evaluate these cultivation conditions to optimize biomass and biocompounds production, determining the feasibility of applying the technology in the context of wastewater treatment plants.

4.3. Emerging harvesting technologies

In Table 4.2, some technologies for harvesting microalgae biomass are presented. In Figure 4.2, highlights of each microalgae biomass harvesting technology explored in this review article are presented.

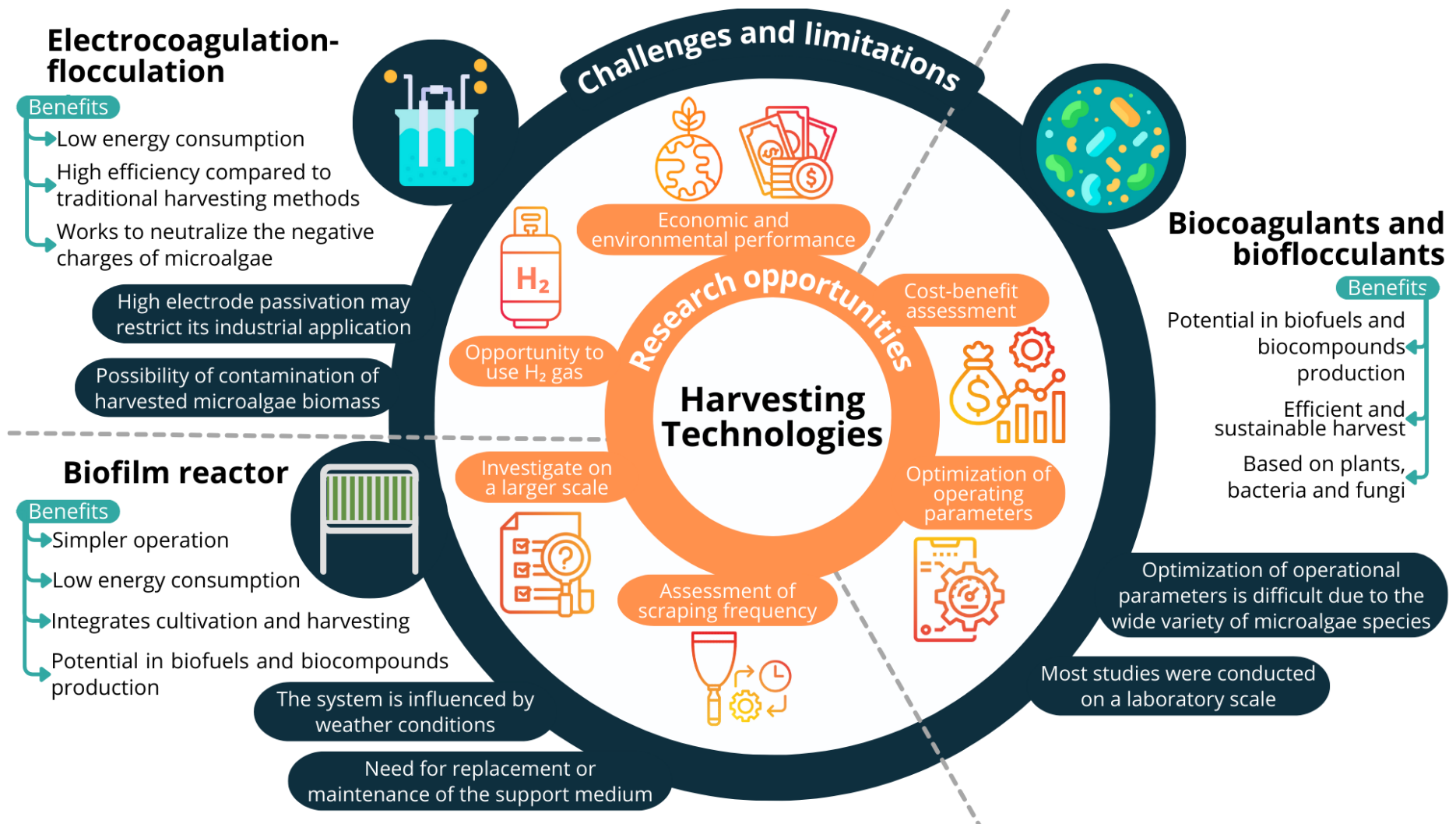


Figure 4.2. Overview of innovative microalgae biomass harvesting technologies.

Tab 4.2. Microalgae biomass harvesting technologies.

| Harvesting technology | Cultivation medium | Microalga strain | Biomass concentration | Operation condition | Harvesting efficiency | Reference |
|---------------------------------|---------------------|---|------------------------|--|-----------------------|---|
| Electrocoagulation-flocculation | Synthetic medium | <i>Tetraselmis</i> sp. | 300 mg L ⁻¹ | Aluminum electrodes, electrolysis time of 10 minutes, and current density of 7.1 mA cm ⁻² | 99.90 % | HAWARI et al., (2020) |
| Electrocoagulation-flocculation | Synthetic medium | <i>Tetraselmis</i> sp. | - | Interdigitated cylindrical Al electrodes, spaced 0.5 cm apart, and a current density of 50 mA cm ⁻² | 96.18 % | KHATIB et al., (2021) |
| Electrocoagulation-flocculation | Synthetic medium | <i>Nannochloropsis salina</i> | 0.5 g L ⁻¹ | Metal-air fuel cell with Fe electrode and an electrolysis time of 3 hours | < 85% | MAHMOOD; HWAN KIM; PARK, (2021) |
| | | | | Metal-air fuel cell with Al electrode and an electrolysis time of 2 hours | 100 % | |
| | | | | Metal-air fuel cell with Mg electrode and an electrolysis time of 2 hours | 100 % | |
| Electrocoagulation-flocculation | Abattoir wastewater | <i>Chlorella</i> sp. and <i>Scenedesmus</i> sp. | 0.72 g L ⁻¹ | Stainless steel electrodes, voltage of 20 V, and an electrolysis time of 45 minutes | 87 % | RAEISOSSADATI; MOHEIMANI; BAHRI, (2021) |

| Harvesting technology | Cultivation medium | Microalga strain | Biomass concentration | Operation condition | Harvesting efficiency | Reference |
|---------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------|--|-----------------------|------------------------------------|
| Electrocoagulation-flocculation | A ratio of 1:9 of microalgae to water | <i>C. vulgaris</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>B. braunii</i> , <i>B. Sudeticus</i> and <i>A. falcatus</i> | 2 g L ⁻¹ | Aluminum electrodes, current density of 250 A m ⁻² , and electrode spacing of 1 cm | 87 % | RAFIEE et al., (2019) |
| Biocoagulants bioflocculants | Human urine | <i>Chlorella</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., <i>Cynecocystis</i> sp., and <i>Spirulina</i> sp. | 0.1 – 1 g L ⁻¹ | <i>M. oleifera</i> (10 mg ml ⁻¹) after 20 minutes <i>M. oleifera</i> (4 mg ml ⁻¹) and chitosan (0,75 mg ml ⁻¹) after 20 minutes | 75.5 % 95.76 % | BEHERA; BALASUBRAMANIAN, (2019) |
| Biocoagulants bioflocculants | Domestic wastewater | - | - | Tannin at 50 mg L ⁻¹ at pH 7 | 98.99 % | FERREIRA et al., (2020) |
| Biocoagulants bioflocculants | Synthetic medium | <i>Desmodesmus brasiliensis</i> | 0.5 g L ⁻¹ | Bacterium <i>Bacillus licheniformis</i> CGMCC 2876 | 98% | NDIKUBWIMANA et al., (2016) |

| Harvesting technology | Cultivation medium | Microalga strain | Biomass concentration | Operation condition | Harvesting efficiency | Reference |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|-----------------------|---------------------------|
| Biocoagulants biofloculants | Seafood wastewater | <i>Chlorella vulgaris</i> 211-19 | 50 mg L ⁻¹ | aerobic bacteria present in wastewater effluents | 92 % | NGUYEN et al., (2019) |
| Biocoagulants biofloculants | Domestic wastewater | <i>Chlorella sorokiniana</i> UUIND6 | - | Filamentous fungus <i>Aspergillus niger</i> Ind-Jiht-5 (1 × 10 ⁶ spores per mL) 10% | 90 % | JAISWAL et al., (2022) |
| Biocoagulants biofloculants | Anaerobic cassava wastewater | <i>Chlorella vulgaris</i> TISTR 8580 | - | Filamentous fungus <i>Aspergillus niger</i> (F5) | 70 % | PADRI et al., (2022) |
| Biocoagulants biofloculants | Aquaculture wastewater | <i>Chlorella</i> sp. | 0.3 - 0.6 mg L ⁻¹ | <i>Aspergillus niger</i> 30 g L ⁻¹ at pH 5 - 6 | > 90 % | MOHD NASIR et al., (2019) |
| Biocoagulants biofloculants | Molasses wastewater | <i>Chlorella</i> sp. | - | Co-cultivation with <i>Aspergillus</i> sp. | 97 % | YANG; LI; WANG, (2019) |

| Harvesting technology | Cultivation medium | Microalga strain | Biomass concentration | Operation condition | Harvesting efficiency | Reference |
|-----------------------------|-------------------------------|--|--|---|-----------------------|--------------------------|
| Biocoagulants biofloculants | Synthetic medium | <i>Chlorella</i> sp. | 0.12 - 0.57 g L ⁻¹ | <i>Penicillium</i> sp. fungal pellet (2.5h and pH 4) | 98.20 % | CHEN et al., (2018) |
| | | | | Spores of <i>Penicillium</i> sp. (28h, pH 7) | 99 % | |
| Biocoagulants biofloculants | Synthetic medium | <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | - | Co-flocculation of bacteria (<i>Citrobacter freundii</i>) and fungi (<i>Mucor circinelloides</i>) | 97.45% | JIANG et al., (2021) |
| Biofilm reactor | Domestic wastewater | <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Eutetramorus fottie</i> , <i>Desmodemus</i> | 29 mg L ⁻¹ | Pilot-scale hybrid cultivation reactor (HRAP + BR) | 92% of humidity | ASSIS et al., (2020) |
| Biofilm reactor | Anaerobically digested slurry | <i>Chlorella</i> and <i>Phormidium</i> | 3.10 g m ⁻² d ⁻¹ | Biofilm reactor consisting of biofilm support material (19° slope), | - | CHOUDHARY et al., (2017) |

| Harvesting technology | Cultivation medium | Microalga strain | Biomass concentration | Operation condition | Harvesting efficiency | Reference |
|-----------------------|---------------------|---------------------------|--|--|---|-------------------------|
| | Domestic greywater | | 3.64 g m ⁻² d ⁻¹ | recirculation tank, and submersible pump | | |
| | Cattle wastewater | | 4 g m ⁻² d ⁻¹ | | | |
| Biofilm reactor | Domestic wastewater | <i>Chlorella vulgaris</i> | - | Pilot-scale polyester biofilm reactor operated in parallel with a decanter | 99.58% recovery efficiency, 94.53% humidity | FERREIRA et al., (2020) |

4.3.1. Electrocoagulation-flocculation

Electrocoagulation-flocculation (ECF) combination is an efficient alternative that can address the problems of traditional methods such as high energy consumption and use of chemical inputs (UDAYAN et al., 2022). Previous works point out that chemical inputs directly impact the biomass obtained, besides comprising in increased environmental impacts (PEREIRA et al., 2021; SILVA et al., 2022). Additionally, it is effective in treating wastewater (COIMBRA et al., 2021; DAS; SHARMA; PURKAIT, 2022a) and harvesting microalgae biomass (KHATIB et al., 2021; PARMENTIER et al., 2020). The process involves electrolysis with direct current, using both metallic electrodes such as aluminum (Al), iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), and magnesium (Mg), and carbon electrodes (MAHMOOD; HWAN KIM; PARK, 2021; RAHMANI et al., 2017b). When metallic electrodes are used, two main phenomena occur. First, metal oxidation releases metal cations that neutralize microalgae's negative charges, promoting their aggregation by facilitating the elimination of repulsive forces. Second, oxygen and hydrogen bubbles are generated due to water electrolysis, promoting the flotation and suspension of the aggregates formed earlier (VANDAMME et al., 2011; VISIGALLI et al., 2021).

ECF offers advantages in microalgae harvesting, such as the absence of harmful anions, lower risk of overdosing, and easy control of operational parameters. Furthermore, biomass recovery via ECF is more efficient and occurs in less time than conventional flocculation and autoflocculation (RAEISSADATI; MOHEIMANI; BAHRI, 2021). The method applies to various microalgae species and costs less than centrifugation, saving approximately 83-89% (LUCAKOVA et al., 2021b). However, it faces challenges related to energy consumption, pH variations, and the possible metal dissolution in the biomass and clarified liquid (FAYAD et al., 2017; LUCAKOVA et al., 2021b).

Harvesting efficiency through ECF depends on (i) operational parameters, (ii) microalgae characteristics, and (iii) culture medium characteristics. Operational parameters significantly influence ECF, with electrode arrangement and material, current, electrolysis time, and reactor configuration being the main factors to be observed and controlled throughout the process. Studies have analyzed various electrode materials, with Al being the most efficient and cost-effective (BAIERLE et al., 2015; HAWARI et al., 2020; PARMENTIER et al.,

2020). Electrode arrangement and the distance between them also influence the process. Low metal concentrations in the harvested biomass were reported in continuous reactors with low-current concentric tubular electrodes (PARMENTIER et al., 2020).

Microalgae characteristics also influence the ECF process because microalgae cells are typically negatively charged, with variations in zeta potential between species (VISIGALLI et al., 2021). Extracellular polymeric substances (EPSs) are the main source of this charge in various species (BRANYIKOVA et al., 2018). Additionally, studies show that the initial biomass concentration can influence harvesting efficiency. LUCAKOVA et al., (2021) evaluated different ranges of initial biomass concentration and found that between 0.2-2 g L⁻¹, the harvesting efficiency was over 95%, while between 2.50–3.08 g L⁻¹, the harvesting efficiency was 2–4%.

The destabilization of cell charges by metal cations, which promotes aggregate formation, has been observed in previous studies (VISIGALLI et al., 2021). These studies have predominantly focused on laboratory-scale experiments using single species in synthetic mediums. However, it is important to note that the dynamics in outdoor open systems, such as high-rate algal ponds (HRAPs) that treat wastewater, involve diverse microorganisms. Given this, larger-scale research using wastewater as the cultivation medium is needed.

Salinity, pH, electrical conductivity, and chloride concentration, among other characteristics of the culture medium, also influence the ECF process. pH impacts water hydrolysis and metal solubility and determines the forms of metal hydroxides that are formed, a parameter frequently monitored during operation (RAHMANI et al., 2017b). Soluble metals concentration changes with pH, affecting reactions. JIANG et al. (2021) evaluated the effect of pH on harvesting efficiency and achieved better harvesting performance at neutral pH. According to the authors, pH plays a crucial role in electrical conductivity due to the dissociation of positive and negative ions in the solution. These ions neutralize the charge on the cell surface, reduce zeta potential, and promote cell adhesion and agglomeration (LUCAKOVA et al., 2021b).

According to VISIGALLI et al., (2021), an increase in salt content favors medium conductivity and can reduce energy demand. VANDAMME et al., (2011) compared the harvesting efficiency of ECF for marine species (*Phaeodactylum*

tricornutum) and freshwater species (*Chlorella vulgaris*). They concluded that energy consumption was 15 times lower under saline conditions (0.3 kWh kg⁻¹ and 2 kWh kg⁻¹, respectively). According to the authors, this result may be related to the greater electrolytic release efficiency of Al in a saline medium. In this context, using wastewater for microalgae cultivation is an opportunity to provide adequate electrical conductivity for ECF without the need for NaCl supplementation.

However, many studies involving ECF conduct their investigations in synthetic media under controlled operating conditions. HAWARI et al., (2020) achieved a harvesting efficiency of 90.9% using alternating current and Al electrodes when harvesting the marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) cultivated in a synthetic medium. KHATIB et al., (2021) obtained 96.18% efficiency with a cylindrical arrangement of interlinked electrodes and reduced Al electrode wear. Also in synthetic culture medium, MAHMOOD et al. (2021) found higher lipid content with Mg electrodes (9.79–28.9%), followed by Al (8.77–23.8%) and Fe (9.79–28.9%). FAYAD et al. (2017) stated that ECF did not affect lipid content and reduced pigments in biomass cultivated in a synthetic medium.

In the wastewater context, RAEISSADATI et al. (2021) pointed out that the best biomass recovery performances (87%) were achieved at pH 9.5 with voltage and reaction times of 20 volts and 45 minutes. The study conducted by RAFIEE et al., (2019), was investigated (i) the harvesting of microalgae culture, (ii) separation of wastewater, and (iii) a mixture of both (1:9). The wastewater originated from the food industry, and the microalgae used were cultivated in a cylindrical photobioreactor with artificial lighting and aeration (mixed flow of air and CO₂). The main conclusions were that electrocoagulation is efficient for collecting microalgae from wastewater without the risk of cell rupture, besides consuming chemical oxygen demand (COD), ammonium, and nitrate nutrients.

Despite the promising results achieved in the research, optimizing the process is necessary to reduce energy consumption, increase harvest efficiency, and lower the residual metal concentrations in microalgae biomass and clarified effluent. Additionally, assessing the process on a large scale is a crucial step to understanding the operational parameters of the process, considering the wide variability in the characteristics of the microalgae biomass cultivation medium. It is also important for researchers to focus on developing technologies that enable

the capture of H₂ gas generated during the ECF process. These advancements could make ECF a more efficient and viable environmental and economic strategy.

4.3.2. Biocoagulants and biofloculants

Using biocoagulants and biofloculants in microalgae harvesting represents a promising, environmentally sustainable technology. They are as efficient as chemical coagulants and do not cause toxicity to the harvested biomass (KURNIAWAN et al., 2022). Biocoagulants and biofloculants can be plant-based (BEHERA; BALASUBRAMANIAN, 2019; FERREIRA et al., 2020), bacterial (NDIKUBWIMANA et al., 2016; NGUYEN et al., 2019), and fungal-based (JAISWAL et al., 2022; PADRI et al., 2022; YANG; LI; WANG, 2019).

Biocoagulants act on the electrostatic destabilization of microalgae particles, while biofloculants facilitate agglomeration due to the presence of high molecular weight compounds. This ability to react and agglomerate suspended particles or colloids in solution is due to functional groups such as carboxyl, hydroxyl, amino, methoxy, and amide (OGBONNA; NWOBA, 2021). Additionally, biocoagulation processes can act on biomass separation through different mechanisms, such as sweeping, charge neutralization, and bridging, depending on the agent type, as well as cultivation and harvesting conditions. Therefore, harvesting efficiency is influenced by dosage, pH, initial microalgae concentration, and agitation (HUANG et al., 2023; KURNIAWAN et al., 2022).

Regarding plant-based biocoagulant, a study compared different natural sources (neem leaves, cactus pods, moringa seeds, orange peels, pomegranate, and banana) in the harvesting of microalgae cultivated in human urine (BEHERA; BALASUBRAMANIAN, 2019). The highest efficiencies were observed in treatments with moringa (75.5%) at pH 7.5–7.8 after a settling time of 100 minutes and moringa combined with chitosan and moringa combined with chitosan (95.76%) at pH 7.5–7.8 after 20 minutes. According to the authors, the primary coagulation mechanism responsible for these outcomes was the sweep coagulation mechanism. Coagulation with tannin (dose of 50 mg L⁻¹) evaluated by FERREIRA et al., (2020) demonstrated effectiveness in recovering microalgae biomass from domestic wastewater. Using Jar Test (Ethik Technology), the main mixing conditions evaluated were fast mixing for 1 min, followed by slow mixing

at 25 rpm for 20 min. Subsequently, a settling time of 30 minutes was applied, resulting in an impressive recovery efficiency of 98.99% (FERREIRA et al., 2020).

The symbiotic relationship between bacteria and microalgae, a natural process in algal cultures, can be explored to optimize the harvesting of suspended cultures (OGBONNA; NWOBA, 2021). Bacteria and microalgae secrete EPS, such as proteins and polysaccharides, which neutralize the charges on cell surfaces and in the electrostatic bridge formation (LIU et al., 2023). This interaction results in the aggregation and flocculation of microalgae cells (KURNIAWAN et al., 2022). The harvesting of *Desmodesmus brasiliensis* microalgae through the biocoagulant produced by the bacterium *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 achieved an efficiency of over 98% (NDIKUBWIMANA et al., 2016). NGUYEN et al. (2019) achieved a harvesting efficiency of 92% through the formation of microalga *Chlorella vulgaris* 211-19 and bacteria bioflocs in wastewater from washing and processing seafood.

Microalgae bioflocculation using fungi is considered an economical and green method since no chemical agents are needed, and it generates pellets or flakes with a larger size, influencing harvesting efficiency (CHU et al., 2021). The association between filamentous fungi (*Aspergillus niger*) and microalgae biomass (*Chlorella sorokiniana* UUIND6) allowed the formation of a pellet-like structure and maximum harvesting efficiency (90%) for a concentration of 10% of fungal granules (JAISWAL et al., 2022). However, the high harvest efficiency reported by the authors may have been influenced by the extended operational time (24 hours).

Fungal pellets (*Aspergillus niger* F5) for microalgae harvesting, cultivated in wastewater, were evaluated by PADRI et al. (2022), achieving the removal of 70% of algal cells from the suspension via adsorption mechanisms. Using *Aspergillus niger*, NASIR et al. (2019) observed an efficiency of over 90% for microalgae (*Chlorella* sp.) cultivated in aquaculture wastewater. Harvesting efficiencies exceeding 97% were observed in the study conducted by YANG et al. (2019) during microalgae and fungi co-cultivation.

Additionally, bioflocculants can influence value-added compound yields, such as the fatty acid profile of the collected microalgae biomass. JAISWAL et al. (2022) observed a significant increase in lipid content (26%) in microalgae biomass harvested by fungal-assisted bioflocculation. YANG et al. (2019)

proposed a new method for producing and harvesting microalgae biomass through the filamentous fungi in molasses wastewater co-cultivation. The authors achieved 35.2% lipid content and 38.6% protein content, besides 31.97% SFA (saturated fatty acids), 23.23% MUFA (monounsaturated fatty acids), and 44.80% PUFA, indicating microalgal-fungal biomass as a potential feedstock for biodiesel production.

Therefore, bioflocculants and biocoagulants present an opportunity for efficient and sustainable harvesting of microalgae cultivated in wastewater, in addition to their potential in biofuel production and the integration of bioproducts in the biorefinery context. However, future research must focus on improving the understanding of the processes and mechanisms behind biocoagulation and bioflocculation. Additionally, research should not be limited to the laboratory scale but should also be conducted on a large scale to facilitate their application in microalgae biorefineries.

4.3.3. Biofilm reactor

Biofilm reactors (BR) are a harvesting technology that has attracted researchers' interest in recent decades. In this method, microalgae cultivation occurs integrated with harvesting, considering that microorganisms adhere to a solid surface (support material) and develop within a matrix formed by EPS (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

Due to biofilm formation, attached growth contributes to a simpler and cost-effective harvest, for example, through mechanical or manual scraping, overcoming the challenges of suspended cultivation, where the microalgae's low density and cell size require more energy-intensive methods (ZHUANG et al., 2023). The biofilm also helps increase harvest efficiency, offering lower biomass losses (FERREIRA et al., 2020). Thus, optimizing the harvest stage represents the main advantage of attached growth. However, one of the main limitations is the influence of weather conditions, mainly due to rainy periods that can negatively affect the establishment of microalgae biofilm (ASSIS et al., 2020a).

Biofilm reactors used for wastewater treatment are composed of microorganisms' consortia, including bacteria, microalgae, fungi, protozoa, among others (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). When they come into contact with wastewater, glycoproteins, and polysaccharides macromolecules

are deposited on the support material, forming a conditioning film that attracts microorganisms (ENNACERI et al., 2023).

Three main stages mark the biofilm's life cycle. Initially, free-living planktonic cells (microalgae or bacteria) adhere to the support material surface through adsorption (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). In the second stage, EPS production, secreted by microorganisms, forms a polymeric matrix that structures the biofilm, promoting cell adhesion to other cells and the support material (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). The biofilm matures through the cell division of adhered microorganisms and the adhesion of others in the planktonic state to the EPS matrix (ENNACERI et al., 2023). The EPS matrix stores water and various compounds throughout this process, ensuring a reservoir of essential elements for the microorganisms' development (ENNACERI et al., 2023). During the biofilm maturation, its thickening creates layers with different access conditions to light, nutrients, carbon dioxide, and oxygen (ZHUANG et al., 2018). Finally, in the last stage of the biofilm's life cycle, microorganisms may degrade the EPS matrix to obtain nutrients or seek more favorable locations for light and nutrient acquisition, affecting the integrity of the biofilm (SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2014).

ASSIS et al. (2020) compared two pilot-scale biomass production and harvesting systems: (i) a conventional system consisting of an HRAP followed by a settler and (ii) a hybrid biomass production system (suspended and biofilm) where the suspended biomass grew in an HRAP, and the biofilm was contained in a BR. The moisture content ranged from 91 to 94%. However, no statistical difference was observed between the two systems. Nevertheless, the daily biomass harvest in the BR was five times higher than in the decanters (ASSIS et al., 2020a).

Regarding the efficiency of biofilm technology for harvest, some factors should be considered, such as reactor design, support material type, and scraping frequency, as well as the species that develop because they can directly influence the moisture content of the harvested biomass, biomass concentration, wastewater treatment efficiency, and microalgae growth (HUANG et al., 2023). BR can vary between horizontally stationary submerged biofilms, vertically layered permanently submerged biofilms, intermittently submerged rotating biofilms, inclined biofilms, and permeated biofilms (ENNACERI et al., 2023).

Choosing an appropriate support material is important for developing and harvesting biofilm systems. Therefore, the ideal material should be inexpensive, non-toxic, durable, have a porous/rough texture, and have adequate water retention capacity (OSORIO et al., 2021). ASSIS et al. (2019) Evaluated the performance of different materials (cotton, polyester, and nylon) in a bench-scale BR operated with domestic wastewater. When assessing material durability before and after the experiment, the authors found that cotton was the most fragile material, while polyester yielded the best results in terms of durability.

CHOUDHARY et al. (2017) evaluated five support materials (polypropylene sheet, fiber sheet, muslin fabric, non-woven fabric (TNT), and filter sheet) and the ideal frequency for biomass harvesting (3, 6, 9, and 12 days) in a BR cultivated with microalgae consortia (*Chlorella* and *Phormidium*) in domestic wastewater. The authors observed that some materials made it difficult to harvest due to their porous structure, causing the biomass to become trapped in the matrix. The results indicated TNT as the best support medium and a scraping frequency of 6 days.

FERREIRA et al. (2020) compared the performance of three different harvesting methods over 21 days: (i) gravitational sedimentation (GS), (ii) tannin coagulation followed by gravitational sedimentation (TC + GS), and (iii) a BR operated in conjunction with a decanter (BR + GS). The highest microalgae biomass recovery efficiency was observed in BR + GS (99.58%). Furthermore, BR + GS produced biomass with lower moisture content (94.53%) than TC + GS (99.02%).

Regarding the characteristics of harvested biomass from biofilms, there are still no concrete conclusions about the differences in biochemical composition between attached microalgal biomass and suspended biomass (ZHUANG et al., 2018, 2023). This gap arises from conflicting findings, as some studies have noted differences ((MOU et al., 2023) while others did not find statistically significant differences in this regard (ASSIS et al., 2020a; JOHNSON; WEN, 2010). Considering the type of support material, ASSIS et al., (2019b)observed similar values for neutral lipids (3.7-10.6%), carbohydrates (20.7-21.2%), proteins (23.8-25.6%), and ash (20.4-26.1%) in biofilms cultivated in domestic wastewater using nylon, polyester, and cotton. ZHANG et al., (2017) examined four lignocellulosic materials (pine sawdust (PW), rice husk (RH), oak sawdust (OW)

and sugarcane bagasse (SB) for algal biofilm cultivation in a flat plate photobioreactor (FPPBR), assessing their biomass productivity and biomass chemical composition. Analysis revealed that the biomass productivities were 7.32, 10.92, 8.07, and 9.54 g m⁻² d⁻¹, respectively for RH, PW, OW, and SB. Additionally, the harvested biomass contained high levels of proteins in the four materials (exceeding 30%), surpassing the levels of total lipids and carbohydrates. The lipid content in the biomass ranged from 20 to 23% across the different materials. While there were no significant variations in the chemical composition among the lignocellulosic materials, notable differences were observed in the productivity of the chemical components. In this context, PW achieved the highest yields in total lipids and crude proteins, with 2.53 and 4.01 g m⁻² d⁻¹, respectively. On the other hand, SB was superior in carbohydrate productivity, reaching 2.28 g m⁻² d⁻¹. The authors highlight that biofilm cultivated on lignocellulosic materials form thicker layers. This increased thickness, partly attributed to the natural thickness of the materials, enhances biomass productivity. However, the greater thickness leads to a larger proportion of cells being situated in lower light intensity or even dark areas. This condition can reduce lipid content in the biomass, as higher light levels promote lipid accumulation in algal cells.

In domestic wastewater and outdoor conditions, neutral lipid levels remained below 11% (ASSIS et al., 2017, 2019a, 2020a). For a *Chlorella pyrenoidosa* biofilm cultivated in pig farming wastewater, a lipid content of 35.9% was reported (CHENG et al., 2017). Using anaerobically digested effluents diluted in seawater, YU et al., (2020) cultivated *Scenedesmus* SDEC-8 and *Chlorella* SDEC-18 in an inclined algal biofilm photobioreactor. The authors observed a lipid content of 41.07% for SDEC-8 and 50.95% for SDEC-18. Additionally, the authors observed an increase in the total carotenoid-to-chlorophyll ratio (Carotenoid/*Chlorella*) for SDEC-8 (from 0.13 to 0.34) and SDEC-18 (from 0.15 to 0.28).

Therefore, in the biofilm technology context, further efforts are needed to evaluate the technology performance as a means of harvesting and separation, especially to understand the dynamics behind biofilm development, scraping frequency, the interaction of microalgae with other microorganisms present in the

biofilm (such as fungi and bacteria), among other operational factors that directly affect harvest efficiency.

4.4. Conclusions

As explored in the review, the cultivation strategies and harvesting technologies for microalgae offer significant opportunities for sustainable biocompound production, particularly when using wastewater as a cultivation medium. The key findings from each discussed technology are as follows:

- Blending wastewaters that provide an optimal carbon/nitrogen ratio is crucial. This ensures the availability of these essential nutrients and maintains their balance, which is vital for the growth of specific microalgae species.
- Conducting both technical-economic and environmental analyses is important to evaluate the viability of implementing large-scale cultivation. This includes understanding the strategies for light control and exploring the cellular mechanisms that drive biocompound accumulation.
- The use of NPs is a relatively new practice. Hence, its potential demands further research. This involves exploring NPs in wastewater mediums and assessing their potential outcomes in the context of microalgae biotechnology.
- The two-stage cultivation approach shows significant promise for generating high-value compounds. When integrated with wastewater treatment, it can potentially lead to the development of microalgae biorefineries. However, it is worth noting that most current research is focused on laboratory scales.
- Despite the encouraging results with ECF, there is a need for process optimization. This includes reducing energy consumption, enhancing harvesting efficiency, and minimizing residual metal concentrations in both the microalgae biomass and the clarified effluent.
- While bioflocculant-biocoagulant harvesting method is an efficient alternative, it requires further in-depth evaluation. Such assessments should focus on scaling up, particularly regarding harvest optimization, cost-benefit analysis, and potential environmental impacts.
- Additional research is essential in the microalgae biofilm context, especially concerning the efficacy of these technologies in harvesting and separation processes. Future studies should focus on understanding the biofilm

development dynamics, the necessary scraping frequency, and the interactions between microalgae and other microorganisms in the biofilm, like fungi and bacteria. These aspects are vital as they directly influence the efficiency of the harvesting process.

References

ARATBONI, H. A. et al. Nanotechnology: An outstanding tool for increasing and better exploitation of microalgae valuable compounds. **Algal Research**, v. 71, p. 103019, abr. 2023.

ASSIS, L. R. DE et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.

ASSIS, L. R. DE et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. February, p. 101440, 2019a.

ASSIS, L. R. DE et al. **Evaluation of the performance of reactors with different slopes for microalgae production**. 2nd IWA Conference on Algal Technologies for Wastewater Treatment and Resource Recovery and 12th IWA Specialist Group Conference in Wastewater Pond Technology - IWAAlgae2019. **Anais...**Valladolid: 2019b.

ASSIS, L. R. DE et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. June, p. 111183, 2020.

ASSIS, L. R. DE et al. Environmental benefits of a hybrid system for algal biomass production, harvesting and nutrient recovery under a life-cycle assessment. **Algal Research**, v. 73, p. 103163, jun. 2023.

ASSIS, T. C. DE et al. Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1160–1169, abr. 2019c.

AZIZ, M. M. A. et al. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109621, mar. 2020.

BAIERLE, F. et al. Biomass from microalgae separation by electroflotation with iron and aluminum spiral electrodes. **Chemical Engineering Journal**, v. 267, p. 274–281, 1 maio 2015.

BEHERA, B.; BALASUBRAMANIAN, P. Natural plant extracts as an economical and ecofriendly alternative for harvesting microalgae. **Bioresource Technology**, v. 283, p. 45–52, jul. 2019.

BRAGA, M. Q. et al. Carbon supplementation in domestic sewage via mixing with paint booth effluent: Influence on the performance of bioremediation and algal biomass production from high-rate algal ponds. **Journal of Water Process Engineering**, v. 53, p. 103652, jul. 2023a.

BRAGA, M. Q. et al. Microalgae cultivation and carotenoid production in paint booth effluent mixed with domestic sewage. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 24 nov. 2023b.

BRANYIKOVA, I. et al. Harvesting of Microalgae by Flocculation. **Fermentation**, v. 4, n. 4, p. 93, 9 nov. 2018.

CALIJURI, M. L. et al. Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 305, p. 135508, out. 2022.

CHEIRSILP, B. et al. Enhanced production of astaxanthin and co-bioproducts from microalga *Haematococcus* sp. integrated with valorization of industrial wastewater under two-stage LED light illumination strategy. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, p. 102620, nov. 2022.

CHEN, C.-Y. et al. A novel two-stage process for the effective treatment of swine wastewater using *Chlorella sorokiniana* AK-1 based algal-bacterial consortium under semi-continuous operation. **Bioresource Technology**, v. 365, p. 128119, dez. 2022.

CHEN, J. et al. A comparative study between fungal pellet- and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. **Bioresource Technology**, v. 259, p. 181–190, jul. 2018.

CHENG, P. et al. Biofilm Attached Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* Is a Developed System for Swine Wastewater Treatment and Lipid Production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 21 set. 2017.

CHENG, P. et al. *Tribonema* sp. and *Chlorella zofingiensis* co-culture to treat swine wastewater diluted with fishery wastewater to facilitate harvest. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122516, fev. 2020.

CHOUDHARY, P. et al. Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 276–284, jan. 2017.

CHU, R. et al. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110689, abr. 2021.

COIMBRA, E. C. L. et al. Electrocoagulation of kraft pulp bleaching filtrates to improve biotreatability. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 147, p. 346–355, 1 mar. 2021.

COSTA, C. H. DA et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of The Total Environment**, v. 565, p. 951–960, set. 2016.

COUTO, E. et al. Evaluation of high rate ponds operational and design strategies for algal biomass production and domestic wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 791, p. 148362, 15 out. 2021.

DANG, B. T. et al. Influence of C/N ratios on treatment performance and biomass production during co-culture of microalgae and activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 837, 1 set. 2022.

DAS, P. P.; SHARMA, M.; PURKAIT, M. K. Recent progress on electrocoagulation process for wastewater treatment: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 292, p. 121058, jul. 2022.

DEY, N. et al. Aftermath of nanomaterials on lipid profile of microalgae as a radical fuel supplement – A review. **Fuel**, v. 333, p. 126444, fev. 2023.

DRAGONE, G. Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 160, 1 maio 2022.

ENNACERI, H. et al. Microalgal biofilms: Towards a sustainable biomass production. **Algal Research**, v. 72, p. 103124, maio 2023.

FALLAHI, A. et al. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 272, p. 129878, jun. 2021.

FAROOQ, W. et al. **Monitoring lipids profile, CO₂ fixation, and water recyclability for the economic viability of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivation at different initial nitrogen.** **Journal of Biotechnology** Elsevier B.V., , 10 fev. 2022.

FAYAD, N. et al. Harvesting of microalgae *Chlorella vulgaris* using electro-coagulation-flocculation in the batch mode. **Algal Research**, v. 25, p. 1–11, 1 jul. 2017.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

FERREIRA, J. et al. Carotenoids from wastewater-grown microalgae biomass: Life cycle assessment and techno-economical analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 434, p. 140526, jan. 2024.

GAMA, R. C. N. DA et al. Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101516, set. 2023.

GAO, F. et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, p. 118–124, jun. 2019.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403–415, jun. 2017.

HAWARI, A. H. et al. Effect of the induced dielectrophoretic force on harvesting of marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) in electrocoagulation. **Journal of Environmental Management**, v. 260, 15 abr. 2020.

HE, Y. et al. Recovery of nutrients from aquaculture wastewater: Effects of light quality on the growth, biochemical composition, and nutrient removal of *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 69, p. 102965, jan. 2023.

HENRÍQUEZ, V. et al. Carotenoids in Microalgae. Em: [s.l: s.n.]. p. 219–237.

HERRERA, A. et al. Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, n. 125005, p. 12, 2021.

HUANG, K.-X. et al. Integrated culture and harvest systems for improved microalgal biomass production and wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128941, maio 2023.

JAISWAL, K. K. et al. Bio-flocculation of oleaginous microalgae integrated with municipal wastewater treatment and its hydrothermal liquefaction for biofuel

production. **Environmental Technology & Innovation**, v. 26, p. 102340, maio 2022.

JAVED, F. et al. Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: A pathway towards sustainable biorefinery. **Fuel**, v. 255, n. February, p. 115826, 2019.

JIANG, J. et al. Harvesting of Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* by Bio-flocculation with Bacteria and Filamentous Fungi. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 1, p. 145–154, 17 jan. 2021.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 525–534, 28 jan. 2010.

KADAR, E. et al. The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. **Science of The Total Environment**, v. 439, p. 8–17, nov. 2012.

KALIAMURTHI, S. et al. The relationship between *Chlorella* sp. and zinc oxide nanoparticles: Changes in biochemical, oxygen evolution, and lipid production ability. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 43–50, out. 2019.

KANG, N. K. et al. Enhancing lipid productivity of *Chlorella vulgaris* using oxidative stress by TiO₂ nanoparticles. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 5, p. 861–867, 8 maio 2014.

KARUPPANNAN, S. K. et al. Characterization, antibacterial and photocatalytic evaluation of green synthesized copper oxide nanoparticles. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101904, jan. 2021.

KHAN, A. Z. et al. Two-stage algal cultivation for the biotransformation of urban wastewater's pollutants into multiple bioproducts in a circular bioeconomy paradigm. **Energy Conversion and Management**, v. 273, p. 116400, dez. 2022.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, nov. 2019.

KHATIB, W. A. et al. Enhancing the electrocoagulation process for harvesting marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) using interdigitated electrodes. **Journal of Environmental Management**, v. 292, n. February, p. 112761, 2021.

KHOEYI, Z. A.; SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the

microalgae, *Chlorella vulgaris*. **Aquaculture International**, v. 20, n. 1, p. 41–49, 28 fev. 2012.

KONG, F. et al. Improved decolorization and mineralization of azo dye in an integrated system of anaerobic bioelectrochemical modules and aerobic moving bed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 353, p. 127147, jun. 2022.

KURNIAWAN, S. B. et al. Potential of microalgae cultivation using nutrient-rich wastewater and harvesting performance by biocoagulants/biofloculants: Mechanism, multi-conversion of biomass into valuable products, and future challenges. **Journal of Cleaner Production**, v. 365, p. 132806, set. 2022.

LAM, K. L.; ZLATANOVIĆ, L.; VAN DER HOEK, J. P. Life cycle assessment of nutrient recycling from wastewater: A critical review. **Water Research**, v. 173, 2020.

LEONG, W. H. et al. Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium. **Fuel**, v. 313, p. 123052, abr. 2022.

LIANG, L. et al. Protein reserves elucidate the growth of microalgae under nitrogen deficiency. **Algal Research**, v. 75, p. 103269, set. 2023.

LIU, Z. et al. Technologies for harvesting the microalgae for industrial applications: Current trends and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 387, p. 129631, nov. 2023.

LIYANAARACHCHI, V. C. et al. Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. **Algal Research**, v. 57, p. 102353, jul. 2021.

LOGANATHAN, B. G. et al. A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1445–1455, 8 ago. 2020.

LUCAKOVA, S. et al. Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae. **Bioresource Technology**, v. 323, 1 mar. 2021.

MAHMOOD, A.; HWAN KIM, J.; PARK, J. W. Application of metal-air fuel cell electrocoagulation for the harvesting of *Nannochloropsis salina* marine microalgae. **Renewable Energy**, v. 171, p. 1224–1235, 1 jun. 2021.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 3187–3201, fev. 2019.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 431–440, out. 2013.

MENDONÇA, H. V. DE et al. Microalgae in a global world: New solutions for old problems? **Renewable Energy**, v. 165, p. 842–862, 2021.

MIN, K. H. et al. **Recent progress in flocculation, dewatering, and drying technologies for microalgae utilization: Scalable and low-cost harvesting process development. Bioresource Technology** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2022.

MOHD NASIR, N. et al. Advances in water and wastewater treatment harvesting of *Chlorella* sp. microalgae using *Aspergillus niger* as bio-flocculant for aquaculture wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 249, p. 109373, nov. 2019.

MORAIS, E. G. DE et al. Microalgae harvesting for wastewater treatment and resources recovery: A review. **New Biotechnology**, v. 78, p. 84–94, dez. 2023.

MORENO-GARCIA, L. et al. Optimization of the proportions of four wastewaters in a blend for the cultivation of microalgae using a mixture design. **Bioresource Technology**, v. 283, p. 168–173, jul. 2019.

MOU, Y. et al. The effects of carbon nitrogen ratio and salinity on the treatment of swine digestion effluent simultaneously producing bioenergy by microalgae biofilm. **Chemosphere**, v. 339, p. 139694, out. 2023.

MUTHUKRISHNAN, L. Bio-engineering of microalgae: Challenges and future prospects toward industrial and environmental applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 3–4, p. 310–329, 21 mar. 2022.

NAGAPPAN, S. et al. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. **Fuel**, v. 252, p. 339–349, set. 2019.

NARALA, R. R. et al. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, 2 ago. 2016.

NDIKUBWIMANA, T. et al. Harvesting of freshwater microalgae with microbial bioflocculant: a pilot-scale study. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 47, 27 dez. 2016.

NEZAFATIAN, E. et al. Enhanced production of bioactive compounds from marine microalgae *Tetraselmis tetraele* under salinity and light stresses: A two-stage cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128899, maio 2023.

NGUYEN, T. D. P. et al. Bioflocculation formation of microalgae-bacteria in enhancing microalgae harvesting and nutrient removal from wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 34–39, jan. 2019.

NUR, M. M. A. et al. Enhancement of C-phycoerythrin productivity by *Arthrospira platensis* when growing on palm oil mill effluent in a two-stage semi-continuous cultivation mode. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 5, p. 2855–2867, 8 out. 2019.

NZAYISENGA, J. C. et al. Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 4, 7 dez. 2020.

OGBONNA, C. N.; NWOBA, E. G. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110690, abr. 2021.

OSORIO, J. H. M. et al. A Review of Microalgal Biofilm Technologies: Definition, Applications, Settings and Analysis. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 3, 12 out. 2021.

PADRI, M. et al. Application of *Aspergillus niger* F5 as an alternative technique to harvest microalgae and as a phosphorous removal treatment for cassava biogas effluent wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 46, p. 102524, abr. 2022.

PÁDROVÁ, K. et al. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1443–1451, 12 ago. 2015.

PAGELS, F. et al. **Pigments from microalgae**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

PANIS, G.; CARREON, J. R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a

techno-economic assessment all through production line. **Algal Research**, v. 18, p. 175–190, set. 2016.

PARK, S. et al. Blending water- and nutrient-source wastewaters for cost-effective cultivation of high lipid content microalgal species *Micractinium inermum* NLP-F014. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 388–394, dez. 2015.

PARMENTIER, D. et al. A new reactor design for harvesting algae through electrocoagulation-flotation in a continuous mode. **Algal Research**, v. 47, 1 maio 2020.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Organomineral fertilizers pastilles from microalgae grown in wastewater: Ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 779, n. 146205, p. 11, 2021.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Microalgae organomineral fertilizer production: A life cycle approach. **Algal Research**, v. 71, p. 103035, abr. 2023.

POLAT, E.; ALTINBAŞ, M. Dual-mode cultivation of the mixed microalgal culture to induce lipid synthesis using anaerobic digestate as an ammonia source. **Fuel**, v. 337, p. 127240, abr. 2023.

QU, W. et al. Optimizing real swine wastewater treatment with maximum carbohydrate production by a newly isolated indigenous microalga *Parachlorella kessleri* QWY28. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121702, out. 2019.

RAEISOSSADATI, M.; MOHEIMANI, N. R.; BAHRI, P. A. Evaluation of electrocoagulation, flocculation, and sedimentation harvesting methods on microalgae consortium grown in anaerobically digested abattoir effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 3, p. 1631–1642, 16 jun. 2021.

RAFIEE, P. et al. Electro-separation of microalgal culture from wastewater. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 1 nov. 2019.

RAHMANI, A. et al. Hydrogen recovery from the photovoltaic electroflocculation-flotation process for harvesting *Chlorella pyrenoidosa* microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 31, p. 19591–19596, 3 ago. 2017.

RANI, S.; OJHA, C. S. P. *Chlorella sorokiniana* for integrated wastewater treatment, biomass accumulation and value-added product estimation under varying photoperiod regimes: A comparative study. **Journal of Water Process Engineering**, v. 39, p. 101889, fev. 2021.

REN, H.-Y. et al. Enhanced microalgal growth and lipid accumulation by addition of different nanoparticles under xenon lamp illumination. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122409, fev. 2020.

REN, H.-Y. et al. Lipid production characteristics of a newly isolated microalga *Asterarcys quadricellulare* R-56 as biodiesel feedstock. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 48339–48350, 9 fev. 2023.

SADIQ, I. M. et al. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1180–1187, jul. 2011.

SAMANI, M. S. M.; MANSOURI, H. The novel strategy for enhancing growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* microalgae cultured in dairy wastewater by monochromatic LEDs and melatonin. **Journal of Applied Phycology**, v. 35, n. 2, p. 593–601, 27 abr. 2023.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. The effect of light direction and suspended cell concentrations on algal biofilm growth rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8553–8562, 23 out. 2014.

SENDRA, M. et al. Effects of TiO₂ nanoparticles and sunscreens on coastal marine microalgae: Ultraviolet radiation is key variable for toxicity assessment. **Environment International**, v. 98, p. 62–68, jan. 2017a.

SENDRA, M. et al. Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricorutum*). **Chemosphere**, v. 179, p. 279–289, jul. 2017b.

SILVA, T. A. et al. Microalgae from food agro-industrial effluent as a renewable resource for agriculture: A life cycle approach. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 186, p. 106575, nov. 2022.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. **Microalgae harvesting techniques: A review**. **Journal of Environmental Management** Academic Press, , 1 jul. 2018.

SONG, X. et al. Lipid accumulation by a novel microalga *Parachlorella kessleri* R-3 with wide pH tolerance for promising biodiesel production. **Algal Research**, v. 69, p. 102925, jan. 2023a.

SONG, X. et al. Simultaneous chromium removal and lipid accumulation by microalgae under acidic and low temperature conditions for promising biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 370, p. 128515, fev. 2023b.

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

UDAYAN, A. et al. Mass cultivation and harvesting of microalgal biomass: Current trends and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126406, jan. 2022.

VANDAMME, D. et al. Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 10, p. 2320–2329, out. 2011.

VARGAS-ESTRADA, L. et al. Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. **Fuel**, v. 280, p. 118598, nov. 2020.

VAZ, B. DA S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. DE. Physical and biological fixation of CO₂ with polymeric nanofibers in outdoor cultivations of *Chlorella fusca* LEB 111. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1332–1339, maio 2020.

VISIGALLI, S. et al. Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting – A review. **Separation and Purification Technology**, v. 271, p. 118684, 2021.

VYAS, S. et al. Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 359, p. 127494, set. 2022.

WANG, S. et al. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 6, p. 550–559, 21 nov. 2014.

XIE, B. et al. Biodiesel production with the simultaneous removal of nitrogen, phosphorus and COD in microalgal-bacterial communities for the treatment of anaerobic digestion effluent in photobioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 1092–1102, out. 2018.

XU, K. et al. **Microalgae harvesting technique using ballasted flotation: A review. Separation and Purification Technology** Elsevier B.V., , 1 dez. 2021.

YANG, L.; LI, H.; WANG, Q. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 35–43, mar. 2019.

YOU, X. et al. Sustainability and carbon neutrality trends for microalgae-based wastewater treatment: A review. **Environmental Research**, v. 209, p. 112860, 1 jun. 2022.

YU, Z. et al. Inclined algal biofilm photobioreactor (IABPBR) for cost-effective cultivation of lipid-rich microalgae and treatment of seawater-diluted anaerobically digested effluent from kitchen waste with the aid of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123761, nov. 2020.

ZHANG, Q. et al. Cultivation of algal biofilm using different lignocellulosic materials as carriers. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 115, 4 dez. 2017.

ZHAO, X. et al. Exploring engineering reduced graphene oxide-titanium dioxide (RGO-TiO₂) nanoparticles treatment to effectively enhance lutein biosynthesis with *Chlorella sorokiniana* F31 under different light intensity. **Bioresource Technology**, v. 348, p. 126816, mar. 2022.

ZHENG, H. et al. Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 479–486, fev. 2018.

ZHU, S. et al. Treatment of low C/N ratio wastewater and biomass production using co-culture of *Chlorella vulgaris* and activated sludge in a batch photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 313–320, fev. 2019.

ZHUANG, L.-L. et al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 1110–1119, out. 2018.

ZHUANG, L.-L. et al. Quantified trend of photosynthetic rate along the depth of microalgae biofilm. **Science of The Total Environment**, v. 876, p. 162801, jun. 2023.

5. CAPÍTULO II - MUNICIPAL AND INDUSTRIAL WASTEWATER BLENDING: EFFECT OF THE CARBON/NITROGEN RATIO ON MICROALGAE PRODUCTIVITY AND BIOCOMPOUND ACCUMULATION

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira ¹, Iara Barbosa Magalhães ¹; Thiago Abrantes Silva ¹; Alberto Jose Delgado dos Reis ²; Eduardo de Aguiar do Couto ³; Maria Lúcia Calijuri ¹.

¹Federal University of Viçosa, Department of Civil Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Bioenergy and Biorefineries Unit, National Laboratory of Energy and Geology, Lisbon, Portugal

³Federal University of Itajuba, Institute of Pure and Applied Sciences, Itabira, Minas Gerais, Brazil

Versão publicada na revista *Journal of Environmental Management* (Apêndice II) em 09 de outubro de 2024.

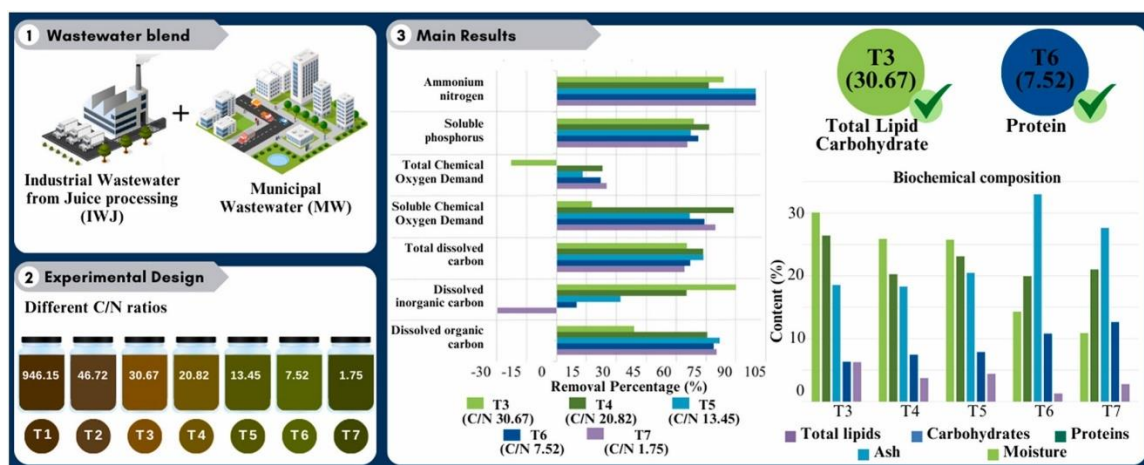
Abstract

Municipal wastewater (MW) and industrial wastewater from juice processing (IWJ) were blended in different proportions to assess the effect of the carbon/nitrogen (C/N) ratio on pollutant removal, microalgal biomass (MB) cultivation, and the accumulation of carotenoids and biocompounds. MB development was not observed in treatments with higher C/N ratios (> 30.67). The wastewater mixture favored the removal of dissolved organic carbon (75.61 and 81.90%) and soluble chemical oxygen demand (66.78 to 88.85%), compared to the treatment composed exclusively of MW (T7). Treatments T3 and T6 (C/N ratio equal to 30.67 and 7.52, respectively) showed higher Chlorophyll-a concentrations, 1.47 and 1.54 times higher than T7 (C/N ratio 1.75). It was also observed that the C/N ratio of 30.67 favored the accumulation of carbohydrates and lipids (30.07% and 26.39%, respectively), while the C/N ratio of 7.52 improved protein accumulation (33.00%). The fatty acids C16:0, C18:1, C18:2,

and C18:3 had the highest concentrations. Additionally, increasing the C/N ratio can be an efficient strategy to improve the production of fatty acids for biofuels, mainly due to the increased concentration of shorter-chain fatty acids (C16:0). These findings suggest that blending wastewater not only enhances treatment performance but also increases the accumulation of valuable carbohydrates and lipids in MB, and optimizes fatty acid production for biofuel applications. This research represents significant progress towards feasibility of using MB produced from wastewater.

Keywords: Microalgae; Biomass; Nutrients removal; Resource recovery; Wastewater treatment; C/N Ratio.

Graphical Abstract



5.1. Introduction

Microalgal biomass (MB) production can be effectively integrated into wastewater treatment due to the abundance of nutrients and organic matter, which is crucial for the symbiotic interactions between microalgae and bacteria. Moreover, the MB produced at the end of this process can be utilized in biofertilizer and biofuel production pathways (CASTRO et al., 2023; PEREIRA et al., 2024b), enhancing the valorization of sanitation resources (LIYANAARACHCHI et al., 2021). However, several challenges can impact MB production performance, such as carbon (C) limitation, which is commonly reported in municipal wastewater (MW) (MORENO-GARCIA et al., 2019; XIE et al., 2019a). A viable alternative is to co-treat MW with other types of wastewater that have a higher carbon concentration. This approach can provide a medium with a more favorable carbon/nitrogen (C/N) ratio, enhancing MB cultivation performance.

The interaction between algae and bacteria improves the efficiency of biological nitrogen (N) and phosphorus (P) removal and effectively reduces aeration energy consumption (YU et al., 2024). However, the availability of C, N, and P can vary between different types of wastewater and, consequently, influence microalgae development (XIE et al., 2019b) and biocompound accumulation (FERREIRA et al., 2024; LIANG et al., 2023). Wastewater from different sources has been used as a cultivation medium for MB, including MW (ASSIS et al., 2017; GAO et al., 2022; KHAN et al., 2022), swine wastewater (CHENG et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2023a, 2023b; QU et al., 2019), agro-industrial sector (PEREIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021; WU et al., 2019), and brewery industry (GAMA et al., 2023; ZHENG et al., 2018). However, the composition of the culture medium plays a fundamental role in biomass production and nutrient removal (MORENO-GARCIA et al., 2019; ZHENG et al., 2018). An example is the C/N ratio, which influences algal growth and the distribution of carbohydrates, lipids, proteins, and other high-value compounds, such as carotenoids.

Carotenoids are a group of pigments important for cell survival and are directly involved in photosynthesis, and their production from microalgae has been evaluated in different studies (CALIJURI et al., 2022; PAGELS et al., 2020). The biomass of *H. pluvialis* reached 9.18 g L⁻¹ and the astaxanthin content 8.49 mg g⁻¹ dry cell weight (DCW) after increasing the C/N ratio to 50 in synthetic culture (LU et al., 2019). Research by VYAS et al. (2022) in aquaculture wastewater showed that the highest lipid production (3.19 g L⁻¹) occurred during heterotrophic cultivation with a C/N ratio of 60, while the highest lutein production was in photoautotrophic cultivation (6.40 mg g⁻¹) with a C/N ratio of 10. However, studies evaluating these aspects within wastewater use are scarce.

The C/N ratio is a key component in microalgae cultivation. When it is less than 5, the polymeric extracts have a high protein content, as most of the intracellular N is in the form of proteins (FALLAHI et al., 2021). Generally, C/N ratios <5 are observed in DW (ASSIS et al., 2019c; BRAGA et al., 2023c), swine wastewater (OLIVEIRA et al., 2023a), and agro-industrial wastewater (PEREIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021). In contrast, C/N ratios >20 and, consequently, higher C content increases carbohydrate concentration (FALLAHI et al., 2021).

Recent literature includes studies investigating the effect of mixing different wastewaters as a strategy to balance nutrient availability (SU et al., 2023; YU et al., 2024) and reduce ammonium (N-NH_4^+) toxicity (MORENO-GARCIA et al., 2019). In this context, IWJ was considered in previous works. The careful selection of wastewater is fundamental to the strategy's success (PEREIRA et al., 2024b). However, the ideal C/N ratio to achieve maximum microalgae productivity may vary between studies due to the wide diversity of wastewater, the great variety of microalgae species, and their ability to adapt to different cultivation conditions.

ZHENG et al. (2018) observed a maximum biomass concentration of 2.85 g L^{-1} with a C/N ratio 7.9 when they mixed pig and brewery wastewater in a 1:5 ratio at pH 7.0. Meanwhile, YU et al. (2024) observed higher productivity ($2.69 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) in a reactor operated under high load conditions with soaking bean water to domestic wastewater ratio of 1:7 (C/N \sim 36). However, the combination of wastewaters did not promote efficient microalgae production in other studies, as reported by BRAGA et al. (2023b) and GAMA et al. (2023), suggesting that certain wastewaters may not be suitable for application in microalgae biotechnology. In these cases, low productivity was caused by the low degradation of organic matter in the wastewater.

SILVA et al., (2024) evaluated microalgae biomass production using IWJ containing a DOC concentration of 1055.77 mg/L and a NO_3^- of 1.30 mg/L , resulting in a high C/N ratio (approximately 812). By combining 50% IWJ with 50% municipal wastewater, the authors achieved a balanced C/N ratio of around 10. In their study, the HRAP setup resulted in microalgae biomass with a protein content of 58.92%, neutral lipid content of 1.40%, membrane lipid content of 9.41%, and carbohydrate content of 10.98%. These results highlight the advantages of blending IWJ compared to other types of wastewaters discussed above, as varying the C/N ratio can influence the biochemical composition of the produced biomass, adapting it for different applications. Additionally, using different proportions of IWJ could provide other C/N ratios, which may be advantageous depending on the specific objective, such as optimizing the production of certain compounds (e.g., carbohydrates, proteins, and lipids).

Considering wastewater's large-scale applicability, it is essential to evaluate the effects of the C/N ratio on treatment under environmental conditions

to estimate its potential results in wastewater treatment plants. Additionally, mixing wastewater is an alternative to carbon dioxide (CO₂) addition, with the potential to be a simpler and more economical solution from an operational point of view. Thus, further advances must be evaluated in this context to enable MB production in wastewater and favor the valorization of sanitation resources.

Therefore, this research aimed to evaluate the effects of increasing the C/N ratio by combining municipal wastewater (MW) with industrial wastewater from juice processing (IWJ), given the higher carbon load in IWJ compared to MW. Specifically, the study investigated the impact of this increased C/N ratio on three main aspects: (i) potential improvements in algal productivity and wastewater treatment performance, (ii) the accumulation of carbohydrates and lipids, and (iii) the accumulation of carotenoids, such as beta-carotene and lutein.

5.2. Material and Methods

The experiment was conducted in the outdoor area of the Sanitary and Environmental Engineering Laboratory at the Federal University of Viçosa, Brazil (20° 46'07.05" S and 42° 51'30.84" W) in a greenhouse, exposed to local climatic and environmental conditions during the winter. The municipality has a humid climate with rainy summers and dry winters, experiencing a water deficit between May and September and a surplus between December and March. According to the National Institute of Meteorology (INMET, 2023), the average temperature in the rainy season (between October and March) and the dry season (between April and September) is 22.17 and 18.31 °C, respectively. The average annual precipitation is 1341 mm, and the relative humidity is 79.21%.

The cultivation medium for microalgae growth was composed of a mixture of MW and IWJ in different proportions. The MW, previously treated in a septic tank, was obtained from a municipal sewage treatment plant. The IWJ, previously treated in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor, was obtained from a wastewater treatment plant of a juice processing industry.

5.2.1. Experimental design and procedure

The experiment was organized in a randomized block design (RBD) with 6 repetitions per block, totaling 42 experimental units. The treatments evaluated are presented in Table 5.1. The experiment was conducted over 40 days in 600 ml glass flasks sealed with polypropylene biolids (Ralm brand) that allow for a

semi-open system and reduce evaporation. The culture flasks were shaken daily throughout the experiment to ensure complete mixing of the culture medium. Each repetition consisted of 500 ml of culture medium (IWJ and MW combined in different proportions), with the addition of 10% inoculum (1.75 mg L^{-1} of Chlorophyll-*a* (Chl-*a*) and 65.71 mg L^{-1} volatile suspended solids (VSS)). The inoculum, composed of *Chlorella vulgaris* and *Botryococcus terribilis*, was produced from domestic wastewater (MW) previously treated in a septic tank. It was developed by mixing treated wastewater with water in a 1:1 v/v ratio in an HRAP, allowing naturally occurring species to proliferate. This approach was designed to select the most adapted species (ASSIS et al., 2019c; BRAGA et al., 2023b; OLIVEIRA et al., 2021, 2023b). A subsequent Phytoplanktonic Community analysis confirmed the species composition. The pH of the samples was not controlled, and no additional CO₂ was supplied to the samples other than the diffusion of CO₂ present in the ambient air.

Table 5.1. Main characteristics of the wastewaters containing different proportions of domestic and juice industry wastewaters.

| Parameters | Treatments | | | | | | |
|--|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| | T1 (100% IWJ) | T2 (80% IWJ + 20% MW) | T3 (70% IWJ + 30% MW) | T4 (60% IWJ + 40% MW) | T5 (50% IWJ + 50% MW) | T6 (30% IWJ + 70% MW) | T7 (100% MW) |
| pH | 8.28 | 8.38 | 8.31 | 8.33 | 8.37 | 8.32 | 8.35 |
| Temperature | 20.42 | 20.33 | 20.22 | 20.21 | 20.19 | 20.29 | 20.33 |
| DO (mg L ⁻¹) | 2.01 | 2.40 | 1.93 | 2.28 | 2.59 | 2.29 | 2.58 |
| Turbidity (NUT) | 121.24 | 136.63 | 149.69 | 138.02 | 144.13 | 139.81 | 239.86 |
| EC (µS/cm) | 3065.77 | 2670.38 | 2518.98 | 2361.80 | 2161.64 | 1807.67 | 1251.93 |
| DOC (mg L ⁻¹) | 1055.70 | 839.70 | 774.90 | 657.60 | 555.80 | 391.70 | 75.51 |
| TSC (mg L ⁻¹) | 1230.00 | 988.80 | 912.30 | 789.60 | 677.60 | 496.60 | 156.60 |
| SCOD (mg L ⁻¹) | 3390.96 | 2307.63 | 2222.11 | 2035.70 | 1590.53 | 890.96 | 170.50 |
| TCOD (mg L ⁻¹) | 4206.75 | 3246.23 | 3013.77 | 2535.70 | 2123.42 | 1426.05 | 351.49 |
| SP (mg L ⁻¹) | 0.27 | 2.91 | 4.58 | 6.38 | 6.02 | 9.45 | 18.54 |
| TP (mg L ⁻¹) | 2.86 | 6.31 | 6.43 | 9.46 | 8.75 | 11.15 | 19.16 |
| N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹) | 0.00 | 20.56 | 28.85 | 37.13 | 49.69 | 65.40 | 88.82 |
| N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹) | 1.30 | 0.60 | 0.90 | 0.80 | 0.70 | 0.60 | 0.50 |
| TKN (mg L ⁻¹) | 18.56 | 31.42 | 42.84 | 51.41 | 61.40 | 77.11 | 108.53 |
| N-org (mg L ⁻¹) | 18.56 | 10.85 | 13.99 | 14.28 | 11.71 | 11.71 | 19.71 |
| VSS (mg L ⁻¹) | 195.00 | 205.00 | 201.67 | 168.33 | 166.67 | 143.33 | 133.33 |
| C/N ¹ | 946.15 | 46.72 | 30.67 | 20.82 | 13.45 | 7.52 | 1.75 |

Note: DO = Dissolved oxygen, EC = Electrical conductivity, TDC = Total dissolved carbon, DOC = Dissolved organic carbon, SCOD = Soluble chemical oxygen demand, TCOD = Total chemical oxygen demand, SP = Soluble phosphorus, TP = Total phosphorus, N-NH₄⁺ = Ammonium nitrogen, N-NO₃⁻ = nitrate, TKN = Total Kjeldahl Nitrogen, N-org = Organic nitrogen, VSS = Volatile suspended solids, and C/N = Carbon/nitrogen ratio. ¹ C/N ratio calculated with TDC and the sum of N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺.

Values of pH, electrical conductivity (EC), dissolved oxygen (DO), and temperature were monitored in situ every two days after shaking the flask using the In-Situ multiparameter probe (model Aqua Troll 500). At the beginning and end of the operation, the following variables were monitored: N-NH₄⁺, nitrate (N-NO₃⁻), total Kjeldahl nitrogen (TKN), soluble phosphorus (SP), and total phosphorus (TP), soluble and total chemical oxygen demand (SCOD and TCOD), VSS, according to Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Total dissolved carbon (TDC), Dissolved organic carbon (DOC), and dissolved inorganic carbon (DIC) were determined using the Shimadzu TOC 5000 analyzer.

5.2.2. Monitoring and Determination of Pigments

During the experimental period, the pigments Chl-*a*, Chlorophyll-*b* (Chl-*b*), and total Carotenoids were monitored and quantified through spectrophotometry (LICHTENTHALER, 1987; PANCHA et al., 2014). The Chl-*a* variable was used to monitor the production of microalgal biomass, and when a decline in this parameter was observed, the treatment was stopped. Chl-*b* was measured to calculate total carotenoids.

Every two days, 6 ml of the microalgae culture was collected and centrifuged at 4,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was removed and replaced with 6 ml of methanol (99.9%), followed by vortex mixing. The samples were then subjected to a water bath at 60 °C for 20 minutes, followed by incubation at 45 °C for 24 hours in the dark. Spectrophotometric readings were taken using a Hach DR 3800 spectrophotometer. Absorbances at 470, 652.4, and 665.2 nm were corrected for turbidity by subtracting the absorbance at 750 nm (Equations 1, 2, and 3).

$$\text{Chlorophyll-a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 16.72 A_{665.2} - 9,16 A_{652.4} \quad \text{Equation 1}$$

$$\text{Chlorophyll-b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = 34.09 A_{652.2} - 15,28 A_{665.2} \quad \text{Equation 2}$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{(1000 A_{470} - 1.63 \text{ Chl-a} - 104.9 \text{ Chl-b})}{221} \quad \text{Equation 3}$$

At the end of the experiment, the biomass was collected and lyophilized for the characterization of specific carotenoids. For qualitative characterization of the present carotenoids, the dry MB was weighed (10 mg) and subjected to saponification by alkaline treatment, as described by ALENCAR et al. (2011). The

process began with homogenizing the samples with 5% (w w⁻¹) potassium hydroxide (KOH), followed by a water bath at 60 °C for 60 minutes, with vortex mixing every 10 minutes. Ethyl acetate was used as the solvent for pigment extraction. A volume of 1 ml was added to the mixture, followed by centrifugation at 2000 G for 5 minutes. The solvent-washing process was repeated until the supernatant became colorless.

Specific carotenoids were determined following the methodology described by CHAN et al. (2013), using a Prominence UFLC Shimadzu (Japan) high-performance liquid chromatography (HPLC) with a C18 column (4.6 × 250 mm), a flow rate of 1 ml per minute, a temperature of 35 °C, and a binary mobile phase. A PDA SPD-M20A detector with a scanning range of 190 to 800 nm was used, with solvent A consisting of methanol (97%), deionized water (3%), ammonium acetate (5 mM), and triethylamine (0.05%), and solvent B consisting of tert-butyl methyl ether and triethylamine (0.05%). Beta-carotene (93%, Sigma) and lutein (96%, Sigma-Aldrich/Supelco) standards were acquired to validate the pigments identified by HPLC.

5.2.3. Biochemical characterization, proximate and ultimate analysis

The carbohydrate content was determined by quantitative acid hydrolysis of the biomass (HOEBLER et al., 1989), followed by the phenol-sulfuric acid method (DUBOIS et al., 1956) and spectrophotometry (490 nm) using the glucose standard curve. Protein content was indirectly quantified using the NKT method (APHA, 2012) and a nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25 (ZHONG et al., 2012a). Lipid content was determined by the Soxhlet extraction method (AOAC, 1990). Neutral lipids were extracted using a fat determination apparatus (Tecnal TE-044-8/50) with hexane (99%) for 6 hours. Subsequently, membrane lipids were extracted with ethanol (96%) for 3 hours in the same apparatus and quantified by gravimetry.

Moisture, ash, volatile matter, and fixed C content were determined according to ASTM (2012). Initially, 1g of biomass was dried at 105 °C for 1 hour. Moisture content was determined by the mass difference before and after drying. The crucible was then covered and heated to 900 °C for 7 minutes to determine the volatile matter. Ash content was determined at 700 °C for 4 hours. Finally, fixed C content was determined by difference. Weightings were performed after cooling the sample to a constant temperature in a desiccator.

The contents of C, hydrogen (H), and N were determined by dry combustion using a Perkin Elmer PE-2400 Series II elemental analyzer. This method involves combusting the sample at 925 °C and analyzing the released gases by gas chromatography. The acetic acid extraction method determined sulfur (S) content (Embrapa, 2009).

5.2.4. Profile of fatty acid methyl esters (FAME) using gas chromatography

The methodology for extracting fatty acids and preparing methyl esters was conducted as described by (FREITAS et al., 2014). The methyl esters were then analyzed by gas-liquid chromatography using a Varian (Palo Alto, CA, USA) 3800 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. The separation was conducted on a Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, CA, USA) fused silica capillary column (0.32 mm x 30 m, film thickness 0.32 µm), using helium as the carrier gas at a flow rate of 3.5 mL min⁻¹. The column temperature program started at 200 °C for 8 minutes, followed by an increase of 4 °C per minute until reaching 240 °C, maintaining this temperature for 16 minutes. The injector and detector temperatures were maintained at 250 °C and 280 °C, respectively, with a split ratio of 1:50 for 5 minutes and then 1:10 for the remaining time. The column pressure was 93 kPa. Identifying peaks and calculating response factors were performed using known standards (Nu-Chek-Prep, Elysian, MN, USA). Each sample was prepared in duplicate and injected twice.

5.2.5. Statistical analysis

Data analysis was conducted using Excel® software. Descriptive statistical analysis, significance tests, and regression analyses were processed using Minitab® software. Analysis of variance (ANOVA) was performed with manual validation, followed by applying the Tukey test at a 5% significance level to distinguish the experimental results.

5.3. Results and discussion

5.3.1. Environmental Conditions and Nutrient Removal Efficiency

The percentage of pollutant removal is shown in Figure 5.1. The physical and chemical characteristics of the cultivation medium at the end of the operation are provided in the Supplementary Material. Figure 5.2 shows data on the

environmental conditions monitored throughout the experimental period. It is important to note that the analysis of chlorophyll-a concentration and total carotenoids was interrupted once a declining trend was observed. Treatments T1 and T2, with initial C/N ratios of 946.15 and 46.72, showed no signs of growth and development of microalgal biomass. Among the observed parameters, the following stand out: pH values (8.87 and 8.79, respectively), low levels of dissolved oxygen (0.82 and 0.98 mg L⁻¹, respectively), and low chlorophyll concentrations (-0.18 and -0.01 mg L⁻¹, respectively), even after 19 days from the start of the study. Nutritional deficiency can explain this phenomenon in terms of N, a common characteristic in IWJ that results in a high C/N ratio (946.15 and 46.72, respectively). Therefore, the physical and chemical characterization of these treatments was not performed.

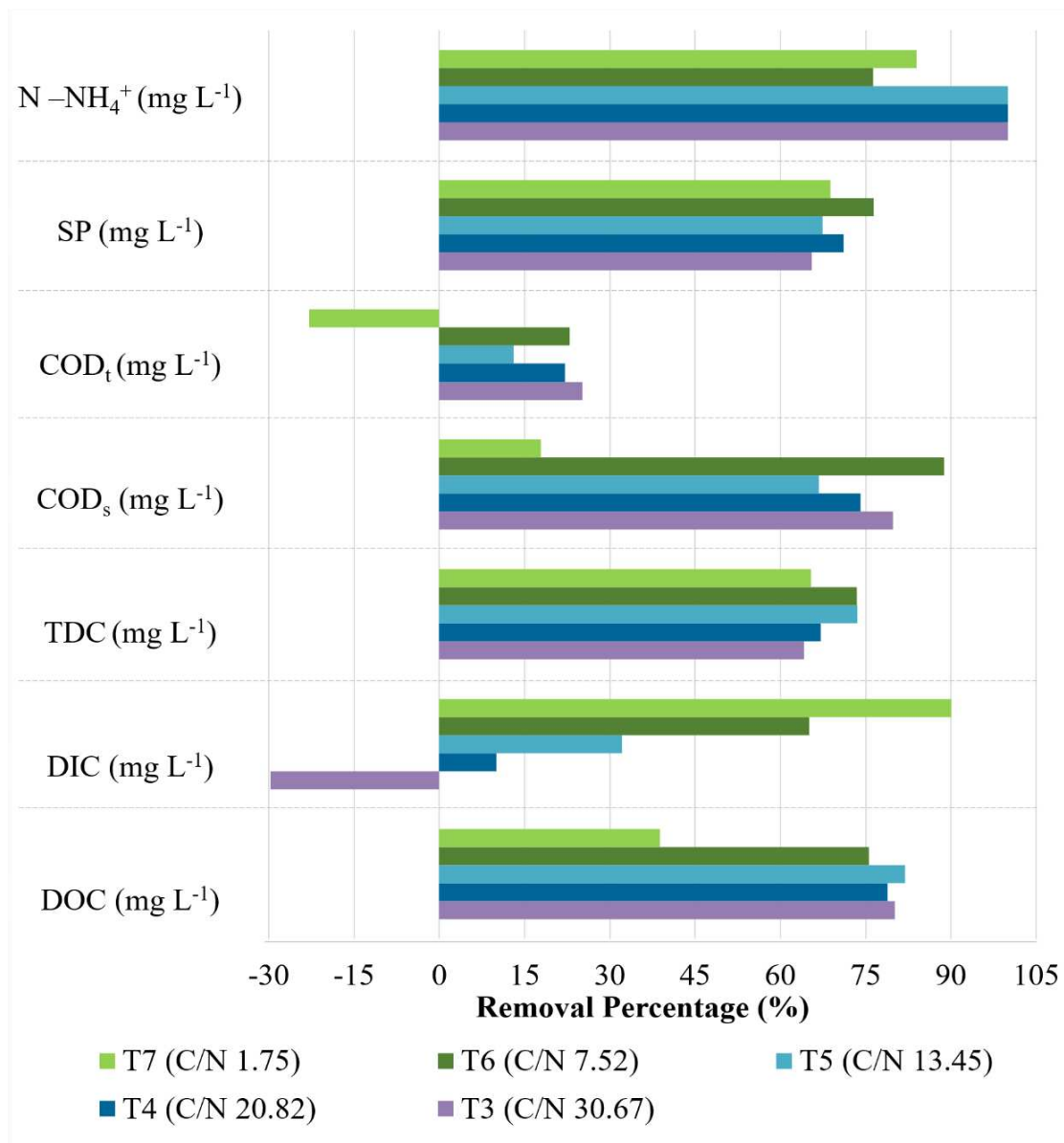


Figure 5.1. The effects of carbon/nitrogen ratio on removal efficiencies of the N-NH_4^+ , SP, COD_t , COD_s , TDC, DIC and DOC.

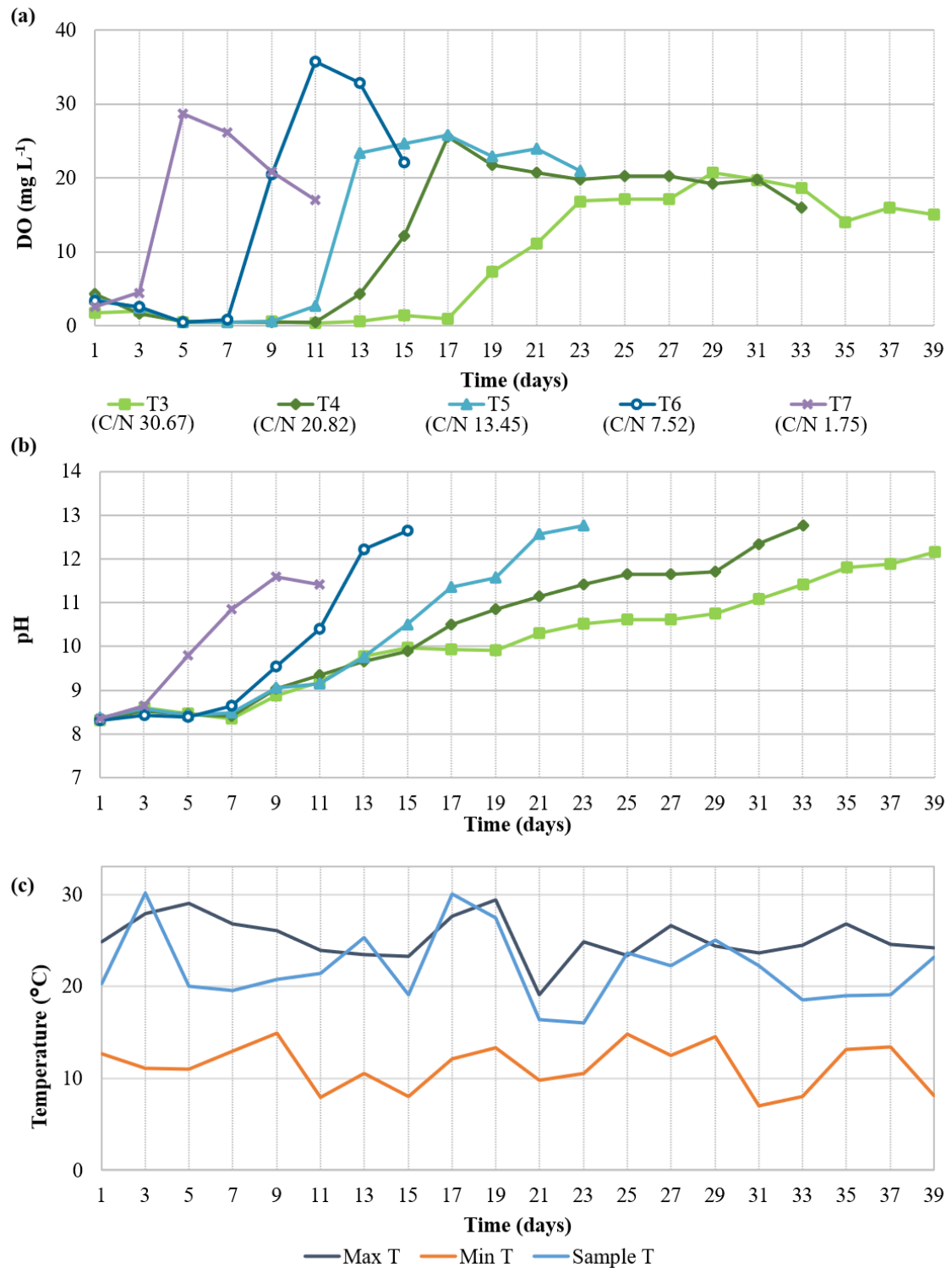


Figure 5.2. Environmental conditions throughout the experimental period. (a) dissolved oxygen, (b) pH, and (c) air temperature (Max T and Min T) and sample temperature (Sample T).

The parameters SCOD, DOC, and DIC allow for understanding the biological processes that occurred during the experiment. First, it was observed that the highest SCOD removal performances were achieved in T6, T3, and T4 (88.85 %, 80.03 %, and 74.12%, respectively). Regarding dissolved DOC, higher efficiencies were observed in T5, T3, and T4 (81.90%, 80.18%, and 78.83%, respectively). For DIC, the highest concentrations were achieved in T3, T4, and T5 (178.10, 118.77, and 82.72 mg L⁻¹), where the C/N ratio was elevated (30.67, 20.82, and 13.45, respectively). Thus, increasing the availability of organic matter in the cultivation environment through the combination of wastewater resulted in the degradation of organic carbon by bacteria. The bacteria, in turn, transformed the organic carbon into inorganic carbon, which was then incorporated by the MB as it became available.

Increasing the availability of organic matter in the cultivation medium affects nutrient removal and influences the cultivation conditions over time. The medium's pH increased, suggesting the growth of MB due to photosynthetic activity, reaching peaks between 11.47 and 12.76. Additionally, in treatments with a higher C/N ratio, the pH curve gradually increased over time (Figure 2-B). The medium's pH increased with the growth of microorganisms, reaching peaks between 11.47 and 12.76. Moreover, in treatments with a higher C/N ratio, the pH curve gradually increased over time (Figure 2-B). Therefore, it was possible to mitigate the rapid rise in pH by providing more carbon in the cultivation medium. However, this pH behavior may affect nutrient availability through the ammonia (N-NH₃) volatilization and precipitation of P.

XIE et al. (2018) evaluated anaerobic digestion effluent and rainwater mixtures. The authors concluded that the synergistic effect of the microalgae-bacteria consortium improved organic matter removal. Even with the wastewater dilution, the authors supplemented the photobioreactors with compressed air containing 2.5% CO₂ due to the low cultivation medium's C/N ratio (~5). This promoted higher SCOD removal (94.28%) observed in the treatment with 272 mg L⁻¹ of SCOD.

Recent research has shown a significant influence between the C/N ratio and removing organic matter and nutrients from wastewater. MOU et al. (2023) pointed out a C/N ratio of 20 and a salinity of 140 mM as the optimal conditions for treating swine wastewater in a microalgae biofilm reactor. At the end of the

treatment, the authors achieved 22.65 mg L⁻¹ of total N, 9.32 mg L⁻¹ of N-NH₄⁺, 4.11 mg L⁻¹ of TP, and 367.28 mg L⁻¹ of TCOD. To evaluate the green microalga (*T. dimorphus* GEEL-06) capacity for treatment, SU et al. (2023) investigated various mixing ratios between domestic and pharmaceutical effluents (1:500, 1:750, and 1:1000). High nutrient removal of N (89.02 %) and P (82.73 %) was observed at the 1000× ratio.

Regarding nutrient removal, it is important to note that pH directly impacts the assimilation and removal of nutrients, such as P and N, through chemical precipitation and volatilization, respectively. For instance, the removal efficiency of N-NH₄⁺ reached 100 % in treatments T3, T4, and T5, where pH values were recorded as 12.15, 12.76, and 12.77, respectively. However, in the treatments T6 and T7, removal efficiencies of 76.27 % and 83.92 % were observed, with pH values of 12.65 and 11.47, respectively. Therefore, the high pH observed in all treatments may have favored the loss of N-NH₃ by volatilization. The treatments with the highest N-NH₄⁺ removal efficiency (T3, T4, and T5) also required longer operation times.

Furthermore, the rise in pH in these conditions occurred more gradually over time, suggesting the possibility of N-NH₄⁺ assimilation through microalgal activity. Additionally, the increase in N-org is related to N assimilation in treatments with high C/N ratios, as observed by DANG et al. (2022). In the case of denitrification, the authors observed that it occurred mainly in the dark phase with DO < 0.2 mg L⁻¹ (DANG et al., 2022). According to the authors, when the system was nutrient-deprived (between the 6th and 10th day of the experiment), C and N sources released by cell lysis were used for denitrification.

Regarding N-NO₃⁻, an increase in concentration was observed in treatments T7, T6, and T5 (293.33 %, 200.00 %, and 61.90 %, respectively). The high concentration of N-NO₃⁻ is related to the activity of nitrifying bacteria, which initially convert N-NH₄⁺ into nitrite (N-NO₂⁻) and subsequently into N-NO₃⁻, a behavior also reported in other studies (FALLAHI et al., 2021; LIU et al., 2022; SÁNCHEZ-ZURANO et al., 2021) However, an increase of only 20.83% and 22.22% was observed in T4 and T3, respectively. According to Su (2021), although microalgae prefer to assimilate N-NH₄⁺ due to lower energy costs, they can also assimilate NO₃⁻ and NO₂⁻, especially when N-NH₄⁺ is scarce (TAN et al., 2021). Thus, the low concentration of N-NO₃⁻ may indicate the presence of

assimilation by microalgae due to N limitation and the possibility that N-NH₃ volatilization may have limited the conversion of N-NH₄⁺ into N-NO₃⁻.

Regarding SP removal, efficiencies between 65.50% and 76.42% were observed. This may be associated with the assimilation process promoted by microalgae. P is a key nutrient used mainly for the synthesis of proteins, nucleic acids, phospholipids, and the synthesis of adenosine triphosphate (ATP) used as an energy source, as well as for intermediates of carbohydrate/sugar metabolism and cell membrane materials (SU, 2021; XIE; LIN; LUO, 2021). Additionally, the chemical precipitation of P may have impacted the reduction of this nutrient, mainly due to the high pH observed during the experimental period. These two mechanisms may have acted simultaneously and gradually over time, especially as the pH increased as the MB developed in the cultivation medium.

5.3.2. Biomass and Pigment Production

Table 5.2 presents the indicators of biomass production, such as VSS, Chl-*a*, and Chl-*b*, as well as the concentration values of beta-carotene and lutein at the end of the operation. Figure 5.3 shows the behavior of Chl-*a* and total carotenoids throughout the experimental batch.

Table 5.2. Average concentration (mg L⁻¹) and productivity (mg L⁻¹ d⁻¹) of VSS, Chlorophyll-*a*, and concentration (µg g⁻¹) of beta-carotene and lutein.

| Treatments | VSS ¹ | | <i>Chl-a</i> ² | | Beta-carotene ¹ | Lutein ¹ |
|-------------------|--|---|--|---|--|--|
| | Concentration (mg L ⁻¹) | Productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹) | Concentration (mg L ⁻¹) | Productivity (mg L ⁻¹ d ⁻¹) | Concentration (µg g ⁻¹) | Concentration (µg g ⁻¹) |
| T3 (C/N 30.67) | 1058.33 ^A (91.80) | 21.42 ^{BC} (2.29) | 3.07 ^A (0.16) | 0.08 ^{BC} (0.00) | 12.81 (0.13) | 507.96 (10.19) |
| T4 (C/N 20.82) | 875.00 ^{AB} (188.04) | 23.56 ^{BC} (2.53) | 2.40 ^B (0.28) | 0.07 ^C (0.01) | 2.83 (0.52) | 102.56 (7.15) |
| T5 (C/N 13.45) | 800.83 ^B (116.37) | 26.42 ^B (2.91) | 2.15 ^B (0.20) | 0.09 ^{BC} (0.01) | 5.66 (0.01) | 199.22 (9.19) |
| T6 (C/N 7.52) | 740.56 ^B (103.26) | 40.04 ^A (3.44) | 3.22 ^A (0.07) | 0.21 ^A (0.00) | 8.28 (0.65) | 171.33 (071) |
| T7 (C/N 1.75) | 403.89 ^C (76.41) | 17.37 ^C (0.41) | 2.09 ^B (0.05) | 0.19 ^B (0.00) | 5.09 (1.09) | 188.12 (5.04) |

Different letters in the same column indicate significantly different means (Tukey test, p-value < 0.05), and standard deviation values are in parentheses.

¹Values refer to the end of the experiment.

²Values refer to the day of highest concentration.

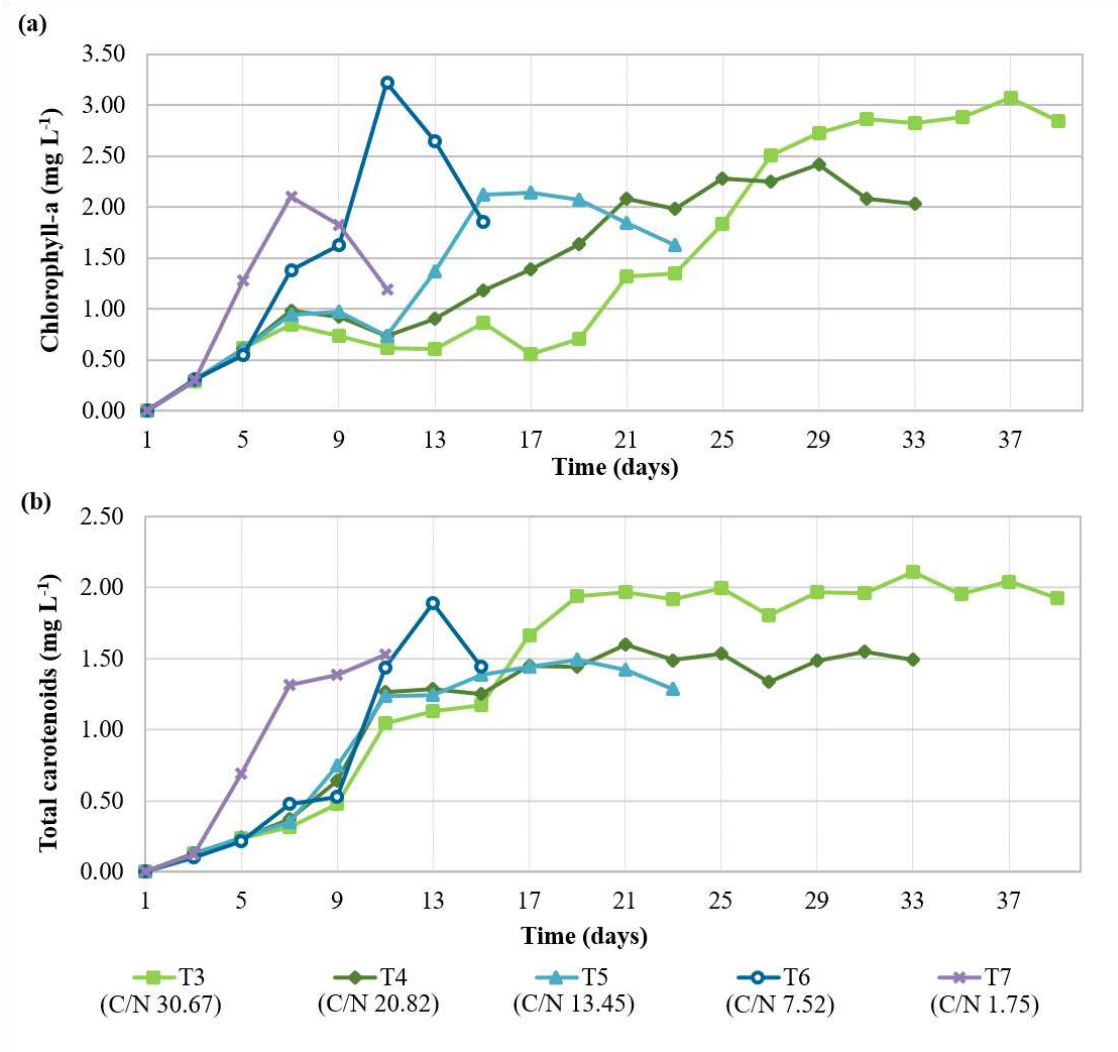


Figure 5.3. Monitoring of Chlorophyll-a concentration (mg L^{-1}) and total carotenoids (mg L^{-1}) throughout the experiment period.

When comparing the treatments, it was observed that the wastewater mixture (T3 to T6) increased VSS and Chl-a concentration, in contrast to the treatment exclusively composed of MW (T7). Additionally, T3 and T6 showed statistically higher Chl-a concentrations than the other treatments, 1.47 and 1.54 times higher than T7, respectively. Finally, the behavior of T3 regarding Chl-a and pH (Figure 2) may indicate that the DIC, provided through the wastewater mixture, was insufficient to meet the CO_2 demand necessary for photosynthesis. Furthermore, the lower N concentration in T3 and T4 was not a limiting factor for MB development. This aligns with observations by LIANG et al. (2023), where the microalga *Graesiella emersonii* adapted to N deficiency conditions through intracellular reserves that favored cell growth.

Evaluating the results over time and in terms of productivity, the VSS ($21.42 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and Chl-*a* ($0.21 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) values were statistically higher in T6 compared to the other treatments. Compared to the treatment composed exclusively of MW (T7), T6 was 2.31 times higher for VSS and 1.11 times higher for Chl-*a*. In the treatments with a higher C/N ratio, a gradual increase in the Chl-*a* parameter was observed over the considered period. However, two possibilities must be considered when interpreting these results.

The first possibility is that the higher C/N ratios may have favored MB development. However, the higher the proportion of IWJ, the more time was needed to reach the Chl-*a* peak. Likely, the microalgae in the inoculum (produced from MW) may have required more time to adapt to the new nutritional conditions of the cultivation medium composed of the wastewater mixture (MW + IWJ). This is evidenced by the DO behavior (Figure 2), where oxygen production began to grow from the 8th day for a C/N ratio of 7.52 (T6) and the 17th day for a C/N ratio of 30.67 (T3).

The second possibility is that the greater availability of C initially provided conditions for the growth of heterotrophic bacteria, followed by the availability of inorganic C for the microalgae. Therefore, C/N ratios higher than 7.52 (T6) increased VSS without raising Chl-*a* productivity. Thus, this increase in C favored the development of heterotrophic bacteria over microalgae. This is evidenced by the pH behavior (Figure 2), as the pH rise indicates the photosynthesis process. Thus, as heterotrophic bacteria degraded organic matter, CO_2 was released, gradually raising the pH in treatments with a higher C/N ratio.

Some results reported in the literature align with the present study's observed results. ZHENG et al. (2018) observed that when they mixed swine and brewery wastewater, the maximum VSS concentration of 2.85 g L^{-1} was achieved at a C/N ratio 7.9. GAO et al. (2019) also showed that increasing the initial C/N ratio favored the growth rate of *Chlorella* sp. G-9, indicating that the organic matter in the wastewater was an important factor in the growth of microalgae cultivated in mixotrophy.

To improve biomass accumulation of the algae-bacteria system in swine wastewater, LI et al. (2022) evaluated four typical carbon sources (glucose, starch, sodium acetate, and citric acid) and five initial C/N ratios (2.2, 5, 10, 15, and 30). According to the authors, adjusting the C source concentration

significantly affected microbial growth ($p < 0.05$). The highest total suspended solids (TSS) concentration (3.61 g L^{-1}) was achieved at a C/N ratio of 30 by supplementing with sodium acetate as the carbon source. This carbon supplementation strategy increased production by 3.70 times compared to raw wastewater (C/N = 2.2). According to the authors, this C addition caused the microorganisms to enter an exponential growth phase on the third day, and microbial growth was consistent with variations in microalgal photosynthesis. MOU et al. (2023) also observed increased biomass productivity with increasing C/N ratios, with the maximum productivity achieved at C/N ratios of 20 and 30 (6.22 and $6.18 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$, respectively).

Regarding pigment concentration, the highest value was observed in T3 (C/N = 30.67), where beta-carotene and lutein concentrations reached $12.81 \mu\text{g L}^{-1}$ and $507.97 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively. This may indicate that the MB may have accumulated more lutein and beta-carotene under N scarcity and excess C conditions. Studies by WU et al. (2020) reported that, in synthetic medium and under N depletion, the beta-carotene and lutein content of the microalga *D. salina* Y6 increased to 1332.4 and $744.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These values were 50.6% and 28.7% higher than the control. Additionally, the microalga species and the saline cultivation medium (99.86 g L^{-1} sodium chloride (NaCl)) also contributed to the results found by the authors.

However, T4 showed the lowest values for both compounds. Several factors can influence pigment production, from the cultivation system and operational and environmental conditions to the nutritional characteristics of the cultivation medium (PAGELS et al., 2020). Further investigations over time are needed to understand possible causes or factors influencing pigment production and accumulation.

Despite different C/N ratios being evaluated, the nutrients present may be in complex organic forms (macromolecules) that are not easily assimilated by the microalgae. ZHENG et al. (2022) explored an efficient and low-cost enzymatic hydrolysis method to increase sugar content in corn starch wastewater. By providing pre-treatment of the effluent, the authors observed a lutein yield of 10.96 mg L^{-1} .

ARASHIRO et al. (2020) found that light conditions influenced phycobiliprotein production more than medium composition. The authors

evaluated the cultivation of saline microalgae species (*Porphyridium purpureum*) and cyanobacteria (*Arthrospira platensis*) in industrial wastewater mixed with synthetic seawater for phycobiliprotein production under different light-intensity conditions ($150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and cultivation medium. In this context, the authors concluded that the lower performance in the experiments was caused by the high carbon content and low light intensity, which affected both phycobiliprotein content and biomass production (ARASHIRO et al., 2020).

Notably, interaction among different variables can affect biomass and pigment production. For instance, light intensity and quality (wavelength) are important factors influencing photosynthesis and microalgae biosynthesis of pigments, such as chlorophyll-*a* and carotenoids. Chlorophyll-*a* is essential for capturing light energy during photosynthesis, while carotenoids are important in photosynthesis by aiding in light-harvesting and providing protection against photo-oxidative damage (PÉREZ-GÁLVEZ; VIERA; ROCA, 2020). Different light intensities and wavelengths can stimulate or inhibit the synthesis of these pigments and influence the overall growth rate and biomass yield (ZHANG et al., 2023).

CHEN et al., (2023) state that high light intensities can increase pigment production as microalgae optimize their light-harvesting apparatus for maximum energy absorption. However, excessive light can cause photoinhibition, reducing photosynthetic efficiency and possibly damaging cellular structures. Conversely, low light intensities may limit energy availability, reducing pigment synthesis and slowing growth. Additionally, the type and availability of nutrients, particularly N and P, directly influence microalgae biosynthesis of proteins, carbohydrates, and lipids.

Different nutrient types can also influence the metabolic pathways of microalgae. For instance, the presence of organic nitrogen sources (e.g., urea) versus inorganic nitrogen sources (e.g., N-NO_3^- or N-NH_4^+) can lead to differences in nitrogen assimilation efficiency and metabolic fluxes, thereby impacting the synthesis of biocompounds (MARTIN-JÉZÉQUEL et al., 2015). Furthermore, the biochemical composition of microalgae can change over time, depending on the growth phase and environmental conditions. During the exponential growth phase, microalgae synthesize more proteins and chlorophyll, essential for rapid cell division and photosynthesis. As they transition to the

stationary phase, especially under nutrient-limited conditions, there is often an increase in the accumulation of storage compounds like carbohydrates and lipids (WILLIAMSON et al., 2024).

5.3.3. Microalgae biomass biochemical composition

Table 5.3 presents the dried MB characteristics regarding ultimate and proximate analysis and biochemical composition. The results indicate a linear relationship between the C/N ratio and carbon content ($p < 0.05$). The adjusted regression model equation is $Y = 11.31 + 0.6784X$, and the coefficient of determination (R-squared) is 85.45%. Thus, the higher presence of carbon in the cultivation medium favored the conversion of energy substrates for intracellular carbohydrate accumulation. In T3, for example, where the C/N ratio is 30.67, the carbohydrate content increased by 176.89% compared to the treatment exclusively with MW. The highest protein and lipid contents were observed in T6 (33.00%) and T3 (26.39%), representing increases of 19.35% and 25.61% relative to T7, respectively. However, the relationships between the C/N ratio and protein and lipid contents were not statistically significant ($p > 0.05$).

Table 5.3. Characterization of dry biomass in terms of Ultimate analysis, Proximate analysis, and Biochemical composition.

| Treatment | Ultimate analysis | | | | | Proximate analysis | | | | Biochemical composition | | |
|----------------|-------------------|------|------|-------|------|--------------------|----------|-----------------|--------------|-------------------------|--------------|----------|
| | C | H | N | O* | S | Ashes | Moisture | Volatile matter | Fixed carbon | Carbohydrates | Total lipids | Proteins |
| ----- % ----- | | | | | | | | | | | | |
| T3 (C/N 30.67) | 48.59 | 7.9 | 4.52 | 32.23 | 0.42 | 6.34 | 6.24 | 87.26 | 0.16 | 30.07 | 26.39 | 18.56 |
| T4 (C/N 20.82) | 47.88 | 7.81 | 4.51 | 31.90 | 0.45 | 7.45 | 3.72 | 86.45 | 2.38 | 25.90 | 20.26 | 18.32 |
| T5 (C/N 13.45) | 47.45 | 7.70 | 5.10 | 31.34 | 0.53 | 7.88 | 4.42 | 84.15 | 3.56 | 25.78 | 23.11 | 20.47 |
| T6 (C/N 7.52) | 45.84 | 7.51 | 7.01 | 28.21 | 0.64 | 10.79 | 1.27 | 87.58 | 0.36 | 14.28 | 19.97 | 33.00 |
| T7 (C/N 1.75) | 42.45 | 6.69 | 7.15 | 30.33 | 0.70 | 12.68 | 2.77 | 83.59 | 0.96 | 10.86 | 21.01 | 27.65 |

Note: *Oxygen content was defined by difference.

N limitation is a strategy explored to boost the production of high-value compounds (FALLAHI et al., 2021; LIANG et al., 2023). In contrast, in situations of excess N, microalgae assimilate the nutrient, converting it into proteins, ribonucleic acid, and deoxyribonucleic acid (MOU et al., 2023; SARATALE et al., 2022; SU, 2021). Additionally, when the MB growth reaches the stationary stage, C is metabolized into carbohydrates without external N and P sources. N limitation can also disrupt amino acid synthesis, and the C fixed photosynthetically in the Calvin cycle is then converted into carbohydrates (RUEDA et al., 2020; SOLÍS-SALINAS et al., 2021).

These results corroborate the findings of MOU et al. (2023), who showed a direct relationship between lipid content and the increase in the C/N ratio. According to the authors, the most favorable results for lipid content were observed at C/N ratios of 20 and 30 (30.97% and 31.48%, respectively), similar to the present study.

The wastewater mixture also improved lipid content and the saturation degree of the oil accumulated by *Chlorella pyrenoidosa* (TAN; ZHAO; YANG, 2019). Different proportions of starch wastewater were investigated: acidified, anaerobically digested, and secondarily treated. The authors suggest that a high C/N ratio (with consequent N deficiency) in the culture medium may have stimulated lipid accumulation in microalgae cells. Lipid contents of 25.6% to 28.0% were observed at C/N ratios of 137 and 145 through the 0.5:1 and 1:1 mixture (acidified wastewater: secondary wastewater).

Other factors can also influence the accumulation of biocompounds. SOLÍS-SALINAS et al. (2021) demonstrated the effect of hydraulic retention time (HRT) on carbohydrate accumulation. The mixed consortium of microalgae (*Coelastrella* sp) and cyanobacteria (*Geitlerinema* sp.) was cultivated in low nutrient and carbon loads. When the HRT was changed from 8 to 6 days, high carbohydrate production (36% to 51%) was observed. This increase in carbohydrate content is attributed to a change in the metabolic strategy of the microalgae, as the culture adapted to use C for storage rather than producing new cells. However, the authors do not rule out the possibility that N or P limitation and available alkalinity contributed to the increased carbohydrate content in the cells.

The accumulation of primary and secondary metabolites, such as lipids, proteins, and carbohydrates, directly influences the selection of recovery routes for the produced biomass. Depending on its final biochemical composition, microalgal biomass can be converted into biofuels, biofertilizers, or bioproducts such as biopolymers (CALIJURI et al., 2022). Carbohydrate-rich biomass, as observed in T3, T4, and T5 (C/N ratio of 30.67, 20.82, and 13.45, respectively) ratio, is more suitable for emerging fuel routes like biohydrogen production via dark fermentation. Conversely, protein-rich biomass, such as T6 and T7 (7.52 and 1.75, respectively), could be more appropriate for alternative pathways, including biopolymer production. A high lipid content favors conversion into biofuels, such as transesterification into biodiesel. However, lipids alone are not the sole indicator of viable biomass conversion into biofuels. Therefore, the following section analyzes fatty acid profiles to offer deeper insights into this discussion.

5.3.4. Fatty acid methyl esters (FAME) analysis

Saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) were determined. In this study, it was observed that palmitic acid (C16:0) was abundant, ranging between 31.11% to 39.77%, followed by other organic acids: oleic acid (C18:1 - 24.44% to 32.16%); linoleic acid (C18:2 - 9.49% to 17.83%); and linolenic acid (C18:3 - 5.94% to 16.71%). The FAME results are presented in Table 5.4.

The increase in the C/N ratio benefited the C16/C18 fatty acid groups. With the increase in the C/N ratio from 1.75 to 30.67, the proportion of C16/C18 fatty acids rose from 92.27% to 97.72%. In this context, SU et al. (2023) confirmed the viability and properties of microalgae biodiesel by the presence of C16/C18, which represented between 93.22% and 97.97%.

The results on fatty acid production also showed that high C/N ratios (as in T3 and T4) tend to favor the production of C16:0. Intermediate C/N ratios (T5) present a balance in the production of different fatty acids. In contrast, low C/N ratios (as in T5 and T6) can increase the production of PUFAs, such as C18:3. These results suggest that a high C/N ratio primarily promotes the accumulation of saturated fatty acids like C16:0 and, consequently, the potential application of MB in energy routes.

Table 5.4 Fatty acid methyl esters (FAME) profile of microalgae biomass cultivated in different proportions of municipal wastewater and industrial wastewater from juice processing (A) and proportion of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated acids (B).

| Name | Fatty acids | Yield (% w w ⁻¹) | | | | |
|----------------------|-------------|------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | | T3 (C/N 30.67) | T4 (C/N 20.82) | T5 (C/N 13.45) | T6 (C/N 7.52) | T7 (C/N 1.75) |
| Decanoic Acid | C10:0 | 0.80 | 0.50 | ND | 1.08 | ND |
| Lauric acid | C12:0 | 0.23 | 0.50 | 0.36 | 0.81 | 0.93 |
| Myristic acid | C14:0 | 0.46 | 0.85 | 0.23 | 0.39 | 3.11 |
| Myristoleic acid | C14:1 | 0.22 | 0.28 | 0.53 | 0.60 | 3.70 |
| Palmitic acid | C16:0 | 36.75 | 39.77 | 33.33 | 36.64 | 34.46 |
| Palmitoleic acid | C16:1 | 1.27 | 1.55 | 3.12 | 2.42 | 4.20 |
| Hexadecadienoic acid | C16:2 | ND | 2.20 | 1.16 | 2.85 | 3.26 |
| Stearic acid | C18:0 | 5.46 | 4.61 | 3.31 | 2.26 | 5.34 |
| Oleic acid | C18:1 | 30.48 | 30.35 | 31.50 | 24.44 | 25.60 |
| Linolenic acid | C18:2 | 17.83 | 9.99 | 12.62 | 10.13 | 9.49 |
| Stearidonic acid | C18:3 | 5.94 | 7.15 | 13.35 | 16.71 | 8.41 |
| Arachidic Acid | C18:4 | ND | 0.53 | 0.50 | 1.69 | 1.51 |
| Eicosenoic acid | C20:0 | ND | ND | ND | ND | ND |
| Behnic acid | C20:1 | ND | 1.06 | ND | ND | ND |
| Erucic acid | C22:0 | 0.56 | 0.64 | ND | ND | ND |
| SFA | | 44.25 | 46.88 | 37.23 | 41.17 | 43.83 |
| MUFAs | | 31.98 | 33.23 | 35.14 | 27.46 | 33.50 |
| PUFAs | | 23.77 | 19.88 | 27.63 | 31.37 | 22.67 |
| Total | | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Note: SFA = Saturated fatty acid, MUFA = Monounsaturated fatty acids, PUFA = Polyunsaturated fatty acids, ND = Not detected.

This conclusion is corroborated by research conducted by ANTO et al. (2019), which observed that nutrient deprivation in *Chlorella* sp. increased the content of fatty acids C16:0, C16:1, C18:1, C18:2, and C18:3. The authors found that deprivation of sodium N-NO₃⁻ and urea increased the levels of C16:0 (23.8% and 23.67%, respectively) and C18:1 (22.71% and 23.12%, respectively) compared to the control (20.2% of C16:0 and 17.21% of C18:1). Similarly, YANG et al. (2018) reported that nutrient deficiency (N and P) promoted the highest accumulation of total fatty acids in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Additionally, the mixture of pharmaceutical and domestic wastewater in a volume ratio of 1:750 (COD: 232.3 mg L⁻¹; TN 68.57 mg L⁻¹) provided the best performance of the green microalga *T. dimorphus* GEEL-06 in terms of C16:0 fatty acids (45.85%) (SU et al., 2023). In contrast, the highest concentrations of C18:1 (12.36%) and C18:2 (22.92%) were found in the 1:1000 ratio (COD: 153.0 mg L⁻¹; TN 64.77 mg L⁻¹). These results directly influence biodiesel quality, as C16:0 is suitable for biodiesel conversion, and C18:1 is related to fuel properties such as flash point, viscosity, heat of combustion, and oxidative stability.

Microalgae species stand out among the factors that can influence the fatty acid profile. A literature review conducted by FERREIRA et al., (2019) revealed that *Botryococcus* has a high concentration of MUFA, with 59.6% oleic acid, while *Desmodesmus* and *Chlorella* are considered promising sources of PUFA.

Additionally, it is important to note that the fatty acid profile can vary within the same microalgae species depending on the cultivation conditions. VYAS et al., (2022) evaluated the cultivation of the microalga *C. sorokiniana* SAG 211–8 k. They found that the fatty acid profile in heterotrophic cultivation (C/N 20 and 60) showed significant changes in oleic acid (C18:1), which represented more than 50% of the lipid content, compared to photoautotrophic cultivation, where it accounted for only 10.97%.

TAN; ZHAO; YANG, (2019) observed that the wastewater blend improved mixotrophic cultivation regarding lipid content and saturation level. When the cultivation medium was composed solely of anaerobically digested starch wastewater (ADSW), the proportion of saturated fatty acids (SFAs) was only 26.8%. However, when ADSW was combined with acidified starch wastewater (ASW) in a 1:1 ratio, the SFA proportion increased to 44.59% of the total FAMES. The authors attributed these results to the C/N ratio of the cultivation medium,

suggesting that an excess of carbon source under high C/N conditions may favor the conversion into energy storage compounds, such as SFAs.

Therefore, mixing wastewater to improve the C/N ratio can be an effective strategy to increase the production of specific fatty acids, enhancing the efficiency of biofuel production.

5.3.5. Limitations and future perspectives

The promising results of this study suggest that future research should investigate the effects of the C/N ratio through wastewater blending, focusing on reaching scale-up and continuous flow operation. Additionally, for this strategy to be implemented on a real scale, it is advisable to analyze the costs involved in implementing the proposed system and the possible environmental impacts. However, this approach presents challenges, particularly in terms of the location of effluent sources, and these limitations should be thoroughly assessed from both technical-economic and environmental perspectives (MAGALHÃES et al., 2024). These limitations should be assessed both in the technical-economic and environmental contexts.

Understanding the development and succession of microorganisms, such as phytoplankton communities and bacterial species, is fundamental to the successful implementation of this technology. Evaluating the possibility of shifts in the dominance of these species over time is crucial, as seasonal variations in nutrient content, toxic compounds, and grazers in domestic wastewater can significantly influence treatment outcomes (BIJLSMA et al., 2021). Long-term studies are necessary to assess year-round impacts and changes to the C/N ratio, ensuring the reliability and efficiency of wastewater blending strategies.

Furthermore, future studies are needed to compare the strategy of wastewater blending with other technologies, such as CO₂ supplementation. In this way, it will be possible to evaluate each technology's technical-economic and environmental impacts, compare their pros and cons, and determine the best solution for different application scenarios.

Additionally, exploring wastewater blending strategies combined with other technologies is an opportunity for future research. Studies like those by YU et al., (2024) and SILVA et al., (2024) evaluated the performance of blended wastewater treatment and the production of biocompounds in biofilm reactors, offering promising perspectives to enhance this approach.

5.4. Conclusions

This study demonstrates that blending MW with IWJ and adjusting the C/N ratio can enhance the efficiency of MB production and nutrient removal. This strategy favored the removal of C, with 75.61% to 81.90% for DOC and 66.78% to 88.85% for SCOD. An increase in MB production was also observed, with T3 and T6 (C/N of 30.67 and 7.52, respectively) being statistically higher than the other treatments in Chl-*a* concentration. Regarding pigment production, the highest concentrations of beta-carotene ($13.55 \mu\text{g g}^{-1}$) and lutein ($537.59 \mu\text{g g}^{-1}$) were observed in T3.

The C/N ratio also influenced the biochemical composition of MB. The highest lipid (26.39%) and carbohydrate (30.07%) content was observed at a C/N ratio of 30.67, and the highest protein content (33.00%) was observed at a C/N ratio of 7.52. The high C/N ratio also benefited the C16/C18 fatty acid groups, reaching 97.72% in T3, indicating the potential application of MB in energy routes.

The results indicate that blending wastewater, combined with optimizing the C/N ratio, can increase the efficiency of wastewater treatment and the production of valuable biocompounds present in the microalgal biomass (MB). Treatments with a C/N ratio equal to or greater than 13.45 showed promising characteristics for application in energy routes due to the higher lipid and carbohydrate content. On the other hand, treatments with a C/N ratio equal to or less than 7.52 demonstrated potential for use in agricultural routes and bioplastic production due to the higher protein content. This approach offers a more sustainable alternative to CO₂ supplementation, contributing to advances in wastewater treatment using microalgae biotechnology.

References

ALENCAR, D. B. DE et al. Contents of β -carotene in supplements and biomass of Spirulina. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 368–391, 2011.

ANTO, S.; PUGAZHENDHI, A.; MATHIMANI, T. Lipid enhancement through nutrient starvation in Chlorella sp. and its fatty acid profiling for appropriate bioenergy feedstock. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101179, jul. 2019.

AOAC. **Official methods of analysis**. 11th. ed. [s.l.] Association of Official Analytical Chemists, 1990.

APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. [s.l.] American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.

ARASHIRO, L. T. et al. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 303, n. January, p. 122894, 2020.

ASSIS, L. R. DE et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.

ASSIS, T. C. DE et al. Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1160–1169, abr. 2019.

ASTM. **ASTM D7582-12 standard test methods for proximate analysis of coal and coke by macro thermogravimetric analysis**. , 2012.

BIJLSMA, L. et al. Investigation of pharmaceuticals in a conventional wastewater treatment plant: Removal efficiency, seasonal variation and impact of a nearby hospital. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105548, ago. 2021.

BRAGA, M. Q. et al. Carbon supplementation in domestic sewage via mixing with paint booth effluent: Influence on the performance of bioremediation and algal biomass production from high-rate algal ponds. **Journal of Water Process Engineering**, v. 53, p. 103652, 1 jul. 2023a.

BRAGA, M. Q. et al. Microalgae cultivation and carotenoid production in paint booth effluent mixed with domestic sewage. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 24 nov. 2023b.

CALIJURI, M. L. et al. Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 305, p. 135508, out. 2022.

CASTRO, J. D. S. et al. Life cycle assessment and techno-economic analysis for biofuel and biofertilizer recovery as by-products from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 187, p. 113781, fev. 2023.

CHAN, M.-C. et al. Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 24–31, set. 2013.

CHEN, S. et al. Lighting the way to sustainable development: Physiological response and light control strategy in microalgae-based wastewater treatment under illumination. **Science of The Total Environment**, v. 903, p. 166298, dez. 2023.

CHENG, P. et al. Biofilm Attached Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* Is a Developed System for Swine Wastewater Treatment and Lipid Production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 21 set. 2017.

DANG, B. T. et al. Influence of C/N ratios on treatment performance and biomass production during co-culture of microalgae and activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 837, 1 set. 2022.

DUBOIS, MICHEL. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

EMBRAPA INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2a. ed. Brasília: [s.n.].

FALLAHI, A. et al. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 272, p. 129878, jun. 2021.

FERREIRA, G. F. et al. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 109, p. 448–466, jul. 2019.

FERREIRA, J. et al. Carotenoids from wastewater-grown microalgae biomass: Life cycle assessment and techno-economical analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 434, p. 140526, jan. 2024.

FREITAS, C. et al. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 554–562, abr. 2014.

GAMA, R. C. N. DA et al. Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101516, set. 2023.

GAO, F. et al. High-efficiency biofuel production by mixing seawater and domestic sewage to culture freshwater microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 443, 1 set. 2022.

HOEBLER, C. et al. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 360–367, 1 mar. 1989.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). <https://portal.inmet.gov.br/>. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 23 dez. 2023.

KHAN, A. Z. et al. Two-stage algal cultivation for the biotransformation of urban wastewater's pollutants into multiple bioproducts in a circular bioeconomy paradigm. **Energy Conversion and Management**, v. 273, p. 116400, dez. 2022.

LI, X. et al. Enhancement of nutrients removal and biomass accumulation of algal-bacterial symbiosis system by optimizing the concentration and type of carbon source in the treatment of swine digestion effluent. **Chemosphere**, v. 308, p. 136335, dez. 2022.

LIANG, L. et al. Protein reserves elucidate the growth of microalgae under nitrogen deficiency. **Algal Research**, v. 75, p. 103269, set. 2023.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Em: [s.l: s.n.]. p. 350–382.

LIU, S. et al. Coupling bead-milling and microfiltration for the recovery of lipids and proteins from *Parachlorella kessleri*: Impact of the cell disruption conditions on the separation performances. **Separation and Purification Technology**, v. 287, 15 abr. 2022.

LIYANAARACHCHI, V. C. et al. Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. **Algal Research**, v. 57, p. 102353, jul. 2021.

LU, Z. et al. A novel fed-batch strategy to boost cyst cells production based on the understanding of intracellular carbon and nitrogen metabolism in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121744, out. 2019.

MAGALHÃES, I. B. et al. Advancements in high-rate algal pond technology for enhanced wastewater treatment and biomass production: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 66, p. 105929, set. 2024.

MARTIN-JÉZÉQUEL, V. et al. Effects of Organic and Inorganic Nitrogen on the Growth and Production of Domoic Acid by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. australis* (Bacillariophyceae) in Culture. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7067–7086, 26 nov. 2015.

MORENO-GARCIA, L. et al. Optimization of the proportions of four wastewaters in a blend for the cultivation of microalgae using a mixture design. **Bioresource Technology**, v. 283, p. 168–173, jul. 2019.

MOU, Y. et al. The effects of carbon nitrogen ratio and salinity on the treatment of swine digestion effluent simultaneously producing bioenergy by microalgae biofilm. **Chemosphere**, v. 339, p. 139694, out. 2023.

OLIVEIRA, A. P. DE S. et al. Swine wastewater treatment in high rate algal ponds: Effects of Cu and Zn on nutrient removal, productivity and biomass composition. **Journal of Environmental Management**, v. 299, p. 113668, 1 dez. 2021.

OLIVEIRA, A. P. DE S. et al. Microalgae-based wastewater treatment for micropollutant removal in swine effluent: High-rate algal ponds performance under different zinc concentrations. **Algal Research**, v. 69, p. 102930, 1 jan. 2023a.

OLIVEIRA, A. P. DE S. et al. Copper multifaceted interferences during swine wastewater treatment in high-rate algal ponds: alterations on nutrient removal, biomass composition and resource recovery. **Environmental Pollution**, v. 324, p. 121364, 1 maio 2023b.

PAGELS, F. et al. **Pigments from microalgae**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020.

PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, mar. 2014.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Organomineral fertilizers pastilles from microalgae grown in wastewater: Ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 779, n. 146205, p. 11, 2021.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies. **Science of The Total Environment**, v. 920, p. 170918, abr. 2024.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 505, 9 jun. 2020.

QU, W. et al. Optimizing real swine wastewater treatment with maximum carbohydrate production by a newly isolated indigenous microalga *Parachlorella kessleri* QWY28. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121702, out. 2019.

RUEDA, E. et al. Polyhydroxybutyrate and glycogen production in photobioreactors inoculated with wastewater borne cyanobacteria monocultures. **Bioresource Technology**, v. 295, p. 122233, jan. 2020.

SÁNCHEZ-ZURANO, A. et al. Role of Microalgae in the Recovery of Nutrients from Pig Manure. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 203, 21 jan. 2021.

SARATALE, R. G. et al. Microalgae cultivation strategies using cost-effective nutrient sources: Recent updates and progress towards biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127691, out. 2022.

SILVA, T. A. et al. Microalgae biomass as a renewable biostimulant: meat processing industry effluent treatment, soil health improvement, and plant growth. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2021.

SILVA, T. A. et al. Enhancing microalgae biomass production: Exploring improved scraping frequency in a hybrid cultivation system. **Journal of Environmental Management**, v. 355, p. 120505, mar. 2024.

SOLÍS-SALINAS, C. E. et al. Long-term semi-continuous production of carbohydrate-enriched microalgae biomass cultivated in low-loaded domestic wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 798, p. 149227, dez. 2021.

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

SU, Z. et al. Effect of pharmaceutical and domestic wastewater mixed ratios on microalgal growth for nutrients removal coupled with biomass and liquid biofuel generation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 6 out. 2023.

TAN, K. A. et al. Post-Treatment of Palm Oil Mill Effluent Using Immobilised Green Microalgae *Chlorococcum oleofaciens*. **Sustainability**, v. 13, n. 21, p. 11562, 20 out. 2021.

TAN, X.-B.; ZHAO, X.-C.; YANG, L.-B. Strategies for enhanced biomass and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* culture in starch processing wastewater. **Journal of Cleaner Production**, v. 236, p. 117671, nov. 2019.

VYAS, S. et al. Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 359, p. 127494, set. 2022.

WILLIAMSON, E. et al. Microalgae: potential novel protein for sustainable human nutrition. **Trends in Plant Science**, v. 29, n. 3, p. 370–382, mar. 2024.

WU, M. et al. Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6. **Annals of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 48, 25 dez. 2020.

WU, X. et al. A novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121925, nov. 2019.

XIE, B. et al. Biodiesel production with the simultaneous removal of nitrogen, phosphorus and COD in microalgal-bacterial communities for the treatment of anaerobic digestion effluent in photobioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 350, p. 1092–1102, out. 2018.

XIE, B. et al. Blending high concentration of anaerobic digestion effluent and rainwater for cost-effective *Chlorella vulgaris* cultivation in the photobioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 861–865, mar. 2019a.

XIE, Y. et al. Bioprocess operation strategies with mixotrophy/photoinduction to enhance lutein production of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60. **Bioresource Technology**, v. 290, n. July, p. 121798, 2019b.

XIE, Z.; LIN, W.; LUO, J. Co-cultivation of microalga and xylanolytic bacterium by a continuous two-step strategy to enhance algal lipid production. **Bioresource Technology**, v. 330, p. 124953, jun. 2021.

YANG, L. et al. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 40, 13 dez. 2018.

YU, M. et al. Treatment of mixed wastewater by vertical rotating microalgae-bacteria symbiotic biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 393, p. 130057, fev. 2024.

ZHANG, J. et al. Effect of Light Wavelength on Biomass, Growth, Photosynthesis and Pigment Content of *Emiliana huxleyi* (Isochrysidales, Coccolithophyceae). **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 11, n. 2, p. 456, 20 fev. 2023.

ZHENG, H. et al. Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 479–486, fev. 2018.

ZHENG, H. et al. Lutein production by microalgae using corn starch wastewater pretreated with rapid enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, p. 126940, mar. 2022.

ZHONG, W. et al. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 281–286, jun. 2012.

6. CAPÍTULO III – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS E ACÚMULO DE LIPÍDIOS E CARBOIDRATOS: IMPACTO DA RELAÇÃO C/N EM LAGOAS DE ALTA TAXA COM ÁGUAS RESIDUÁRIAS MUNICIPAIS E INDUSTRIAIS MISTURADAS PARA APLICAÇÕES EM BIOCOMBUSTÍVEIS

Resumo

A biotecnologia de microalgas é uma alternativa promissora para o tratamento de águas residuárias e valorização de recursos no saneamento. Entretanto, a baixa razão carbono/nitrogênio (C/N, m/m) das águas residuárias domésticas pode dificultar a produção eficiente de microalgas. Este estudo combinou águas residuárias municipais (ARM) com águas residuárias industriais proveniente do processamento de sucos (ARIS) em diferentes proporções para analisar o impacto da razão C/N na produção de biomassa de microalgas, no acúmulo de carboidratos, lipídios e no perfil de ácidos graxos. O estudo foi realizado em lagoas de alta taxa (LAT) em escala piloto, expostas às condições ambientais externas. Foram testadas as proporções de águas residuárias: 60 % ARM + 40 % ARIS (T1), 40 % ARM + 60 % ARIS (T2) e 20 % ARM + 80 % ARIS (T3), resultando nas razões C/N de 9,25; 25,31 e 52,71, respectivamente. T1 (C/N 9,65) obteve os maiores valores de sólidos suspensos voláteis e clorofila-a, além de apresentar maior conteúdo de lipídios (14,44%) em comparação com os demais tratamentos (p-valor < 0,05). Por outro lado, o T3 (C/N 52,71) apresentou maior proporção de ácidos graxos C16:0 (40,39 %) e C18:0 (10,08 %) entre todos os ácidos graxos, demonstrando potencial para uso como biocombustível. Os maiores teores de carboidratos foram observados nas razões C/N 25,31 e 52,71, com 18,44 % e 21,09 %, respectivamente. Esses resultados indicam que a combinação de águas residuárias e o ajuste da razão C/N podem otimizar a produção e agregar valor à biomassa de microalgas.

Palavras-chave: Microalga; Mistura de Águas Residuárias; Lagoas de Alta Taxa; Tratamento de águas residuárias; Remoção de nutrientes; Razão C/N.

6.1. Introdução

A produção de biomassa de microalgas é uma alternativa promissora para a geração de biocombustíveis e produtos de valor agregado, devido ao seu rápido crescimento e alta eficiência na conversão de luz solar e nutrientes (CALIJURI et al., 2022; JAVED et al., 2019; KUMAR et al., 2019). Adicionalmente, o cultivo de microalgas em águas residuárias apresenta a vantagem de promover o tratamento, removendo nutrientes e outros contaminantes, ao mesmo tempo que gera biomassa (POLAT; ALTINBAŞ, 2023; SU et al., 2023). Entretanto, a aplicação dessa tecnologia em larga escala enfrenta desafios e limitações. Um dos principais obstáculos é a variabilidade nas características dos efluentes, incluindo fatores como pH, presença de substâncias tóxicas e poluentes emergentes.

Estudos anteriores investigaram diversos aspectos do cultivo de microalgas em efluentes, como a seleção de cepas (BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016; LEE et al., 2022; SUTHERLAND; TURNBULL; CRAGGS, 2017), as condições de cultivo e as propriedades das águas residuárias, utilizadas como meio de crescimento (SOLÍS-SALINAS et al., 2021; WANG et al., 2023; ZHU et al., 2019). No entanto, a maioria dessas pesquisas focou em fontes únicas de efluentes, sem abordar de forma ampla o desafio da baixa relação C/N em esgotos domésticos, que limita o crescimento microalgal devido à insuficiente disponibilidade de C (POSADAS et al., 2014). Para superar essa limitação, uma abordagem é a adição de CO₂, que pode ser fornecido por meio de fontes externas, como gases de combustão ou carbonatos dissolvidos (ASSIS et al., 2019; COUTO et al., 2021). Contudo, a implementação da adição de CO₂ em cultivos de microalgas também apresenta desafios. A eficiência da incorporação do CO₂ é limitada em sistemas abertos devido à baixa solubilidade e perdas para a atmosfera. Além disso, a necessidade de sistemas de aeração e controle de pH aumenta o consumo de energia e os custos operacionais, impactando negativamente principalmente quando aplicada em larga escala.

A combinação de diferentes efluentes para co-tratamento tem surgido como uma solução para melhorar a razão C/N, para criar um meio de crescimento com equilíbrio nutricional aprimorado (PEREIRA et al., 2024a). No entanto, embora essa estratégia seja atrativa do ponto de vista econômico e ambiental, a literatura aponta que misturas de efluentes nem sempre garantem

condições ideais para o cultivo algal. GAMA et al., (2023) mostraram que a combinação de efluentes (cervejaria + processamento de carne) pode resultar em produtividade limitada de biomassa algal. Por outro lado, PEREIRA et al., (2024b) relataram maior concentração de clorofila-*a* (chl-*a*) nas relações C/N de 30,67 e 7,52 (3,07 e 3,22 mg L⁻¹, respectivamente) utilizando águas residuárias municipais e efluentes da indústria de sucos, em comparação com o controle (2,09 mg L⁻¹), composto exclusivamente por ARM, com relação C/N de 1,75.

Além de otimizar a produção de biomassa, a composição bioquímica das microalgas, particularmente o acúmulo de lipídios e carboidratos, é fundamental para a produção de biocombustíveis (SIDDIKI et al., 2022). Diversas estratégias têm sido investigadas para aumentar esses componentes, como a limitação de nutrientes, variação nas condições de cultivo (intensidade luminosa e fornecimento de CO₂) e estresse ambiental (variações de salinidade ou temperatura) (FALLAHI et al., 2021). Entretanto, a mistura de efluentes apresenta-se como uma alternativa que possibilita o equilíbrio adequado da razão C/N, aproveitando a matéria orgânica e os nutrientes presentes nos diferentes tipos de efluentes. PEREIRA et al., (2024b) constataram que a variação da razão C/N, obtida pela mistura de diferentes águas residuárias, influenciou diretamente a composição bioquímica da biomassa. Os maiores teores de lipídios (26,39 %) e carboidratos (30,07 %) foram alcançados com uma relação C/N de 30,67, enquanto o maior teor de proteínas (33,00 %) foi observado com uma relação de 7,52.

A hipótese central desta pesquisa é que a combinação de águas residuárias municipais e industriais pode fornecer um meio de cultivo mais balanceado, promovendo tanto o crescimento de biomassa, quanto o acúmulo de lipídios e carboidratos nas microalgas. A inovação deste estudo está no uso de lagoas de alta taxa, em escala piloto, para otimizar o cultivo de microalgas sob essas condições mistas, contribuindo para a solução da baixa razão C/N de efluentes municipais. Ao abordar as lacunas na literatura espera-se contribuir para o avanço de tecnologias mais eficientes e sustentáveis para o tratamento de efluentes e produção de biocombustíveis.

6.2. Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido na área experimental localizada no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de

Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 46'07,05" S e 42° 51'30,84" W), durante o período de inverno, entre os meses de maio à julho. O município tem clima úmido com verões chuvosos e invernos secos, déficit hídrico entre maio e setembro e excedente entre dezembro e março. De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2023), série histórica de 2002 a 2022, a temperatura média na estação chuvosa (entre outubro e março) é de 21,95 °C e na estação seca (entre abril e setembro) é de 17,73 °C. A precipitação média anual é de 1337 mm e a umidade relativa do ar é de 78,71 %.

6.2.1. Cultivo de microalgas e delineamento experimental

O meio de cultivo para o crescimento das microalgas foi composto pela combinação em diferentes proporções de água residuária municipal (ARM) e água residuária da indústria de sucos (ARIS). A ARM utilizada foi coletada em tanque séptico em estação de tratamento de esgoto municipal operada pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE – Viçosa/BR). Enquanto a ARIS utilizada foi coletada em reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) da estação de tratamento de esgoto de uma indústria de processamento de sucos (Visconde do Rio Branco/BR).

O cultivo da biomassa de microalgas foi realizado em LAT em escala piloto com as seguintes dimensões: 1,28 m de largura; 2,86 m de comprimento; 0,5 m de profundidade total; 0,3 m de profundidade útil; 1,0 m³ de volume útil. A LAT é constituída em fibra de vidro e o meio de cultivo foi movimentado por seis pás de aço inoxidável por meio de um motor elétrico de 0,5 cv, que tem acoplado a ele um redutor de velocidade controlado por inversor de frequência (série WEG CFW-10) para promover uma velocidade média horizontal de aproximadamente 0,10 - 0,15 m s⁻¹.

O experimento foi organizado a partir de delineamento em blocos casualizados (DBC) com três tratamentos e duas repetições por bloco, totalizando 6 unidades experimentais. O delineamento experimental e as proporções de mistura foram: 60 % ARM + 40 % ARIS (T1); 40 % ARM + 60 % ARIS (T2); 20 % ARM + 80 % ARIS (T3). As características iniciais do meio de cultivo de cada tratamento são apresentadas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Características físicas e químicas dos meios de cultivos.

| Parâmetros | Tratamentos | | | | | |
|--|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|----------|
| | T1 | | T2 | | T3 | |
| | (60 % ARM + 40 % ARIS) | | (40 % ARM + 60 % ARIS) | | (20 % ARM + 80 % ARIS) | |
| | Valor | σ | Valor | σ | Valor | σ |
| pH | 7,27 | 0,00 | 7,18 | 0,01 | 6,83 | 0,02 |
| Temperatura | 23,56 | 0,23 | 23,19 | 0,08 | 23,55 | 0,26 |
| OD (mg L ⁻¹) | 0,03 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,00 |
| CE (μS cm ⁻¹) | 1237,80 | 4,33 | 1373,60 | 17,94 | 1459,60 | 21,48 |
| COD (mg L ⁻¹) | 303,39 | 6,21 | 456,75 | 8,25 | 582,30 | 0,30 |
| CTD (mg L ⁻¹) | 333,00 | 6,30 | 470,55 | 6,75 | 583,65 | 0,45 |
| DQOs (mg L ⁻¹) | 1061,71 | 32,89 | 1586,38 | 37,83 | 2007,43 | 18,09 |
| DQOt (mg L ⁻¹) | 1603,68 | 39,47 | 2287,89 | 52,63 | 2958,95 | 6,58 |
| Ps (mg L ⁻¹) | 4,43 | 0,07 | 3,40 | 0,11 | 1,93 | 0,17 |
| N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹) | 34,27 | 5,71 | 18,09 | 0,95 | 10,47 | 2,86 |
| N – NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹) | 0,25 | 0,05 | 0,50 | 0,00 | 0,60 | 0,00 |
| N _{Org} | 10,28 | 1,40 | 8,43 | 0,29 | 6,28 | 0,66 |
| NKT (mg L ⁻¹) | 55,69 | 1,58 | 38,56 | 4,34 | 25,70 | 0,95 |
| SSV (mg L ⁻¹) | 65,00 | 3,08 | 76,50 | 0,87 | 86,83 | 1,38 |
| C/N ratio ¹ | 9,65 | | 25,31 | | 52,71 | |

OD = Oxigênio dissolvido, CE = Condutividade elétrica, CTD = Carbono total dissolvido, COD= Carbono orgânico dissolvido, DQOs = Demanda química de oxigênio solúvel, DQOt = Demanda química total de oxigênio, Ps = Fósforo solúvel, N-NH₄⁺ = Nitrogênio amoniacal, N-NO₃⁻ = nitrato, NKT = Nitrogênio Kjeldahl total, N-org = Nitrogênio orgânico, SSV = Sólidos suspensos voláteis e C/N = Razão carbono/nitrogênio. ¹ Razão C/N calculada com CTD e a soma de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺.

6.2.2. Operação e monitoramento

As LATs (Figura 6.1) foram operadas em regime de batelada até o decaimento da variável chl-a. Todos os tratamentos receberam o inóculo de biomassa de microalgas (10 % v/v) com espécies autóctones previamente cultivado em ARM. As principais espécies identificadas no inóculo foram: *Chlorella vulgaris* (61,62 % e $1,34 \cdot 10^6$ células mL⁻¹), *Scenedesmus acunae* (26,04 % e $5,65 \cdot 10^5$ células mL⁻¹), *Pseudodidymocystis fina* (11,80% e $2,56 \cdot 10^5$ células mL⁻¹). O pH nas LATs não foi controlado, bem como não foi fornecido dióxido de carbono (CO₂), além da difusão de CO₂ presente no ar ambiente.

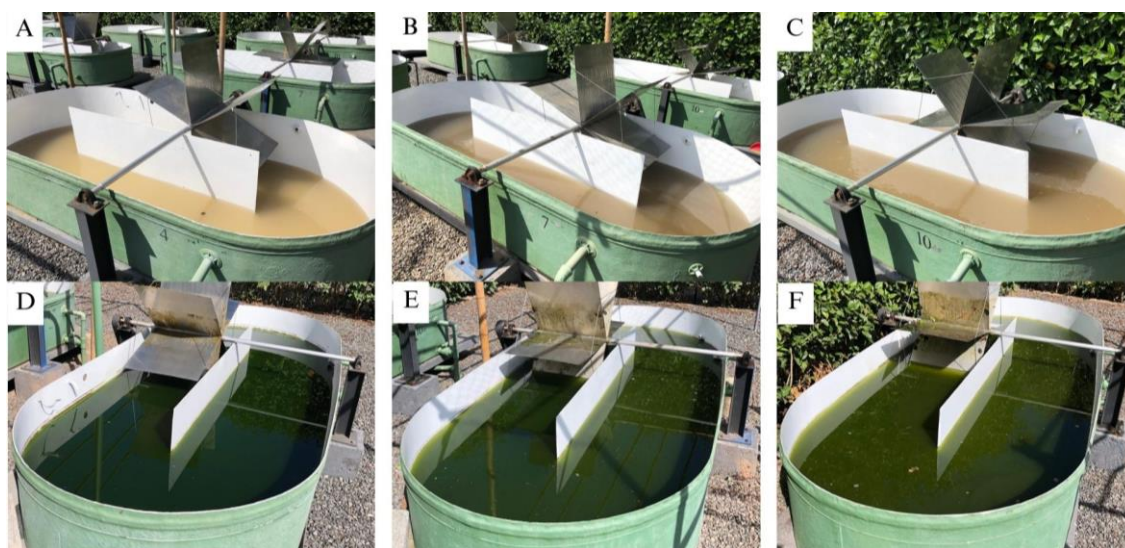


Figura 6.1. LATs no início (A, B e C) e final (D, E e F) da operação, com C/N igual a 9,65; 25,31 e 52,71, respectivamente.

O pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura do meio de cultivo foram monitorados *in loco* a cada dois dias utilizando a sonda multiparamétrica (modelo Aqua troll 500). Adicionalmente, a cada dois dias, foram monitorados o Carbono Total Dissolvido (CTD), Carbono Orgânico Dissolvido (COD), Carbono Inorgânico Dissolvido (CID), nitrato (N – NO₃⁻), nitrogênio amoniacal (N – NH₄), chl-a e sólidos suspensos voláteis (SSV).

O CTD, COD e o CID foi determinado por meio do analisador Shimadzu TOC 5000. N – NO₃⁻, N – NH₄ e SSV foram determinados conforme Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). A chl-a foi determinada conforme descrito na NEDERLANDS NORM, (1981), baseada em NUSH, (1981), por meio da extração em etanol 80%.

Além desses parâmetros, foram monitorados no início e no final da operação os parâmetros nitrogênio total kjeldhal (N – NKT), fósforo solúvel (P_s) e total (P_T) e demanda química de oxigênio (DQO - solúvel total), conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

6.2.3. Análise da diversidade da comunidade microbiana e histoquímica

A biomassa de microalgas obtida ao final do experimento foi caracterizada qualitativa e quantitativamente em termos da comunidade fitoplanctônica. A identificação em nível de gênero foi realizada utilizando microscópio invertido, conforme descrito por PARRA; GONZALEZ; DELLAROSSA, (1983) e KOMAREK; FOTT, (1983). A análise quantitativa fitoplanctônica foi conduzida por meio da contagem de indivíduos em câmara de sedimentação em microscópio invertido pelo método de UTHERMÖHL, (1958). A densidade dos organismos foi determinada utilizando os critérios descritos por APHA (2012). Finalmente, o biovolume dos organismos mais abundantes foi calculado de acordo com a metodologia proposta por WETZEL; LIKENS, (1991).

A análise histoquímica foi conduzida com o objetivo de identificar a localização de diferentes compostos bioquímicos (carboidratos, lipídios e proteínas) presentes nas células de microalgas. Para realizar essas análises, as amostras de MB foram coletadas ao final do experimento, centrifugadas e desidratadas em série graduada de etanol (70%, 80%, 90% e 95%). Em seguida, as amostras foram embebidas em historesina (Leica). Utilizando um micrótomo rotatório Leica (RM 2255) com lâmina de vidro, foram realizados cortes de 5 μ m de espessura. Os cortes foram submetidos às técnicas histoquímicas de ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos e azul de bromofenol de mercúrio para a detecção de proteínas totais, conforme descrito por BANCROFT; GAMBLE, (2007). As observações foram feitas com um fotomicroscópio Olympus BX53, usando uma objetiva de 100X para identificar como os biocompostos (carboidratos, lipídios e proteínas) estão dispostos na biomassa de microalgas.

6.2.4. Modelos cinéticos de biodegradação

A cinética de biodegradação (Equação 6.1) do CTD foi apresentada ajustando os dados obtidos ao modelo de primeira ordem, conforme descrito por MOU et al., (2023) e XIONG et al., (2017).

$$\ln C_T = -k \cdot t + \ln C_0 \quad \text{Equação 6.1}$$

Onde C_0 (mg L^{-1}) é a concentração inicial no dia zero; C_T (mg L^{-1}) é a concentração de no dia t ; k é a constante da reação (d^{-1}); t é o tempo de degradação (dias).

6.2.5. Caracterização bioquímica, análises imediatas e elementares

Ao final do experimento, as biomassas foram submetidas a centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos e, em seguida, congeladas. Posteriormente, a biomassa foi submetida a liofilização e caracterizada para determinação de teores de carboidratos, proteínas, lipídios, bem como o perfil de ácidos graxos. Além disso, foram realizadas análise imediata (umidade, material volátil, cinzas e carbono fixo) e elementar (C, H, N, S e O).

O conteúdo de carboidrato foi quantificado por meio de hidrólise ácida e sua concentração determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico, conforme descrito por (DUBOIS et al., 1956). Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em espectrômetro a 490 nm, utilizando curva padrão de glicose. O conteúdo de proteína foi quantificado indiretamente usando o método NTK (APHA, 2012), sendo o fator de conversão de N em proteína igual de 6,25 (ZHONG et al., 2012).

O conteúdo de lipídios foi determinado utilizando a metodologia de extração Soxhlet (AOAC, 1990) conforme descrito por SILVA et al., (2024). Após a maceração da biomassa, a extração dos lipídios neutros foi realizada no equipamento de determinação de gordura (Tecnal TE-044-8/50) durante 6 horas, utilizando hexano a 99 % como solvente. Em seguida, no mesmo equipamento, os lipídios de membranas foram extraídos com etanol a 96 %, durante 3 horas e quantificados por meio de gravimetria.

A determinação de umidade, cinzas, matéria volátil e carbono fixo foi realizada de acordo com ASTM, (2012). Inicialmente, 1 g de biomassa foi submetida a um processo de secagem a uma temperatura de 105 °C até alcançar peso constante. Assim, o teor de umidade foi determinado pela

diferença entre as massas das amostras antes e após a secagem. Em seguida, o cadinho, contendo a amostra livre de umidade, foi tampado e aquecido em mufla a 900 °C, por 7 minutos, para determinação da matéria volátil. Por fim, o teor de cinzas foi determinado colocando a amostra em mufla a 700 °C por 4 horas. O teor de carbono fixo foi determinado por diferença. Deve-se observar que as avaliações gravimétricas foram realizadas após a amostra ter resfriado até uma temperatura constante em um dessecador.

Para as análises elementares, os teores de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) foram determinados por combustão seca, utilizando analisador elementar Perkin Elmer, PE-2400, série II. O método consiste em promover a combustão da amostra a 925 °C e analisar os gases liberados por cromatografia gasosa. O teor de enxofre (S), foi determinado conforme a metodologia descrita por EMBRAPA (2009) pelo método de extração com ácido acético.

6.2.6. Determinação do perfil de ácidos graxos

A extração de ácidos graxos e a preparação de ésteres metílicos foram conduzidas conforme metodologia descrita por FREITAS et al., (2014). A análise dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Varian (Palo Alto, CA, EUA) 3800, equipado com detector de ionização de chama. Cada amostra foi preparada em duplicata e injetada duas vezes. A separação foi conduzida em coluna capilar de sílica fundida de 0,32 mm x 30 m (filme 0,32 µm) Supelcowax 10 (Supelco, Bellafonte, Palo Alto, CA, EUA), sendo o gás de arraste o Hélio (3,5 mL min⁻¹). As temperaturas do injetor (250 °C) e do detector (280 °C) foram mantidas inicialmente com uma proporção de divisão de 1:50 por 5 minutos e, em seguida, de 1:10 pelo restante do tempo. A pressão da coluna foi de 13,5 psi. Os picos foram identificados e calculados utilizando padrões conhecidos (NU-CHEK-PREP, ELYSIAN, MN, EUA).

6.2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software Excel®. Estatísticas descritivas, testes de hipóteses e análises de regressão foram realizadas com o software Minitab®. Análise de variância (ANOVA) foi conduzida e validada manualmente, seguida pelo teste de Tukey em um nível de significância de 5% para comparar os resultados experimentais.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Comunidade fitoplanctônica e histoquímica

Na Figura 6.2 é apresentada a caracterização da comunidade fitoplanctônica. *Chlorella vulgaris* foi a espécie mais abundante em todos os tratamentos, com abundâncias relativas de 99,32% ($3,78 \times 10^6$ células mL⁻¹) em T1, 77,19% ($1,61 \times 10^6$ células mL⁻¹) em T2 e 50,98% ($1,12 \times 10^6$ células mL⁻¹) em T3. Outras espécies, como *Pseudodidymocystis fina*, *Tetradismus obliquus* e *Scenedesmus acunae*, foram observadas em T2 e T3, apresentando abundâncias relativas variáveis. Por exemplo, *Pseudodidymocystis fina* representou 15,61 % e 40,44 % da comunidade em T2 e T3, respectivamente, enquanto *Tetradismus obliquus* compôs 4,10 % em T2 e 4,56 % em T3.

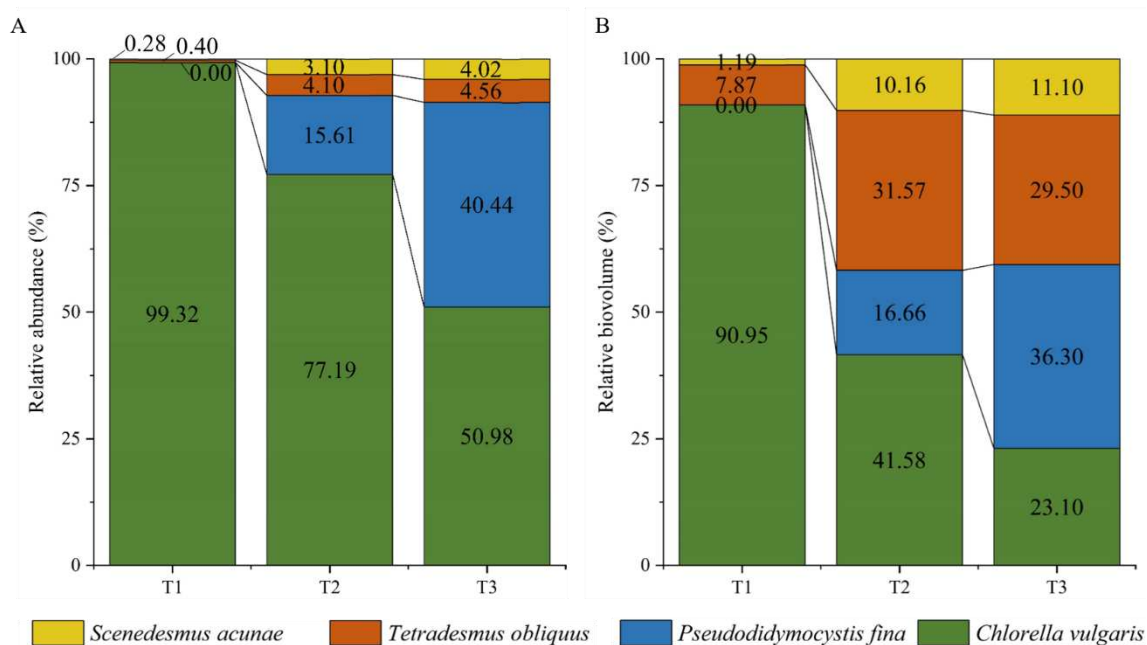


Figura 6.2. Comunidade fitoplanctônica em termos de abundância relativa de indivíduos (A) e biovolume (B).

A análise do biovolume revelou diferenças significativas no tamanho celular das espécies nos tratamentos estudados. Em T1, *Chlorella vulgaris* apresentou células com biovolume de $1.07 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$, enquanto em T2, o biovolume foi de $7.00 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$. Adicionalmente, *Tetradismus obliquus* em T2 exibiu um biovolume de $4.89 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$. No tratamento T3, *Pseudodidymocystis fina* destacou-se com um biovolume de $7.69 \times 10^7 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$. O biovolume total foi maior em T3 ($2,12 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$), seguido de T2 ($1,68 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$) e T1 ($1,18 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \text{ mL}^{-1}$). Esses resultados sugerem que a

disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo pode influenciar o tamanho celular das espécies, especialmente em relação às diferentes proporções de nutrientes e às distintas razões C/N.

A mudança na predominância das espécies de microalgas observada nos tratamentos T1, T2 e T3 pode ser atribuída às variações na disponibilidade de nutrientes, especialmente nas razões C/N no meio de cultivo. A *Pseudodidymocystis fina*, uma clorófitica de água doce da família *Scenedesmaceae*, já foi registrada em países como Alemanha, Holanda, Cuba e Brasil (ALGAE BASE, 2017). Embora existam pesquisas limitadas sobre sua composição bioquímica, seu pequeno tamanho de célula e tendência a ocorrer em pares (FERRAGUT et al., 2005) fornecem uma vantagem competitiva em condições limitadas por nutrientes devido a uma maior proporção de área de superfície para volume, facilitando a absorção eficiente de nutrientes. Essa característica provavelmente explica sua predominância em tratamentos limitados por nitrogênio (T2 e T3).

Os requisitos nutricionais e as habilidades competitivas entre as espécies de microalgas influenciam ainda mais sua predominância ambiental. Algumas espécies se destacam na absorção de nutrientes, enquanto outras utilizam eficientemente os recursos disponíveis, permitindo que superem outras em condições específicas (SU, 2021; WANG et al., 2013). Em um estudo recente, ALAM et al., (2024) investigaram uma instalação em escala real de recuperação de recursos de águas residuárias (EcoRecover) por meio do uso de microalgas mistas durante o tratamento terciário, durante nove meses. Os autores verificaram que, durante um período de instabilidade do sistema houve a necessidade de suplementação de bicarbonato de sódio para aumentar a alcalinidade e o pH, além da adição de amônio para evitar limitação de nutrientes. Essas intervenções fizeram com que a predominância mudasse de *Chlorella* para *Scenedesmus*.

Na Figura 6.3 são apresentados os resultados da histoquímica da biomassa de microalgas produzida em diferentes razões C/N. A presença de autoesporângio, estrutura reprodutiva encontrada em espécies na classe *Chlorophyceae*, foi observada em todos os tratamentos. O autoesporângio é uma célula especializada que dá origem a autoesporos, processo pelo qual a

célula-mãe passa por sucessivas divisões celulares, dando origem entre 2 a 16 células-filhas idênticas, a depender da espécie (NEOFOTIS et al., 2016).

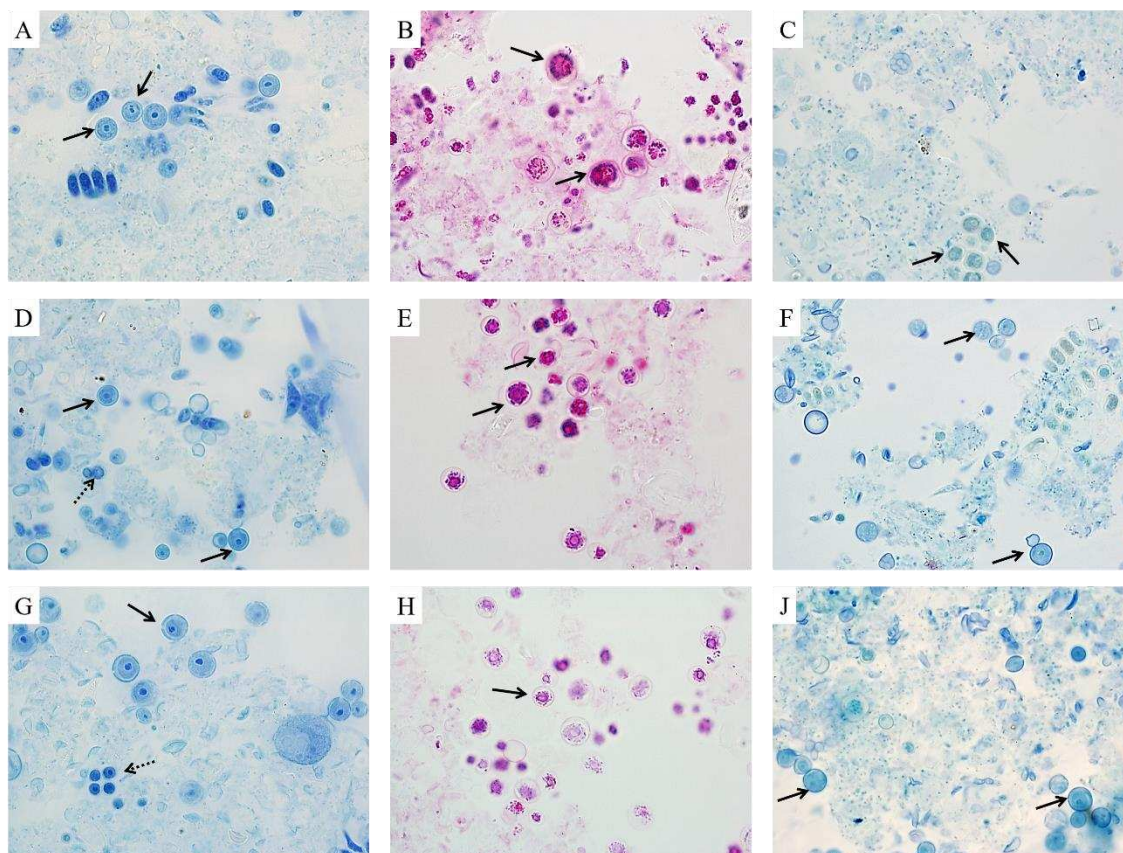


Figura 6.3. Histoquímica da biomassa de microalgas cultivadas em razão C/N 9,65 (A, B e C); 25,31 (D, E e F) e 52,71 (G, H e J) em fotomicroscópio Olympus BX53, usando uma objetiva de 100X. Coloração de azul de bromofenol de mercúrio para a detecção de proteínas totais (A, D e G); Coloração ácido periódico de Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos (B, E e H); Coloração de azul do Nilo para detecção de lipídios totais (C, F e J). As setas contínuas indicam os autoesporângio, e as células pontilhadas indicam células novas.

A análise histoquímica também revelou a presença de pirenoides durante a coloração com azul de bromofenol, uma característica associada a espécies como *Chlorella vulgaris*, *Pseudodidymocystis fina*, *Scenedesmus acunae* e *Tetradismus obliquus*. No entanto, a visibilidade dos pirenoides foi reduzida em T3, embora essa redução não tenha sido diretamente correlacionada com a quantidade.

Pirenoides, estruturas proteicas encontradas dentro dos cloroplastos, são compostas principalmente de RuBisCo e desempenham um papel fundamental nos mecanismos de concentração de C. Esses mecanismos envolvem o acúmulo de bicarbonato no cloroplasto, que é convertido em CO₂ por anidrases

carbônicas, aumentando assim a eficiência da fotossíntese (SHIMAKAWA et al., 2024).

6.3.2. Produção de biomassa de microalgas

Na Figura 6.4 são apresentados os dados de produção de biomassa, representados pela concentração de SSV, chl-a, bem como o monitoramento de pH e OD durante o experimento.

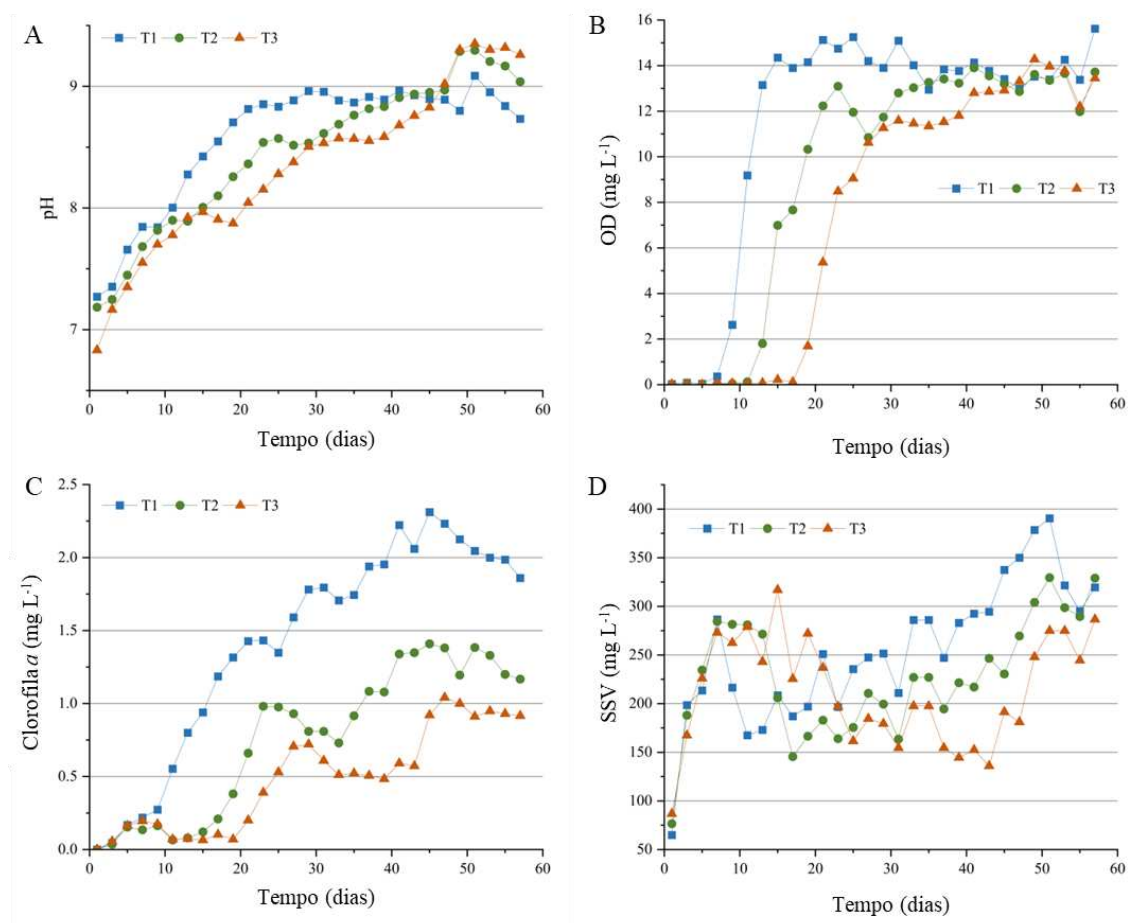


Figura 6.4. Monitoramento do pH (A), OD (B), Clorofila-a (C) e SSV (D) ao longo do período experimental.

O tratamento T1 (60% ARM + 40% ARIS) demonstrou o pico mais alto de SSV (390,50 mg L⁻¹) e chl-a (2,31 mg L⁻¹), além da maior produtividade (2,32 mg L⁻¹ d⁻¹ para SSV e 0,015 mg L⁻¹ d⁻¹ para chl-a, respectivamente) com relação C/N de 9,65. No entanto, a queda expressiva no pH só ocorreu após o 50º dia de cultivo, sugerindo uma adaptação prolongada do sistema, possivelmente ligada à operação no inverno. A baixa produtividade de SSV (2,35; 1,96 e 1,63 g m⁻² d⁻¹) e chl-a (0,015; 0,009 e 0,006 g m⁻² d⁻¹) observada nos respectivos valores de C/N 9,65; 25,31 e 52,71, pode ser explicada pela menor disponibilidade de luz e

temperaturas mais baixas, fatores típicos dessa estação. Geralmente, uma razão C/N inferior ou igual a 18 é necessária para um crescimento adequado e eficiência no tratamento (MARA; HORAN, 2003). Razões C/N superiores ou iguais a 22 reduzem o desempenho e favorecem o desenvolvimento de organismos filamentosos (HATTING, 1963) e biofilmes fúngicos (TOMLINSON; WILLIAMS, 1975). Além disso, o conteúdo de C orgânico nos efluentes pode prejudicar a atividade algal quando a razão C/N for superior ou igual a 21 (VALCHEV; RIBAROVA, 2022). Os valores preferenciais da razão C/N variam entre 5 e 10 (MA et al., 2017).

Os resultados deste estudo são consistentes com as pesquisas de PEREIRA et al., (2024b) que reportaram uma produção de $740,56 \pm 103,26$ mg SSV L⁻¹ e $3,22 \pm 0,007$ mg chl-*a* L⁻¹ para um C/N de 7,52, e $1058,33 \pm 91,80$ mg SSV L⁻¹ e $3,07 \pm 0,16$ mg chl-*a* L⁻¹ para um C/N de 30,67. Observa-se que o C/N de 7,52 resultou em uma maior produção de chl-*a*, reforçando a ideia de que um C/N mais próximo do ideal favorece o crescimento algal. As condições de inverno e o uso de misturas de ARM e ARIS foram aspectos comuns entre os estudos. Entretanto, o estudo de PEREIRA et al., (2024b) foi conduzido em escala menor (frascos de cultivo com 600 ml de volume), além do cultivo ter sido realizado em estufa agrícola. Esses aspectos podem ter reduzido a suscetibilidade às baixas temperaturas e à contaminação ambiental, o que possivelmente contribuiu para as maiores concentrações de chl-*a* e SSV observadas.

O aumento de escala pode impactar negativamente a eficiência da produção de biomassa, o que deve ser considerado na interpretação dos resultados deste estudo. Nesse contexto, os resultados de SUTHERLAND et al., (2020) mostram que o aumento de escala, operando LATs com áreas de 5 m², 330 m² e 1 hectare durante o inverno, também resultou em uma queda nas concentrações de chl-*a* e SST. Segundo os autores, em LATs de grande escala, os fluxos laminares podem resultar em condições desfavoráveis de luz, devido à dissipação da turbulência vertical. Esse fato impõe um limite superior ao crescimento da biomassa cultivada no sistema.

6.3.3. Remoção de poluentes e equações cinéticas

Na Figura 6.5 são apresentados dados da remoção de poluentes ao longo do período avaliado.

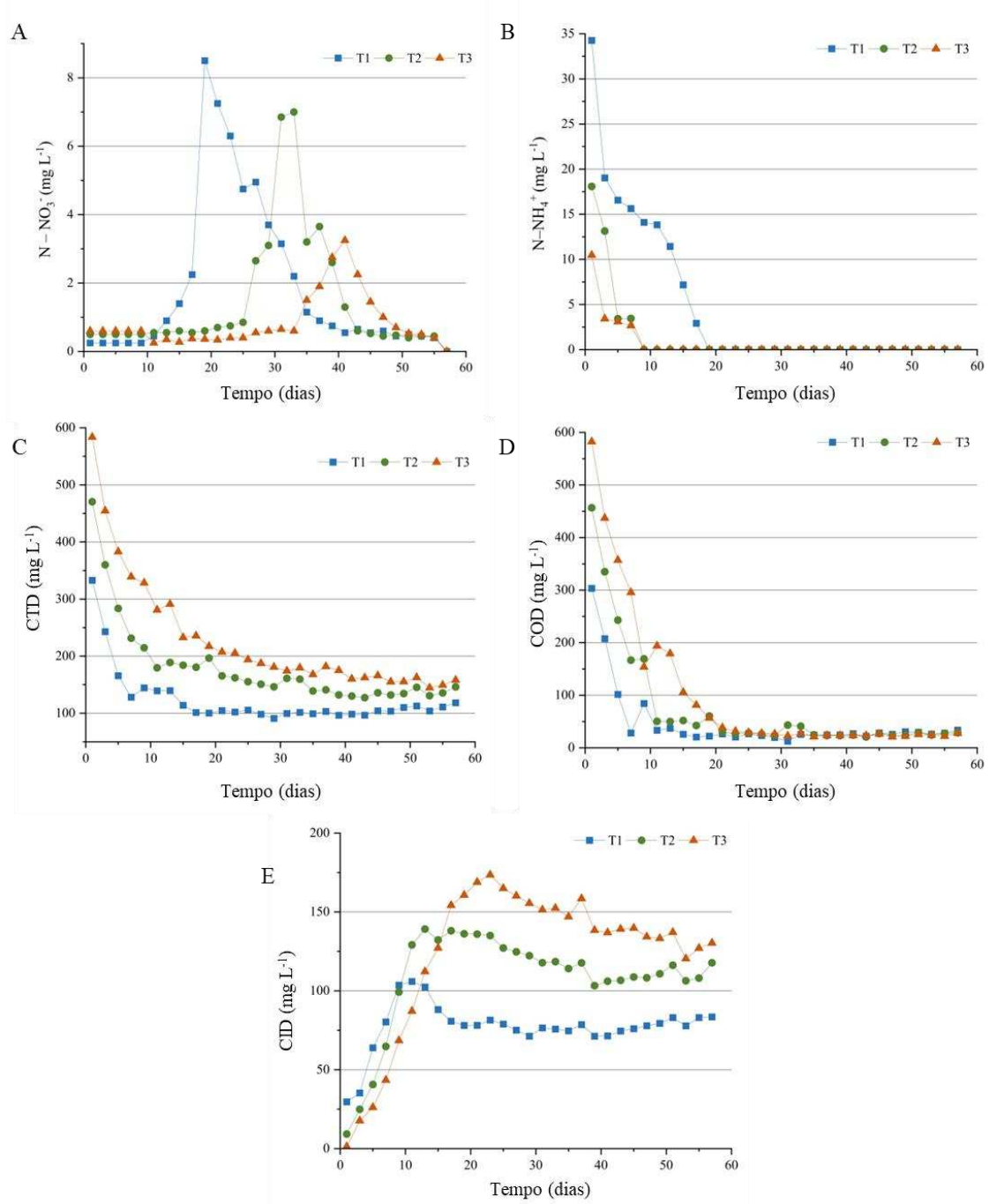


Figura 6.5. Remoção de N-NO₃⁻ (A); N-NH₄⁺ (B); CTD (C); COD (D) e CID (E) ao longo do tempo.

Todos os tratamentos mostraram uma rápida diminuição nos níveis de N-NH₄⁺, com remoção completa observada após 19 dias no T1 e após 9 dias em ambos T2 e T3 (Figura 6.5 B). Um fator importante que contribui para a remoção de N-NH₄⁺ é o pH. Durante o experimento, em todos os tratamentos o pH atingiu

valores acima de 9 (Figura 6.4 A) o que pode ser atribuído à atividade fotossintética das microalgas, que consomem CO_2 durante as horas de luz, levando a um aumento nos íons hidroxila (OH^-), tornando o meio básico (RAVEN; GOBLER; HANSEN, 2020). Condições de pH elevado deslocam o equilíbrio entre íons N-NH_4^+ e amônia (NH_3) em direção à formação de NH_3 , que pode volatilizar para a atmosfera (PEREIRA et al., 2024b).

Em T1, o pH aumentou de um valor inicial de, aproximadamente, 7,3 para mais de 9,5 após 15 dias, coincidindo com o período de declínio rápido em N-NH_4^+ . Aumentos de pH semelhantes foram observados em T2 e T3, embora atingindo menores valores. Portanto, a remoção de N-NH_4^+ nas LATs pode ser atribuída a uma combinação de assimilação por microalgas e bactérias, e remoção por volatilização de NH_3 sob condições de pH elevado. Além disso, o processo de nitrificação, provavelmente, também contribuiu para a redução do nitrogênio amoniacal, especialmente nos tratamentos T1 e T2, devido ao aumento das concentrações de N-NO_3^- , com valores máximos observados de $8,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

PEREIRA et al., (2024b) também observaram o mesmo comportamento e atribuíram tal fato à estratégia de mistura de diferentes águas residuárias que possibilitou o aumento da razão C/N e, conseqüentemente, reduziu a limitação de C. Esse fornecimento de C, por sua vez, promove o aumento da atividade fotossintética das microalgas, resultando no consumo de CO_2 e, conseqüentemente, na elevação do pH do meio. Com o pH mais alcalino, o nitrogênio amoniacal presente tende a se converter em amônia gasosa (NH_3), que é volatilizada para a atmosfera, levando à perda de N no sistema. No estudo, os autores verificaram que os tratamentos com razões C/N acima de 7,52 alcançaram remoção completa de N-NH_4^+ .

As concentrações de NO_3^- foram inicialmente baixas ao longo do experimento em todos os tratamentos, com valores iniciais de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ (T1), $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ (T2) e $0,60 \text{ mg L}^{-1}$ (T3). No entanto, ao longo do experimento, observou-se um aumento progressivo nas concentrações de NO_3^- , especialmente no tratamento T1, que atingiu um pico de $8,50 \text{ mg L}^{-1}$ após 17 dias, seguido de uma redução gradual até retornar a níveis próximos aos iniciais após 39 dias. Tendências semelhantes, embora menos intensas, foram observadas nos tratamentos T2 e T3.

O aumento temporário na concentração de NO_3^- , particularmente em T1, é atribuído ao processo de nitrificação, onde o amônio é oxidado a nitrato por bactérias nitrificantes (ASSIS et al., 2020b). O declínio nas concentrações de nitrato após o pico sugere assimilação por microalgas uma vez que o amônio foi esgotado. As microalgas podem usar o NO_3^- como uma fonte alternativa de nitrogênio (ASSIS et al., 2020b), e o declínio desses níveis está alinhado com o crescimento contínuo da biomassa microalgal, conforme indicado pelas medições de SSV e chl-*a* (Figura 6.4 C). O carbono total dissolvido (CTD) em todos os tratamentos mostrou uma redução ao longo do tempo. Em T1, o CTD diminuiu de 333,00 mg L⁻¹ para aproximadamente 99,12 mg L⁻¹ após 15 dias, estabilizando-se em torno desse valor posteriormente (Figura 6.5 C). T2 e T3 exibiram tendências semelhantes, com CTD diminuindo de 470,55 e 583,65 mg L⁻¹ para aproximadamente 138,95 e 168,00 mg L⁻¹, respectivamente, após 35 dias.

O carbono orgânico dissolvido (COD) diminuiu durante os dias iniciais, indicando consumo rápido de carbono orgânico. Em T1, o COD caiu de 303,39 mg L⁻¹ para cerca de 31,43 mg L⁻¹ após 7 dias, enquanto em T2 e T3, o COD diminuiu de 456,75 mg L⁻¹ e 582,30 mg L⁻¹ para aproximadamente 28,88 mg L⁻¹ e 26,64 mg L⁻¹, respectivamente, após 19 e 39 dias (Figura 6.5 D). O consumo inicial rápido de COD está alinhado com a fase de crescimento exponencial das microalgas, conforme indicado pelo aumento nos níveis de chl-*a* (Figura 6.4 C). Isso sugere que além da ação das bactérias, as microalgas também podem ter utilizado diretamente o carbono orgânico, especialmente em tratamentos com razões C/N mais altas.

Entretanto, a biodegradabilidade do carbono orgânico pode ser um fator importante para bom desempenho da estratégia de mistura de efluentes. GAMA et al., (2023) observaram que a maior eficiência de remoção de carbono foi de 62% no tratamento onde a razão C/N foi superior a 7,4, ao realizar a mistura de águas residuárias da indústria alimentícia e cervejeira. Esse aumento na eficiência foi atribuído a maior concentração de carbono orgânico. Entretanto, os autores destacaram que a baixa biodegradabilidade do carbono presente na água residuária da indústria cervejeira comprometeu negativamente a eficiência da remoção.

Com relação à cinética de remoção de CTD, T3 exibiu a maior taxa de remoção ($-0,03756 \text{ d}^{-1}$), sugerindo uma degradação mais rápida do CTD comparado a T1 e T2. O valor de k mais alto em T3 pode ser atribuído à maior concentração inicial de CTD e à maior razão C/N, promovendo maior atividade bacteriana heterotrófica e consumo de C orgânico e inorgânico. Os parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste do modelo estão apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2. Parâmetros cinéticos de remoção de carbono total dissolvido, ao longo dos primeiros 30 dias de experimento.

| Tratamento | Equação | K (d^{-1}) | Coefficiente de regressão (R^2) | p-valor |
|------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------|
| T1 | $y = -0,4085 - 0,03503 X$ | 0,03503 ^B | 0,7207 | $p < 0,05$ |
| T2 | $y = -0,3342 - 0,03300 X$ | 0,03300 ^{AB} | 0,7773 | $p < 0,05$ |
| T3 | $y = -0,2045 - 0,03756 X$ | 0,03756 ^A | 0,9114 | $p < 0,05$ |

Nota: Y representa o logaritmo natural da razão entre a concentração final e a concentração inicial de CTD, enquanto X corresponde ao período avaliado de 30 dias.

Resultados semelhantes foram relatados por LATIFFI et al., (2022), que observaram que concentrações iniciais mais altas de substrato (DQO de 1150 mg L^{-1}) podem aumentar a taxa de degradação em processos de fitorremediação, alcançando no final de tratamento valores de DQO iguais a 42 mg L^{-1} . Eles empregaram um modelo cinético pseudo de primeira ordem para descrever a remoção de nutrientes por *Scenedesmus sp.* Esse modelo é usado quando uma reação parece seguir uma cinética de primeira ordem, mesmo sendo influenciada por múltiplos fatores. Com os resultados, os autores constataram que a constante de taxa diminuiu com o aumento da concentração do substrato, o que atribuíram à inibição do substrato em concentrações muito altas. Tal fato, vai ao encontro ao observado no presente estudo, uma vez que as concentrações iniciais de DQO_t foram 1603,68; 2287,89 e 2958,95, para T1, T2 e T3 respectivamente. No presente estudo, o alto CTD inicial no T3 não inibiu a degradação, mas sim apoiou taxas de degradação mais altas, possivelmente devido à disponibilidade balanceada de nutrientes e dinâmicas eficientes da comunidade microbiana.

Essa observação está alinhada com os resultados de SELVARAJ; ARIVAZHAGAN, (2024), que demonstraram que a cinética de primeira ordem descreveu efetivamente a remoção de DQO em efluentes têxteis tratados com *Spirulina platensis*. Eles relataram constantes de taxa mais altas para tratamentos com degradação mais rápida, apoiando ainda mais os resultados obtidos neste estudo.

Por outro lado, T1 e T2 apresentaram constantes de taxa ligeiramente mais baixas ($0,03503\text{ d}^{-1}$ e $0,03300\text{ d}^{-1}$, respectivamente). Apesar de T2 ter uma concentração de CTD inicial maior do que T1, a constante de taxa mais baixa de T2 pode ser atribuída a limitações nutricionais que afetaram a eficiência da degradação. Os coeficientes de determinação (valores de R^2 variando de 0,7207 a 0,9114) e p-valor significativos ($p < 0,05$) confirmam um bom ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados experimentais. Isso sugere que a degradação de CTD nas LATs segue cinética de primeira ordem, onde a taxa de degradação é proporcional à concentração de CTD.

Com relação ao carbono inorgânico dissolvido (CID), o seu aumento ao longo do tempo em todos os tratamentos (Figura 6.5) está relacionado à mineralização do COD. Bactérias heterotróficas oxidam o C orgânico a CO_2 , que pode ser utilizado pelas microalgas para fotossíntese (YAN et al., 2024). Este processo contribui para o ciclo geral do C dentro do sistema.

Adicionalmente, os resultados destacaram o papel crítico da razão C/N e do pH na influência da dinâmica de remoção de poluentes dentro das LATs. Níveis elevados de pH podem indicar que o C inorgânico, fornecido pela ação das bactérias, não foi suficiente para atender às demandas das microalgas durante a fotossíntese. Conseqüentemente, o pH elevado favoreceu a remoção de $\text{N} - \text{NH}_4^+$ por volatilização de NH_3 . Quando o C inorgânico é insuficiente para a fotossíntese, as microalgas podem se adaptar utilizando C orgânico de forma mixotrófica a partir do efluente, contribuindo ainda mais para a remoção de poluentes.

A aplicação de cinética de primeira ordem à degradação do CTD demonstra a eficácia da LAT na redução de C orgânico. Ao ajustar as proporções de ARM e ARIS é possível otimizar o sistema para uma remoção aprimorada de N e C. Essa adaptabilidade oferece uma abordagem flexível e eficiente para

melhorar o tratamento de águas residuárias e apoiar a produção de biomassa de microalgas.

6.3.4. Mudança da composição bioquímica sob diferentes razões C/N

A biomassa de microalgas produzida em diferentes razões C/N foram coletadas na fase estacionária para determinar suas composições bioquímicas. As características bioquímicas em termos de conteúdo de lipídios, carboidratos e proteínas, além do conteúdo de C, H, N, S e O (análise elementar), bem como umidade, matéria volátil, carbono fixo e cinzas (análise imediata) são apresentadas Tabela 6.3.

Tabela 6.3. Característica da biomassa de microalgas em termos de composição bioquímica, análise imediata e análise elementar.

| Tratamentos | Materia l Volátil | Cinza s | Umidade | Carbon o Fixo | Proteín a | Carboidrat o | Lipídios neutros | Lipídios de membrana | Lipídios Totais | C | H | N | S | O |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| | | | | | | | | | | | | | | |
| T1 (C/N 9,65) | 62,08 (0,83) ^B | 14,94 (0,34) ^A | 11,36 (0,23) ^A | 11,97 (0,29) ^A | 25,37 (0,04) ^A | 12,99 (0,71) ^B | 10,90 (0,13) ^A | 3,53 (0,18) ^A | 14,44 (0,06) ^A | 42,88 (0,12) A | 6,38 (0,21) A | 5,36 (0,04) A | 0,72 (0,05) ^A | 44,68 (0,34)) ^A |
| T2 (C/N 25,31) | 65,62 (0,66) ^A | 15,34 (3,25) ^A | 10,65 (0,51) ^A | 10,52 (1,43) ^A | 22,48 (0,12) ^B | 18,44 (1,55) ^A | 8,88 (0,13) ^B | 4,44 (1,07) ^A | 13,32 (0,94) ^{AB} | 41,48 (0,10) A | 6,26 (0,24) A | 4,88 (0,01) A | 0,62 (0,06) AB | 46,76 (0,29)) ^A |
| T3 (C/N 52,71) | 64,79 (0,33) ^A | 18,55 (1,54) ^A | 9,18 (0,13) ^B | 8,50 (0,45) ^A | 21,49 (0,30) ^C | 21,09 (0,30) ^A | 7,57 (0,28) ^C | 2,23 (0,92) ^A | 9,80 (1,19) ^B | 42,33 (2,89) A | 6,72 (0,40) A | 5,33 (0,83) A | 0,48 (0,04) ^B | 45,15 (4,17)) ^A |

As diferentes razões C/N influenciaram na composição bioquímica, com maior teor de carboidratos em T2 (18,44 %) e T3 (21,09 %). Esses resultados superaram os obtidos por ASSIS et al. (2019), tanto para o cultivo em ARM com adição de CO₂ a 99,9% (15,8 %), quanto com CO₂ da combustão de gasolina (14,6 %). Isso sugere que a mistura de águas residuárias pode substituir a suplementação de carbono inorgânico, favorecendo o acúmulo de carboidratos. TAN; ZHAO; YANG, (2019) também observaram um aumento no teor de carboidratos de 19,4% para 24,4% ao combinar águas residuárias de amido acidificadas com águas residuárias de amido digerido anaerobiamente (proporção 1/1), devido a sua alta razão C/N (56,2).

Adicionalmente, sob condições de limitação de N, DONG; LI; LI, (2020) reportaram que a microalga *Chlorella pyrenoidosa* apresentou maior conteúdo de amido (17,7%), sendo 2,25 vezes superior à condição de controle. Entretanto, os autores reforçam que com prolongamento do tempo de estresse, o amido foi gradualmente degradado, e o esqueleto de carbono degradado foi usado principalmente para síntese de lipídios. Dessa forma, uma possível explicação para o aumento do teor de carboidratos é a maior disponibilidade de carbono orgânico fornecido pelo ARIS, que pode ter favorecido o acúmulo de carboidratos, especialmente em maiores razões C/N.

Além disso, o aumento da razão C/N estimulou o crescimento de outras espécies de microalgas, como *Pseudodidymocystis fina*, *Tetrademus obliquus* e *Scenedesmus acunae*. Por exemplo, em condições de limitação de nitrogênio, a espécie *Tetrademus obliquus* acumulou amido como principal reserva energética (LEÓN-SAIKI et al., 2020). Segundo BO et al., (2023), em baixas concentrações de N, o fluxo de carbono fixo fotossintético é alternado, da via de síntese de proteínas para lipídios ou carboidratos.

A razão C/N também influenciou o acúmulo de lipídios. O tratamento T1 foi estatisticamente superior ($p < 0,05$), com os maiores teores de lipídios totais (14,44%) e lipídios neutros (10,90%). Os resultados deste estudo superaram os de FERREIRA et al., (2020), que reportaram teor de lipídios neutros de 3,66% em lagoas de alta taxa e 2,29% em reatores de biofilme, com microalgas cultivadas em efluentes domésticos. ASSIS et al. (2019) também observaram valores inferiores, de 5,5% e 6,0% (suplementação com CO₂ a 99% e CO₂ de combustão, respectivamente), em águas residuárias domésticas (C/N 0,58).

Segundo LIU et al., (2024), os lipídios neutros são sintetizados pelas microalgas para produzir energia e, assim, reduzir o dano oxidativo causado por condições de estresse. Isso reforça que a relação C/N mais elevada (como as testadas em T1, T2 e T3) favorece o acúmulo de lipídeos neutros. Esses resultados sugerem que a disponibilidade de carbono no meio é uma estratégia eficiente para estimular a produção de lipídios neutros, essenciais para a produção de biocombustíveis.

Quanto aos lipídios de membranas, os valores variaram entre 2,23% (T3) a 4,44% (T2), e não houve diferença estatística entre os tratamentos avaliados. Apesar disso, esses valores são menores que os observados por FERREIRA et al., (2020), que reportaram valores de 14,04% (lagoas de alta taxa) e 6,80% (reatores de biofilme). Lipídios de membrana tendem a ser mais abundantes quando a biomassa não está sujeita a estresse nutricional, indicando que as condições dos tratamentos T1, T2 e T3 priorizaram o acúmulo de lipídios neutros em detrimento dos lipídios de membrana.

O teor de proteínas apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) com o aumento da razão C/N. O tratamento T1 destacou-se com o maior valor (25,37%), estatisticamente superior aos demais, resultado atribuído à sua menor razão C/N (9,65). Comportamento semelhante foi reportado por MOU et al., (2023), que observaram o maior teor de proteínas (41,13%) com uma razão C/N de 15 ao investigar os efeitos de diferentes razões C/N no cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* em hidrolisado de arroz.

De forma similar, CAI et al., (2022) obtiveram o melhor desempenho com uma razão C/N de 12, registrando alta produtividade de biomassa (0,90 g/L/dia), teor de proteínas (61,56%) e produtividade de proteínas (0,54 g/L/dia), enquanto variações para valores menores de C/N não resultaram diferenças significativas no conteúdo proteico das microalgas. Segundo os autores, o fator que mais contribui para síntese e acúmulo de proteínas foi a redução da razão C/N que estimulou o acúmulo de ácido glutâmico nas células, favorecendo o anabolismo de outros aminoácidos (CAI et al., 2022).

Em contraste, VYAS et al., (2022) observaram que o teor de proteínas diminuiu sob cultivo heterotrófico em razões C/N mais altas. Para *C. sorokiniana*, o teor de proteínas caiu de 41,66% em cultivo fotoautotrófico para 16,27% e 9,74% sob condições heterotróficas em razões C/N de 20 e 60, respectivamente.

Essa redução coincidiu com um redirecionamento da energia celular para o metabolismo lipídico, com o teor de lipídios aumentando para 32,05% (C/N 20) e 43,13% (C/N 60), em comparação a 31,77% nas condições fotoautotróficas.

Portanto, esses resultados destacam o potencial da mistura de águas residuárias como uma estratégia econômica para otimizar composições bioquímicas voltadas para aplicações específicas, como a produção de biocombustíveis. Além disso, a disponibilidade de carbono é um fator determinante nos caminhos metabólicos das microalgas, influenciando a síntese de carboidratos, lipídios e proteínas. Dessa forma, o presente trabalho sugere que a biomassa produzida em razões C/N mais baixas é mais rica em proteínas e poderia ser direcionada para outros usos (como biofertilizante ou bioestimulante), em vez de ser utilizada como matéria-prima para biocombustíveis.

6.3.5. Perfil de ácidos graxos

Na Figura 6.6 são apresentados os resultados obtidos do perfil FAME da MB juntamente com as percentagens de ácidos graxos saturados e insaturados (UFAs) nas condições estudadas. Quinze ácidos graxos diferentes foram identificados, desde ácidos graxos saturados (SFAs), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs). Entre os SFAs, os principais ácidos graxos foram Ácido Palmítico (C16:0) > Ácido Esteárico (C18:0) > Ácido Mirístico (C14:0). O Ácido Oleico (C18:1), também conhecido como ômega-9, prevaleceu sobre os demais MUFAs. Entre os PUFAs, destacaram-se o Ácido γ -Linolênico (C18:3) e o Ácido Linoleico (C18:2), também conhecidos como ômega-6 e ômega-3, respectivamente. A revisão de literatura conduzida por FERREIRA et al., (2019) apontou que o cultivo de microalgas em águas residuárias tende a gerar lipídios com maior teor de SFA e menor proporção de ácidos graxos insaturados.

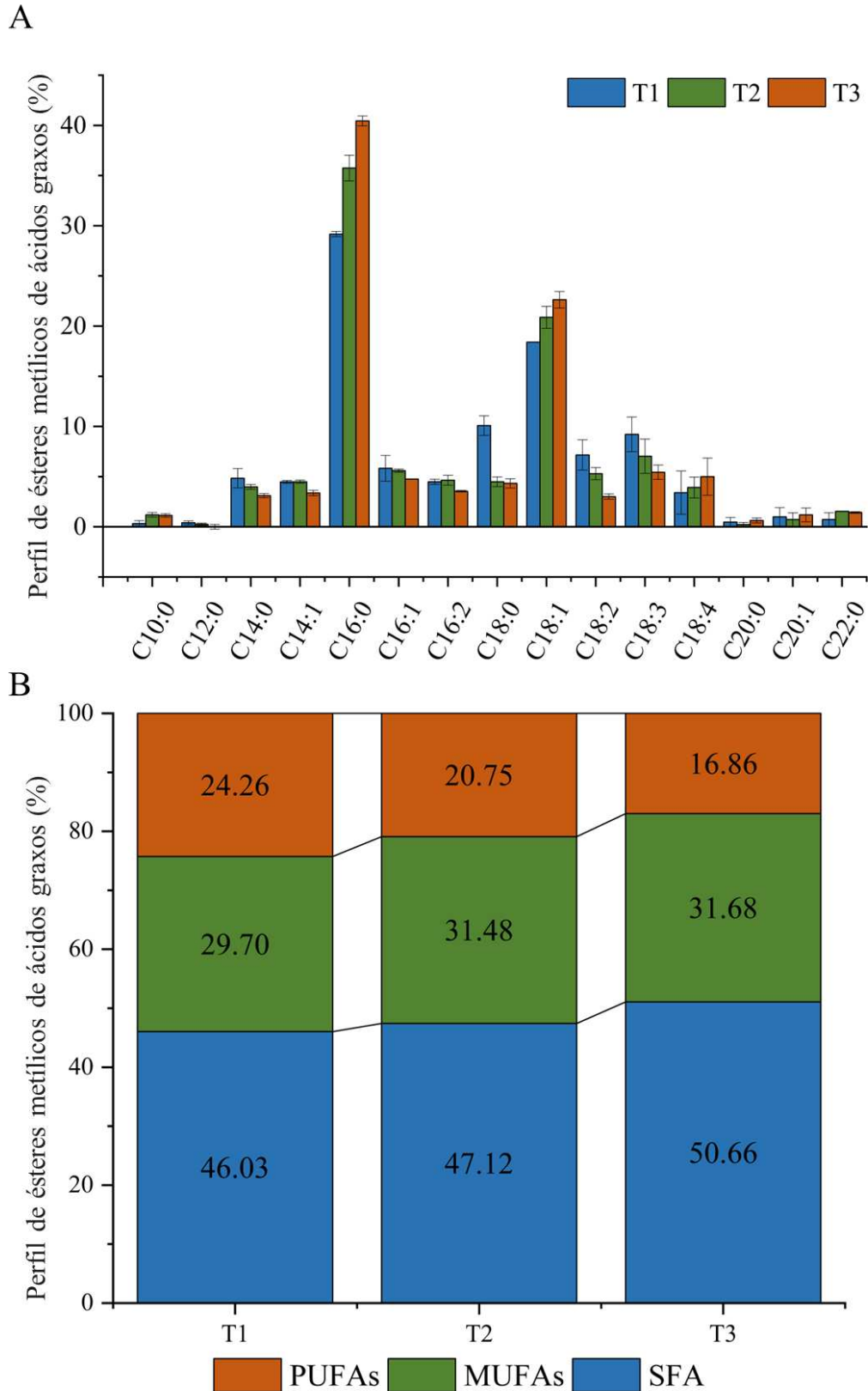


Figura 6.6. Perfil de ácidos graxos da BM cultivadas em diferentes proporções de ARM e ARIS (A) e proporção de ácidos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (B).

A análise de variâncias revelou diferenças significativas entre os tratamentos para C16:0, C18:0 e C18:1. C16:0, sendo estatisticamente superior em T3 (40,39%), seguido de T2 (35,78%) e T1 (29,23%). Além disso, o C18:0 foi estatisticamente superior em T3 (10,08 %), seguido de T2 (4,51 %) e T1 (4,34 %). A alta contribuição de SFAs, como o C16:0 (26,90 – 24,90 %), C14:0 (24,86 – 20,84 %) e C12:0 (13,27 – 10,74 %) relatados nas pesquisas de SHARMA et al., (2020), indicaram melhores características para produção de biocombustível. Essa característica estrutural os torna particularmente adequados para a produção de biodiesel, produzindo biocombustíveis com maior estabilidade oxidativa (menos propensos à oxidação e degradação ao longo do tempo, aumentando sua vida útil e desempenho), melhores propriedades de combustão e densidade energética aprimorada, embora apresentem pior desempenho em climas frios, o que poderia ser superado com manuseio adequado ou adição de aditivos.

Para MUFAs, o conteúdo de C18:1 foi maior em T3 (22,57%), seguido por T2 (20,88%) e T1 (18,45%), embora as diferenças entre T2 e T3 não tenham sido estatisticamente significativas. Fatores como condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes, temperatura, iluminação e fotoperíodo desempenham papéis críticos na determinação da composição de ácidos graxos (ANTO; PUGAZHENDHI; MATHIMANI, 2019; ARUTSELVAN et al., 2022; SHARMA et al., 2020).

Estudos têm demonstrado que a privação de nutrientes, particularmente a limitação de nitrogênio, afeta significativamente os perfis de ácidos graxos. ANTO et al., (2019) relataram que sob privação de nitrato de sódio e ureia, a composição de ácidos graxos de *Chlorella* sp. foi representada por C16:0 (23,8–23,67%) e C18:1 (22,71–23,12%), excedendo os valores observados sob condições médias padrão. Esses resultados apoiam as descobertas do presente estudo, onde uma maior relação C/N aumentou o acúmulo de SFAs e MUFAs.

O perfil de ácidos graxos também é influenciado pelas espécies de microalgas e pela escala de cultivo. Por exemplo, ARUTSELVAN et al., (2022) observaram que o consórcio de microalgas (*Chlorella vulgaris* + *Scenedesmus dimorphus*), cultivadas em efluentes de fábricas têxteis e curtumes exibiram perfis de ácidos graxos variados dependendo da escala de cultivo. O cultivo conduzido indoor em escala laboratorial obteve o ácido oleico com o principal

ácido graxo (31,24% e 39,85% efluente de Fábrica de Tecidos e efluente de Curtume, respectivamente). Entretanto, para o C18:2 (n-6), observou-se uma diferença mais acentuada entre as águas residuárias avaliadas, sendo 24,87% e 1,85%, respectivamente. Adicionalmente, o cultivo outdoor em lagoa (30 litros) alcançou 25,85% e 35,65% de C18:1 (n-9), respectivamente.

A composição do meio de cultura, particularmente no cultivo de águas residuárias, é um fator crítico dos perfis de ácidos graxos. Fatores como a concentração de nutrientes, presença de matéria orgânica, suplementação com CO₂ e contaminantes podem influenciar no metabolismo das microalgas e na produção e acúmulo de ácidos graxos (FERREIRA et al., 2019). Por exemplo, MORENO-GARCIA et al., (2021) demonstraram que adicionar carbono orgânico (glicerol) a um sistema de águas residuárias mistas aumentou significativamente a produção de C16:0 e C18:0 enquanto reduziu C16:1. Além disso, a composição de nutrientes das águas residuárias (por exemplo, concentrações de N-NH₃, P-PO₄⁻, N-NO₃⁻ e TOC) impacta os perfis de ácidos graxos, conforme observado em seu estudo.

Os resultados indicam que vários fatores, incluindo a relação C/N, as condições de cultivo e a composição do meio, afetam significativamente os perfis de ácidos graxos. Uma relação C/N mais alta favorece a produção de SFAs e MUFAs, aumentando a adequação de lipídios de microalgas para aplicações em biocombustíveis.

6.4. Conclusão

A combinação de águas residuárias municipais e industriais, com proporções C/N controladas, demonstrou sua eficácia na promoção do cultivo de microalgas e produção de biocompostos em escala piloto. T1 (C/N 9,65) atingiu a maior produção de biomassa, com SSV e níveis de chl-a superiores, bem como o maior teor de lipídios totais (14,44%) e lipídios neutros (10,90%), tornando-o mais adequado para a produção de biocombustíveis. Por outro lado, T2 (C/N 25,31) e T3 (C/N 52,71) favoreceram o acúmulo de carboidratos, com teores de 18,44% e 21,09%, respectivamente, indicando o potencial para otimização de biomassa direcionada com base nas necessidades de aplicação.

As perspectivas futuras incluem a ampliação de sistemas, a otimização de parâmetros operacionais e a integração de abordagens de biorrefinaria para recuperação de vários bioprodutos. Explorar efluentes industriais alternativos,

acoplar-se a tecnologias de captura de carbono e conduzir avaliações econômicas e de ciclo de vida aumentará ainda mais a viabilidade. Esses avanços destacam o potencial do cultivo de microalgas com base em águas residuárias como uma solução sustentável para recuperação de recursos e produção de biocombustíveis.

Referências Bibliográficas

ALAM, Md Mahbulul *et al.* Community structure and function during periods of high performance and system upset in a full-scale mixed microalgal wastewater resource recovery facility. *Water Research*, v. 259, p. 121819, ago. 2024.

ALGAE BASE. *Pseudodidymocystis fina* (Komárek) E.Hegewald & Deason 1989.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington: [S.n.].

ANTO, Susaimanickam; PUGAZHENDHI, Arivalagan; MATHIMANI, Thangavel. Lipid enhancement through nutrient starvation in *Chlorella* sp. and its fatty acid profiling for appropriate bioenergy feedstock. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, p. 101179, jul. 2019.

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. [S.l.]: American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.

ARUTSELVAN, Chithirai *et al.* Phycoremediation of textile and tannery industrial effluents using microalgae and their consortium for biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, v. 367, 20 set. 2022.

ASSIS, Letícia Rodrigues de *et al.* Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. *Journal of Environmental Management*, v. 274, 15 nov. 2020.

ASSIS, Tamires Condé de *et al.* Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. *Journal of Cleaner Production*, v. 215, p. 1160–1169, abr. 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis. [S.l.: S.n.]. v. Volume I

ASTM. ASTM D7582-12 standard test methods for proximate analysis of coal and coke by macro thermogravimetric analysis. , 2012.

BANCROFT, John D.; GAMBLE, Marilyn. Theory and Practice of Histological Techniques, Sixth Edition. [S.l.]: Elsevier, 2007.

BENAVENTE-VALDÉS, Juan Roberto *et al.* Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 117–125, jun. 2016.

BO, Yahui *et al.* Mixotrophic culture of bait microalgae for biomass and nutrients accumulation and their synergistic carbon metabolism. *Bioresource Technology*, v. 367, p. 128301, jan. 2023.

CAI, Yihui *et al.* Effects of C/N ratio on the growth and protein accumulation of heterotrophic *Chlorella* in broken rice hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, v. 15, n. 1, p. 102, 8 out. 2022.

CALIJURI, Maria Lúcia *et al.* Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, v. 305, p. 135508, out. 2022.

DONG, Liang; LI, Dong; LI, Chun. Characteristics of lipid biosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* under stress conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 5, p. 877–884, 18 maio 2020.

DUBOIS, Michel. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2. ed. [S.l.]: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

FALLAHI, Alireza *et al.* Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, v. 272, p. 129878, jun. 2021.

FERRAGUT, Carla *et al.* Ficoflorula perifítica e planctónica (exceto Bacillariophyceae) de um reservatório oligotrófico raso (Lago do IAG, São Paulo). v. 32, n. 2, p. 137–184, 2005.

FERREIRA, G. F. *et al.* A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 109, p. 448–466, jul. 2019.

FERREIRA, Jéssica *et al.* Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. *Science of the Total Environment*, v. 746, p. 140939, 2020.

FREITAS, Cláudia *et al.* New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium*

toruloides NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 4, p. 554–562, abr. 2014.

GAMA, Rafael Carvalho Nogueira da *et al.* Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. *Bioresource Technology Reports*, v. 23, p. 101516, set. 2023.

HATTING, W. H. J. The nitrogen and phosphorus requirements of the microorganisms. *In: Water and Waste Treatment Journal. [S.l.: S.n.]*. v. 9 p. 380–386.

JAVED, Fahed *et al.* Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: A pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel*, v. 255, n. February, p. 115826, 2019.

KOMAREK, J.; FOTT, B. Das Phytoplankton im Susswasser Chlorophyceae (Grunanlagen) Ordnung: Chlorococcales: Bd 7 1. *[S.l.]*: Schweizerbart'sche, E., 1983.

KUMAR, B. Ramesh *et al.* Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 17, p. 583–588, fev. 2019.

LATIFFI, Nur Atikah Ahmad *et al.* Nutrients elimination from meat processing wastewater using *Scenedesmus* sp.; optimizations; artificial neural network and kinetics models. *Environmental Technology and Innovation*, v. 26, 1 maio 2022.

LEE, Jae Cheol *et al.* Isolation and screening of indigenous microalgae species for domestic and livestock wastewater treatment, biodiesel production, and carbon sequestration. *Journal of Environmental Management*, v. 318, 15 set. 2022.

LEÓN-SAIKI, G. Mitsue *et al.* Evaluation of diurnal responses of *Tetradesmus obliquus* under nitrogen limitation. *Algal Research*, v. 49, p. 101937, ago. 2020.

LIU, Huan *et al.* A review of the strategy to promote microalgae value in CO₂ conversion-lipid enrichment-biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, v. 436, p. 140538, jan. 2024.

MA, Chao *et al.* Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, p. 111, 2 dez. 2017.

MARA, Duncan; HORAN, Nigel. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. [S.l.]: Academic Press - An imprint of Elsevier, 2003.

MORENO-GARCIA, L. *et al.* Factors affecting the fatty acid profile of wastewater-grown-algae oil as feedstock for biodiesel. *Fuel*, v. 304, p. 121367, nov. 2021.

MOU, Yiwen *et al.* The effects of carbon nitrogen ratio and salinity on the treatment of swine digestion effluent simultaneously producing bioenergy by microalgae biofilm. *Chemosphere*, v. 339, p. 139694, out. 2023.

NEDERLANDS NORM. NEN 6520, water: spectrophotometric determination of chlorophyll a content, nederlands normalisatie- instituut. *In*: 1981.

NEOFOTIS, Peter *et al.* Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, v. 15, p. 164–178, abr. 2016.

NUSH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment. *Arch. Hydrobiolol. Bech. Stuttgart*, v. 14, p. 14–36, 1981.

PARRA, O.; GONZALEZ, M.; DELLAROSSA, V. *Manual Taxonómico del Fitoplancton de Aguas Continentales. V. Chlorophyceae*. n. January, 1983.

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula *et al.* Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies. *Science of The Total Environment*, v. 920, p. 170918, abr. 2024a.

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula *et al.* Municipal and industrial wastewater blending: Effect of the carbon/nitrogen ratio on microalgae productivity and biocompound accumulation. *Journal of Environmental Management*, v. 370, p. 122760, nov. 2024b.

POLAT, Ece; ALTINBAŞ, Mahmut. Dual-mode cultivation of the mixed microalgal culture to induce lipid synthesis using anaerobic digestate as an ammonia source. *Fuel*, v. 337, p. 127240, abr. 2023.

POSADAS, Esther *et al.* Enclosed tubular and open algal–bacterial biofilm photobioreactors for carbon and nutrient removal from domestic wastewater. *Ecological Engineering*, v. 67, p. 156–164, jun. 2014.

RAVEN, John A.; GOBLER, Christopher J.; HANSEN, Per Juel. Dynamic CO₂ and pH levels in coastal, estuarine, and inland waters: Theoretical and observed effects on harmful algal blooms. *Harmful Algae*, v. 91, p. 101594, jan. 2020.

SELVARAJ, Durgadevi; ARIVAZHAGAN, M. Synergistic effects of *Spirulina platensis* cultivation in textile wastewater towards nutrient removal and seed germination study. *Environmental Pollution*, v. 357, 15 set. 2024.

SHARMA, Jyoti *et al.* Microalgal consortia for municipal wastewater treatment – Lipid augmentation and fatty acid profiling for biodiesel production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 202, p. 111638, jan. 2020.

SHIMAKAWA, Ginga *et al.* Diatom pyrenoids are encased in a protein shell that enables efficient CO₂ fixation. *Cell*, v. 187, n. 21, p. 5919- 5934.e19, out. 2024.

SIDDIKI, Sk Yasir Arafat *et al.* Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel*, v. 307, fev. 2022.

SILVA, Thiago Abrantes *et al.* Enhancing microalgae biomass production: Exploring improved scraping frequency in a hybrid cultivation system. *Journal of Environmental Management*, v. 355, p. 120505, mar. 2024.

SOLÍS-SALINAS, Cesar E. *et al.* Long-term semi-continuous production of carbohydrate-enriched microalgae biomass cultivated in low-loaded domestic wastewater. *Science of The Total Environment*, v. 798, p. 149227, dez. 2021.

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

SU, Zhenni *et al.* Effect of pharmaceutical and domestic wastewater mixed ratios on microalgal growth for nutrients removal coupled with biomass and liquid biofuel generation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 6 out. 2023.

SUTHERLAND, Donna L. *et al.* Improved microalgal productivity and nutrient removal through operating wastewater high rate algal ponds in series. *Algal Research*, v. 47, p. 101850, fev. 2020.

SUTHERLAND, Donna L.; TURNBULL, Matthew H.; CRAGGS, Rupert J. Environmental drivers that influence microalgal species in fullscale wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Research*, v. 124, p. 504–512, nov. 2017.

TAN, Xiao-Bo; ZHAO, Xian-Chao; YANG, Li-Bin. Strategies for enhanced biomass and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* culture in starch processing wastewater. *Journal of Cleaner Production*, v. 236, p. 117671, nov. 2019.

TOMLINSON, T. G.; WILLIAMS, I. L. Fungi. In: C.R. Curds and H.A. Hawkes. *In: Ecological Aspects of Used Water Treatment: The Organisms and their Ecology*. Academic Press ed. London: [S.n.]. v. 1 p. 93–151.

UTHERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton - Methodik. [S.l.]: Stuttgart Schweizerbart, 1958.

VALCHEV, Dobril; RIBAROVA, Irina. A Review on the Reliability and the Readiness Level of Microalgae-Based Nutrient Recovery Technologies for Secondary Treated Effluent in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Processes*, v. 10, n. 2, p. 399, 18 fev. 2022.

VYAS, Sachin *et al.* Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, v. 359, p. 127494, set. 2022.

WANG, Haiyu *et al.* A pilot scale study on the treatment of rare earth tailings (REEs) wastewater with low C/N ratio using microalgae photobioreactor. *Journal of Environmental Management*, v. 328, p. 116973, fev. 2023.

WANG, Hui *et al.* The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 745–750, jan. 2013.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. *Limnological analysis*. 2. ed. [S.l.]: Springer-Verlag, 1991.

XIONG, Jiu-Qiang *et al.* Biodegradation and metabolic fate of levofloxacin via a freshwater green alga, *Scenedesmus obliquus* in synthetic saline wastewater. *Algal Research*, v. 25, p. 54–61, jul. 2017.

YAN, Luming *et al.* Effect of excess CO₂ on semi-continuous microalgae systems: Carbon biofixation. *Environmental Technology & Innovation*, v. 35, p. 103645, ago. 2024.

ZHONG, Weizhang *et al.* Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresource Technology*, v. 114, p. 281–286, jun. 2012.

ZHU, Shunni *et al.* Treatment of low C/N ratio wastewater and biomass production using co-culture of *Chlorella vulgaris* and activated sludge in a batch photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 274, p. 313–320, fev. 2019.

7. CAPÍTULO IV – HARVESTING MICROALGAE BIOMASS FROM WASTEWATER VIA ELECTROCOAGULATION: OPERATIONAL PARAMETERS AND EFFICIENCY

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira ¹, Weller Gabriel da Silva Santos ²; Heverton

Augusto Pereira ³; Eduardo de Aguiar do Couto ⁴; Maria Lúcia Calijuri ¹.

¹Federal University of Viçosa, Department of Civil Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

²Federal University of Viçosa, Department of Chemistry

³Federal University of Viçosa, Department of Electrical Engineering

⁴Federal University of Lavras, Department of Environmental Engineering

Versão publicada nos anais da *17th IWA Conference on Small Water and Wastewater Systems and the 9th IWA Conference on Resource-Oriented Sanitation* (Apêndice III).

7.1. Introduction

Microalgae biotechnology, a promising alternative that integrates nutrient recovery with wastewater treatment, faces a significant challenge in biomass harvesting. This challenge is due to the operational complexity, high energy consumption, and elevated costs associated with conventional methods (PEREIRA et al., 2024b). However, these alternatives are slower processes, requiring chemical inputs that affect nutrient concentrations and increase salinity (MORAIS et al., 2023b). In this context electrocoagulation (EC) technology emerges as a promising method for efficient, rapid, and low-energy consumption harvesting. The EC process, which occurs through the electrolytic oxidation of an anode, releases ions that neutralize the negative electrostatic charges on the microalgae surface, thus facilitating the harvesting (LUCAKOVA et al., 2022). The efficiency of this method can be influenced by various factors, from operational parameters to the characteristics of the wastewater used. Therefore, the study aims to evaluate the performance of an EC reactor as a harvesting technology

for microalgae cultivated in wastewater, investigating the impact of current intensity, reaction time, and pH on the process.

7.2. Methodology

The microalgal biomass (MB) was cultivated using domestic wastewater as the culture medium. This effluent was collected after passing through a septic tank at a wastewater treatment plant. MB production was carried out in batch mode in pilot-scale high-rate algae ponds (HRAPs). At the end of the batch, the treated domestic wastewater presented the following characteristics: 10.15 mg L⁻¹ of dissolved oxygen; 679.62 $\mu\text{S cm}^{-1}$ of electrical conductivity; pH of 8.66; 569.22 mg L⁻¹ of chemical oxygen demand; 12.57 mg L⁻¹ of ammoniacal nitrogen; and 6.34 mg L⁻¹ of total phosphorus.

The EC system consisted of a set of parallel aluminum (Al 99.9 %) plates, connected in series, along with a 32 V power supply (Hikari brand). The EC tests were performed to investigate the effect of operational parameters such as pH (6, 7, and 8), electric current (1, 3, and 5A), and reaction time (3, 5, and 7 minutes), totaling 27 experimental units. The sample pH was adjusted with 0.1 mol L⁻¹ NaOH or 0.1 mol L⁻¹ H₂SO₄. The performance of the electrocoagulation (EC) reactor was evaluated based on the aluminum content in the treated effluent, following the methodology described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012) method 3500-Al B. The harvesting efficiency was assessed by measuring the optical density (OD) of the liquid phase at 750 nm using a spectrophotometer (Hach DR3800) before and after each experiment, following the procedure described by PARMENTIER et al., (2020).

The statistical analysis was conducted using Minitab® 17 software (trial version). A multivariate regression analysis was performed to determine the significance of the effects and their interactions, with a significance level of $\alpha = 0.05$. Contour plots were generated to visualize the effects of pH, electrolysis time, and current on the response variables: harvesting efficiency (HE) and aluminum content (AC).

7.3. Results and Conclusions

The results of the multivariate regression analysis are presented in Equations 01 and 02.

$$HE = 14.90 - 4.60 \text{ pH} + 33.26 \text{ Electric current} + 4.99 \text{ Time} - 3.63$$

$$\text{Electric current}^2 \quad \text{Equation 01}$$

$$AC = 8.43 + 1.37 \text{ pH} - 0.38 \text{ Electric current} - 2.83 \text{ Time} + 0,24 \text{ Time}^2$$

$$\text{Equation 02}$$

For the response variable HE ($R^2 = 94.49\%$, $p\text{-valor} < 0.001$), the analysis revealed that Electric Current was the main contributor to the model, explaining 79.03% of the variability, followed by Time with 17.73 %, and pH with 3.69 %. For the response variable AC ($R^2 = 64.26\%$, $p\text{-valor} < 0.001$), pH had the highest contribution, with 36.65 %, followed by Time (25.55 %) and Electric Current (14.99 %).

The statistical analysis results show significant variations in harvest efficiency and Al content as a function of time, current, and pH (Figure 1). It was found that shorter periods and lower currents result in less dissolution of Al electrodes. Consequently, this reduces effluent contamination and promotes energy savings, which are essential for the environmental and economic sustainability of the process. The highest harvesting efficiency (92.61%) was observed at pH 8, an electric current of 5 A, and an operation time of 7 minutes. The harvesting efficiency of traditional methods can reach 85% for chemical flocculation and exceed 95% for centrifugation (MORAIS et al., 2023b).

Although centrifugation is a fast and efficient method, its main limitation is the high energy consumption, along with operational and investment costs. Therefore, centrifugation is not employed, especially when the final product does not have a high market value. Therefore, sedimentation, flotation, and chemical coagulation are more economical alternatives, especially in the context of microalgae cultivated in wastewater. The search for emerging microalgae harvesting methods is the focus of numerous studies. ASSIS et al., (2020) proposed a hybrid reactor, composed of HRAP and a biofilm reactor, achieving a harvesting efficiency of 61%. Bioflocculation with fungi, evaluated by SHITANAKA et al., (2023), reached a harvesting efficiency of 80–85 % within 24 hours.

Several studies have been conducted to evaluate the performance of EC in harvesting microalgae. (KHATIB et al., 2021) implemented a cylindrical arrangement of interconnected electrodes, which significantly intensified the reactor's electric field, minimized the Al electrode's passivation, and achieved a

harvest efficiency of 96.18%. LUCAKOVA et al., (2022) investigated the performance of a pilot-scale continuous EC reactor (with a working volume of 111 L and a flow rate of 240 L h⁻¹) for harvesting microalgae cultivated in synthetic medium. The authors observed high harvesting efficiency (> 85%), low contamination of the collected biomass, and significant energy savings.

The results of this research can drive the large-scale application of microalgae biotechnology and enhance the value of wastewater resources. The biomass generated from wastewater and harvested via EC is rich in valuable compounds like lipids, carbohydrates, proteins, making it suitable as raw material for biofertilizers and biofuels (ASSIS et al., 2020a; PEREIRA et al., 2024b). These by-products have the potential to make wastewater treatment more sustainable, both economically and environmentally.

Therefore, for the EC process, the analysis indicates that significant variations in harvest efficiency are directly related to time, current, and pH. Considering Al contamination, evidenced by the chemical reactions involved and the need to minimize the content of this metal, is crucial for operating strategies in reduced times and elevated pH. Thus, it is important to further the understanding of the interactions between the studied variables to enhance the efficacy of microalgae biomass harvesting and production.

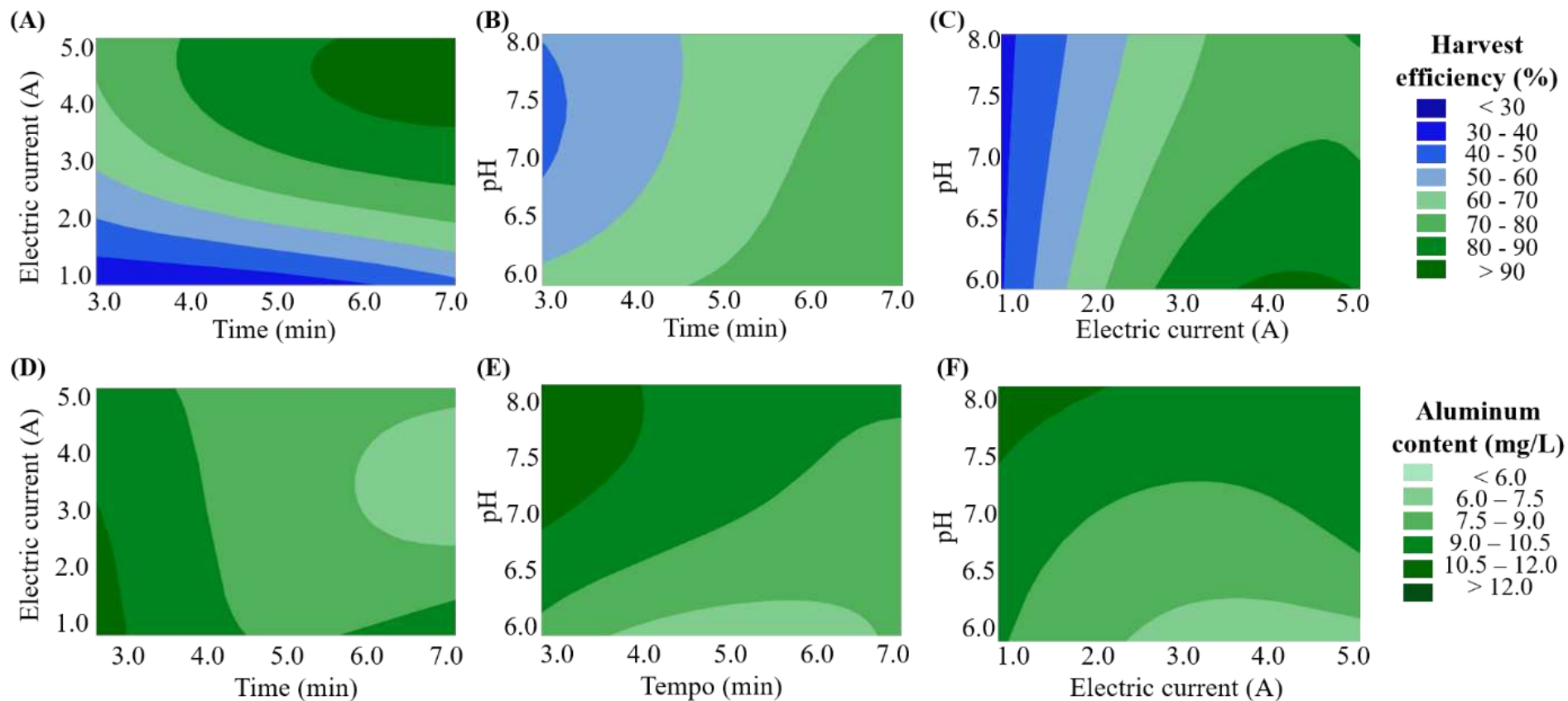


Figura 7.1. Electrocoagulation performance in terms of harvesting efficiency (A, B, and C) and aluminum content (D, E, and F) with respect to the parameters observed in the study (electric current, pH, and time).

References

APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater.** [s.l.] American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.

ASSIS, L. R. DE et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. June, p. 111183, 2020.

KHATIB, W. A. et al. Enhancing the electrocoagulation process for harvesting marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) using interdigitated electrodes. **Journal of Environmental Management**, v. 292, n. February, p. 112761, 2021.

LUCAKOVA, S. et al. Continuous electrocoagulation of *Chlorella vulgaris* in a novel channel-flow reactor: A pilot-scale harvesting study. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126996, maio 2022.

MORAIS, E. G. et al. Microalgae harvesting for wastewater treatment and resources recovery: A review. **New Biotechnology**, v. 78, p. 84–94, dez. 2023.

PARMENTIER, D. et al. A new reactor design for harvesting algae through electrocoagulation-flotation in a continuous mode. **Algal Research**, v. 47, 1 maio 2020.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies. **Science of The Total Environment**, v. 920, p. 170918, abr. 2024.

SHITANAKA, T. et al. Flocculation of oleaginous green algae with *Mortierella alpina* fungi. **Bioresource Technology**, v. 385, p. 129391, out. 2023.

8. CAPÍTULO V – OTIMIZAÇÃO DA COLHEITA DE MICROALGAS POR ELETROCOAGULAÇÃO E ANÁLISE DA VIABILIDADE AMBIENTAL

8.1. Introdução

A biomassa de microalgas cultivada em águas residuárias representa uma oportunidade promissora para a recuperação de recursos no saneamento, além de impulsionar a economia circular por meio da produção de biocombustíveis e biofertilizantes. No entanto, a colheita dessa biomassa enfrenta desafios significativos devido à sua complexidade operacional, ao alto consumo de energia e aos custos elevados, especialmente quando são empregados métodos convencionais (DASSEY; THEEGALA, 2014; LUCAKOVA et al., 2021b). Uma alternativa é a eletrocoagulação (EC) que pode proporcionar a colheita eficiente de microalgas, entretanto o processo depende de diversos fatores como os parâmetros operacionais, bem como as condições das águas residuárias utilizadas e a biomassa de microalgas cultivadas (SINGH; PATIDAR, 2018).

A colheita da biomassa de microalgas representa um dos principais desafios técnicos na aplicação da biotecnologia em águas residuárias. Esse processo é dificultado por fatores como a baixa concentração celular em sistemas abertos ($< 0,5 \text{ g L}^{-1}$), a carga negativa da superfície celular, o reduzido tamanho das células (3–30 μm) e a baixa densidade das microalgas em relação ao meio de cultivo (SINGH; PATIDAR, 2018). Dentre as tecnologias convencionais empregadas para a colheita de microalgas, destacam-se a centrifugação e a coagulação/floculação, amplamente utilizadas para diferentes espécies. No entanto, a centrifugação demanda elevado consumo energético (NAJJAR; ABU-SHAMLEH, 2020), enquanto a coagulação/flotação pode resultar na superdosagem de coagulantes (ABOULHASSAN et al., 2016), comprometendo a qualidade da biomassa e da água residual, o que impacta financeiramente e ambientalmente a etapa de colheita (FERREIRA et al., 2020; WANG; OSHITA; TAKAOKA, 2021). Essas limitações reforçam a necessidade do desenvolvimento de abordagens mais eficientes e sustentáveis para viabilizar a recuperação da biomassa em larga escala.

A eletrocoagulação é uma abordagem inovadora para a colheita de microalgas, que tem se apresentado eficaz na resolução das limitações dos métodos tradicionais. No caso da EC com eletrodos metálicos, dois fenômenos principais ocorrem: (i) a oxidação do metal, que resulta na liberação de cátions metálicos, os quais desestabilizam a carga negativa das microalgas, neutralizando as forças de repulsão entre as partículas e favorecendo a sua agregação; e (ii) a flotação, que ocorre por meio da eletrólise da água, gerando bolhas de oxigênio e hidrogênio, as quais promovem a flotação dos agregados formados na etapa anterior (Figura 8.1).

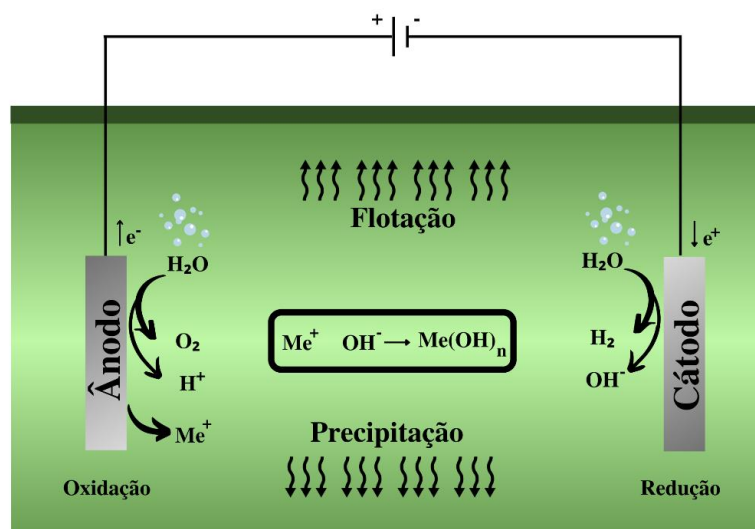


Figura 8.1. Esquema da eletrocoagulação.

A EC oferece vantagens no processo de colheita de microalgas, como a ausência de ânions nocivos (PARMENTIER et al., 2020), baixo risco de superdosagem e fácil controle dos parâmetros operacionais (LUCAKOVA et al., 2022; PRATAMA; HADIYANTO, 2024). Adicionalmente, é aplicável a diversas espécies de microalgas e pode reduzir os custos em até 89% em comparação com a centrifugação (LUCAKOVA et al., 2021b). Contudo, as principais limitações são associadas ao consumo de energia, mudanças no pH e na temperatura do efluente, e a possível dissolução de metais, que podem permanecer na biomassa e na água residual do processo (KHATIB et al., 2021; VISIGALLI et al., 2021). A grande variação dos parâmetros operacionais e a falta de faixas ideais claras dificultam a avaliação tecno-econômica dessa tecnologia em relação aos métodos convencionais.

Embora as pesquisas tenham apresentado resultados promissores (FIGUEIREDO et al., 2022; LUCKAKOVA et al., 2022; PRATAMA; HADIYANTO, 2024), ainda é necessário otimizar o processo para aumentar a eficiência da colheita e minimizar as concentrações de metais, tanto na biomassa de microalgas quanto na água residual. Adicionalmente, os estudos sobre a colheita de microalgas cultivadas em águas residuárias são limitados, sendo mais comum na literatura a colheita de microalgas provenientes de meios sintéticos, geralmente focando em uma única espécie (LANDELS et al., 2019; LUCKAKOVA et al., 2022; PRATAMA; HADIYANTO, 2024; RAHMANI et al., 2017b). No entanto, a pesquisa com microalgas cultivadas em águas residuárias, em substituição aos meios sintéticos, e com maior diversidade de espécies, torna os resultados mais representativos para aplicações reais em tratamento de efluentes. Nesse contexto, a aplicação da Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) na EC, pode permitir uma análise integrada da viabilidade e dos impactos ambientais do processo, fornecendo subsídios para sua otimização e implementação em escala real.

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o desempenho de um reator de EC, em escala de bancada para a colheita de microalgas cultivadas em águas residuárias, determinando os parâmetros operacionais e as condições ideais de funcionamento. A inovação do estudo consiste na aplicação da metodologia de superfície de resposta (MSR) para a otimização da EC, combinando dois objetivos: aumentar a eficiência de colheita de microalgas e minimizar a contaminação da biomassa e da água residual no processo. Por fim, a viabilidade ambiental do processo é avaliada para quantificar os impactos da EC, comparando os cenários técnico e otimizado, a fim de fornecer insights para futuras pesquisas e viabilizar sua aplicação em larga escala.

8.2 Material e Métodos

8.1.1. Produção de biomassa

A produção de biomassa de microalgas foi realizada em uma lagoa de alta taxa em escala piloto (Figura 8.2), localizada na área experimental do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O meio de cultivo foi composto pela mistura de águas residuárias municipais (ARM) e proveniente da indústria de

sucos (ARIS) na proporção de 60:40 (v.v⁻¹), resultando em uma razão C/N igual a 9,65. A escolha da razão C/N foi baseada nos resultados obtidos em estudo anterior, onde verificou-se condições para o maior acúmulo de biomassa pelas microalgas.

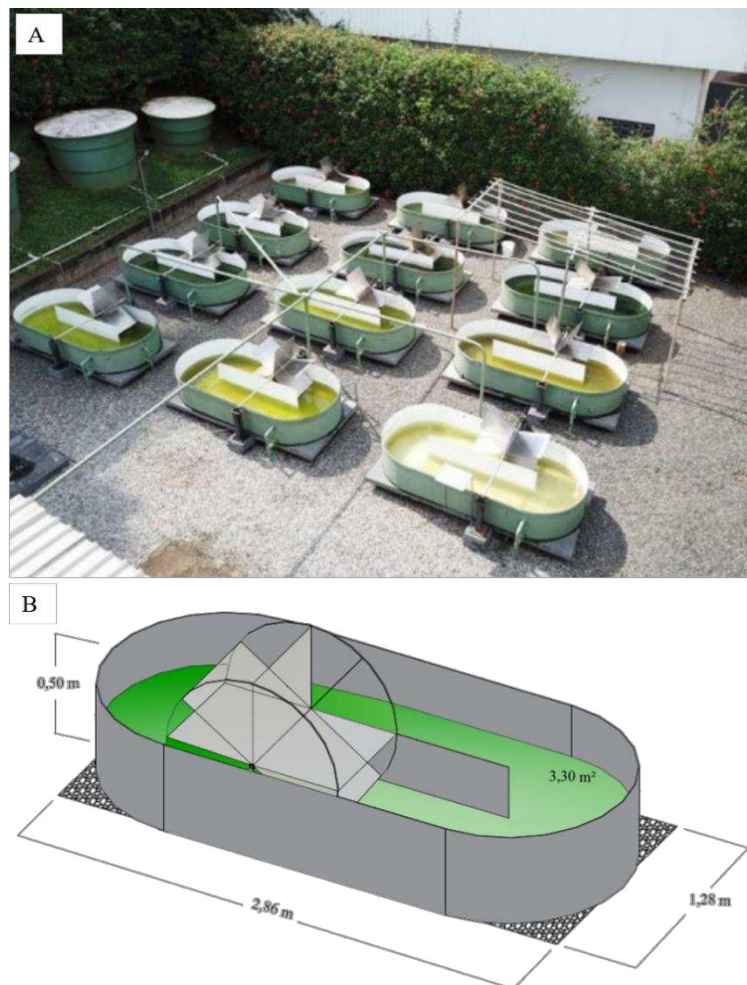


Figura 8.2 (a) Área Experimental, (b) Dimensões da LAT utilizada para a produção de biomassa de microalgas.

O esgoto doméstico e a biomassa de microalgas produzida ao final da etapa de cultivo foram caracterizados em termos de: nitrogênio total Kjeldahl total (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH₄⁺), nitrato (N-NO₃⁻), fósforo total (P – solúvel e total), demanda química de oxigênio (DQO – solúvel e total), sólidos suspensos voláteis (SSV) e totais (SST). Esses parâmetros foram determinados por meio de análises laboratoriais, conforme estabelecido no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). O Carbono Total Dissolvido (CTD), o Carbono Orgânico Dissolvido (COD) e o Carbono Inorgânico

Dissolvido (CID) foram determinados por meio do analisador Shimadzu TOC 5000. Já os parâmetros pH, condutividade elétrica (CE), temperatura e oxigênio dissolvido (OD) foram determinados por meio da sonda multiparamétrica In-Situ (modelo Aqua troll 500). As características físicas e químicas de cada água residuária, bem como da mistura são apresentadas na Tabela 8.1.

Tabela 8.1. Características físicas e químicas das águas residuárias brutas, misturadas (60% ARM + 40% ARIS) e após o tratamento em lagoas de alta taxa.

| Parâmetro | Águas residuárias | | | Efluente Tratado |
|--|-------------------|---------|--------------------|------------------|
| | ARM | ARIS | 60% ARM + 40% ARIS | |
| OD (mg L ⁻¹) | 0,08 | 0,09 | 0,08 | 7,64 |
| pH | 7,33 | 7,15 | 7,20 | 9,45 |
| CE | 1140,61 | 3422,61 | 2053,41 | 1150,31 |
| Temperatura (°C) | 36,17 | 34,02 | 36,05 | 21,87 |
| DQO _s (mg L ⁻¹) | 218,00 | 2178,67 | 1002,27 | 211,92 |
| DOQ _t (mg L ⁻¹) | 235,50 | 2422,00 | 1110,10 | 676,81 |
| N - NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹) | 70,27 | 0,00 | 42,16 | 0,00 |
| N org (mg L ⁻¹) | 20,87 | 15,88 | 18,87 | 24,11 |
| NKT (mg L ⁻¹) | 91,14 | 15,88 | 61,03 | 24,11 |
| NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹) | 1,85 | 1,45 | 1,69 | 1,20 |
| P _s (mg L ⁻¹) | 15,51 | 4,13 | 10,96 | 1,65 |
| P _t (mg L ⁻¹) | 16,10 | 6,87 | 12,41 | 5,08 |
| SSV (mg L ⁻¹) | 2,08 | 140,42 | 57,42 | 367,50 |
| SST (mg L ⁻¹) | 40,00 | 162,92 | 89,17 | 387,50 |
| COD (mg L ⁻¹) | 74,26 | 905,8 | 406,88 | 42,23 |
| CTD (mg L ⁻¹) | 141,10 | 1016,00 | 491,06 | 130,9 |
| CID (mg L ⁻¹) | 67,13 | 110,22 | 84,37 | 88,63 |
| C/N ¹ | 1,03 | 624,69 | 9,28 | 35,19 |

¹ calculada com o Carbono Total Dissolvido (CTD) e a soma entre N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺.

Após 16 dias de cultivo, a biomassa de microalgas foi analisada para determinar a diversidade da comunidade fitoplanctônica, bem como sua composição elementar e imediata. A análise qualitativa do fitoplâncton foi realizada em nível de gênero, conforme descrito por PARRA et al., (1982) e KOMAREK; FOTT, (1983). Paralelamente, foi realizada a contagem de indivíduos em câmara de sedimentação, empregando um microscópio invertido e seguindo o método de UTHERMÖHL, (1958). A densidade dos organismos foi

determinada segundo os critérios estabelecidos pela (APHA, 2012). A caracterização da comunidade fitoplanctônica revelou *Tetrademus obliquus* como a espécie predominante, representando 45% (2.563.401 células mL⁻¹), seguida por *Pseudodidymocystis fina* com 34%, *Chlorella vulgaris* com 19% e *Nitzschia* sp. com 2%.

Os teores de C, H e N foram determinados por combustão seca em um analisador elementar Perkin Elmer PE-2400, série II, com combustão a 925 °C e análise dos gases por cromatografia gasosa. O teor de S foi obtido pelo método de extração com ácido acético, conforme descrito por EMBRAPA, (2009). Os resultados indicaram 47,72% de C, 8,33% de N, 6,73% de H, 36,50% de O e 0,72% de S. A análise imediata, conforme ASTM (2012), resultou em 11,36% de umidade, 14,94% de cinzas, 62,08% de matéria volátil e 11,97% de carbono fixo.

8.1.2. Reator de eletrocoagulação (EC)

O experimento de EC foi realizado em um reator em escala de bancada, fabricado em acrílico, apresentando as seguintes dimensões: 20,00 cm de altura; 20,00 cm de comprimento; e 18,00 cm de largura; o volume total de 7,20 litros e; volume útil de 6,00 litros. Os cátodos e ânodos são constituídos por 6 placas de Al com 99% de pureza, 1,50 mm de espessura; 15,50 cm de altura e 13,00 cm de largura, conforme apresentado na Figura 8.3. Todos os experimentos foram realizados com a mesma área imersa de eletrodo no meio, sendo a área superficial de cada eletrodo igual a 178,75 cm².

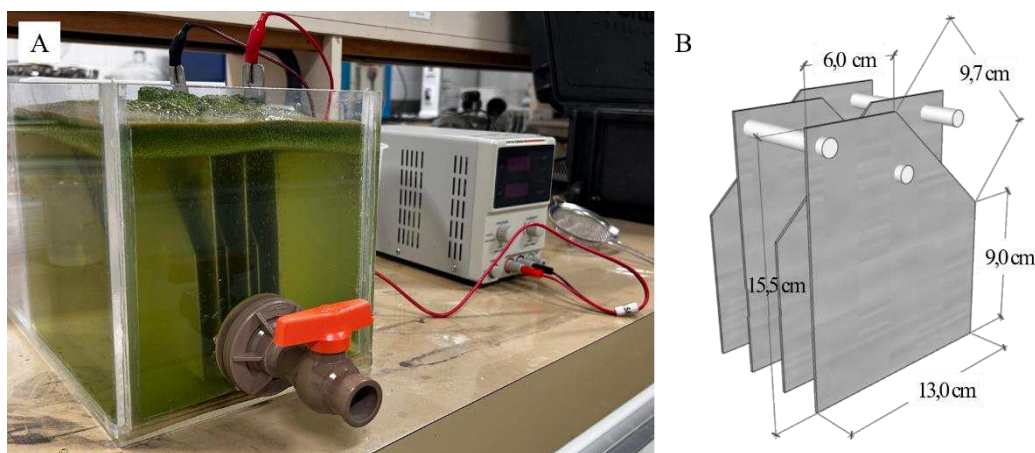


Figura 8.3. Reator de eletrocoagulação e fonte de alimentação DC (A); e as dimensões do eletrodo de alumínio.

8.1.3. Operação e monitoramento

Antes de cada ensaio de EC, os eletrodos foram imersos em H₂SO₄ (15% v v⁻¹) por 10 min, e lavados com água deionizada com o objetivo de remover resíduos e/ou camada de óxidos. Em seguida, os eletrodos foram conectados em paralelo por meio de um parafuso não condutor e posicionado verticalmente no reator. A reação eletroquímica ocorreu por meio da aplicação de corrente contínua utilizando fonte de alimentação 32V (marca Hikari, modelo HF-3205). Após o tempo de eletrólise, a fonte de alimentação foi desligada e o efluente permaneceu em repouso por 15 min. Em seguida, o efluente tratado (fase líquida) foi coletado por meio de uma válvula de saída localizada à 5 cm do fundo, na lateral inferior do reator. Posteriormente, a biomassa de microalgas foi coletada por meio de raspagem manual.

Após cada batelada experimental, a fase líquida foi caracterizada em termos de DQO (total e solúvel), SSV, SST (APHA, 2012), além da determinação da densidade ótica (DO) via espectrofotômetro (HACH, DR3900). Após separação, a eficiência de colheita foi determinada, por meio dos parâmetros SST e DO da fração líquida. Também foram monitorados os parâmetros pH, CE, temperatura e oxigênio dissolvido por meio da sonda multiparamétrica In-Situ (modelo Aqua troll 500). Adicionalmente, o potencial zeta foi determinado utilizando a metodologia adaptada de PANDEY et al., (2019) por meio do equipamento Zetasizer Z90 (marca Malvern). Ao final de cada experimento de EC, a biomassa de microalgas foi coletada, armazenada, congelada e, por fim, liofilizada.

O teor de Al na fase líquida e na biomassa de microalgas foi determinado por espectroscopia de absorção atômica. Antes da análise, a biomassa liofilizada foi moída e submetida à digestão com 10 mL de uma solução de ácido nítrico e ácido perclórico (4:1) em chapa aquecida a 200 °C, até a obtenção de um extrato cristalino. Em seguida, o Al foi quantificado utilizando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica com lâmpadas monoelementares e multielementares (Agilent, modelo 240FS).

8.1.4. Otimização estatística da EFC

Os parâmetros operacionais para a colheita de microalgas por EC foram otimizados utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR), empregando um delineamento composto central rotacional (DCCR). O

planejamento experimental e a análise dos dados foram conduzidos no software Minitab®. A seleção dos fatores e seus níveis experimentais foi baseada em referências da literatura e com base nos resultados apresentados no capítulo anterior (Capítulo IV).

Os parâmetros escolhidos para otimização foram o pH, a densidade de corrente (DC) e o tempo de eletrólise (TE). As faixas de valores para DC ($A\ m^{-2}$) e TE (min) foram determinadas a partir de estudos prévios sobre EC aplicada ao tratamento de águas residuárias e à colheita de biomassa microalgal. Já os níveis de pH foram definidos com base no intervalo alcançado ao final do cultivo das microalgas (entre 8 e 9). A Tabela 8.2 apresenta as variáveis independentes investigadas e suas respectivas faixas de variação.

Tabela 8.2. Delineamento rotacional composto central usado para avaliar a eletrocoagulação da biomassa de microalgas.

| Fator | Nível | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------------------|
| | $-\alpha$ (-1,68) | -1 | 0 | +1 | $+\alpha$ (+1,68) |
| pH | 6,32 | 7,00 | 8,00 | 9,00 | 9,68 |
| Densidade de corrente (A/m^2) | 6,59 | 10,00 | 15,00 | 20,00 | 23,41 |
| Tempo de eletrólise (min) | 23,18 | 30,00 | 40,00 | 50,00 | 56,82 |

O número de ensaios (N_e) experimentais foi definido com base na equação 8.1:

$$N_e = 2^k + 2k + n_c \quad \text{Equação 8.1}$$

Em que: k representa o número de variáveis independentes, n_c corresponde ao número de repetições no ponto central e N_e o número de ensaios.

Para este estudo, considerando $k=3$, foram realizadas 8 repetições no ponto central, 6 pontos fatoriais e 6 pontos axiais, totalizando 20 ensaios experimentais. O valor do parâmetro alfa (α), correspondente à distância axial ou raio da região experimental, foi calculado pela fórmula $(2^k)^{\frac{1}{4}}$ e fixado em 1,68, garantindo a ortogonalidade rotacional do delineamento.

As variáveis resposta analisadas incluíram a eficiência de colheita em termos de sólidos suspensos totais (SST) e densidade óptica (DO), a eficiência de remoção da demanda química de oxigênio total (DQOt) e o teor de alumínio na fase líquida e na biomassa colhida. A escolha dessas variáveis foi baseada na literatura e na abordagem adotada no capítulo anterior. A inclusão tanto do SST quanto da DO se justifica pelo fato de serem medidas complementares da presença de sólidos, permitindo uma análise mais robusta do processo.

Após as rodadas experimentais e obtenção dos resultados, a análise dos dados foi conduzida por meio de abordagens estatísticas conforme descrito por OLIVEIRA, (2022). Inicialmente, foi realizada uma análise de correlação que consistiu na investigação das relações lineares das variáveis respostas consideradas no estudo (Eficiência de remoção em termos de DO (%); Eficiência de remoção em termos de SST (%); Eficiência de remoção em termos de DQO (%); Concentração de Alumínio na fase líquida (mg L^{-1}); Teor de Alumínio da Biomassa colhida (%)). Essas variáveis representam os objetivos da otimização pretendida a partir das variáveis de controle. Dessa forma, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Esse procedimento permitiu a construção de uma matriz de correlação, possibilitando a identificação de associações estatisticamente significativas entre os parâmetros analisados. Dessa forma, correlações fortes foram classificadas com coeficientes abaixo de - 0,7 ou acima de 0,7; moderadas entre - 0,7 e - 0,5 ou entre 0,5 e 0,7; fracas entre - 0,5 e - 0,3 ou entre 0,3 e 0,5; e negligenciáveis entre - 0,3 e 0,3 (ANZG, 2018).

Adicionalmente, foi realizada a análise fatorial multivariada com o intuito de reduzir a complexidade dos dados, agrupando observações semelhantes e extraíndo fatores latentes que explicassem a variabilidade observada. O método de rotação Varimax foi utilizado para simplificar a interpretação das relações entre as variáveis e os fatores extraídos. Em seguida, foi realizada uma análise da similaridade entre as variáveis originais e os fatores rotacionados, usando a técnica de agrupamento hierárquico de Ward, com base na correlação absoluta. Isso ajuda a identificar padrões de similaridade entre as variáveis e os fatores de forma mais clara e objetiva.

Em seguida, foram calculados os escores dos fatores rotacionados para determinação das equações de regressão para cada fator criado. Os valores desejados para cada fator são ajustados individualmente, otimizando cada um deles com o uso do algoritmo Gradiente Reduzido Generalizado (GRG). Esse processo foi realizado utilizando a ferramenta Solver do Excel®, de forma a maximizar a função objetivo, sujeita à restrição apresentada na Equação 8.2:

$$x^T x \leq \alpha^2 \quad \text{Equação 8.2}$$

Em que $x^T x$ é a soma dos quadrados dos elementos e α (alfa) é a distância axial ou raio da região experimental.

Após a obtenção dos valores de cada variável codificada, calculou-se as variáveis decodificadas por meio da equação 8.3:

$$V_{\text{decod}} = V_{\text{central}} + V_{\text{codi}} * \left(\frac{V_{\text{máx}} - V_{\text{mín}}}{2} \right) \quad \text{Equação 8.3}$$

Em que V_{decod} é a variável decodificada; V_{central} é o valor central da variável; V_{cod} é o valor da variável codificada; $V_{\text{máx}}$ é o valor máximo da variável; $V_{\text{mín}}$ é o valor mínimo da variável.

8.1.5. Avaliação do ciclo de vida (ACV)

Para avaliar o desempenho ambiental do processo de EC, os potenciais impactos ambientais foram quantificados por meio de ACV conduzida seguindo as normas da Organização Internacional para Padronização (ISO) para "Gestão Ambiental - Avaliação do Ciclo de Vida", ISO 14040 - Princípios e Estrutura e ISO 14044 - Requisitos e Diretrizes (ISO, 2006a, 2006b). A análise incluiu as seguintes etapas: definição de objetivo e escopo, unidade funcional (UF), descrição e limites do sistema, inventário do ciclo de vida (ICV), avaliação de impacto e interpretação.

O objetivo foi investigar os potenciais impactos ambientais de um sistema de EC para colheita de microalgas cultivadas em águas residuárias. Para a comparação dos cenários, adotou-se a UF de 1 g de biomassa colhida, considerando somente a etapa de colheita de microalgas (Figura 8.4). O escopo deste estudo incluiu a abordagem *gate to gate*, considerando dados experimentais, material e entradas de energia, e emissões de $\text{Al}(\text{OH})_3$ para a água associadas à UF.

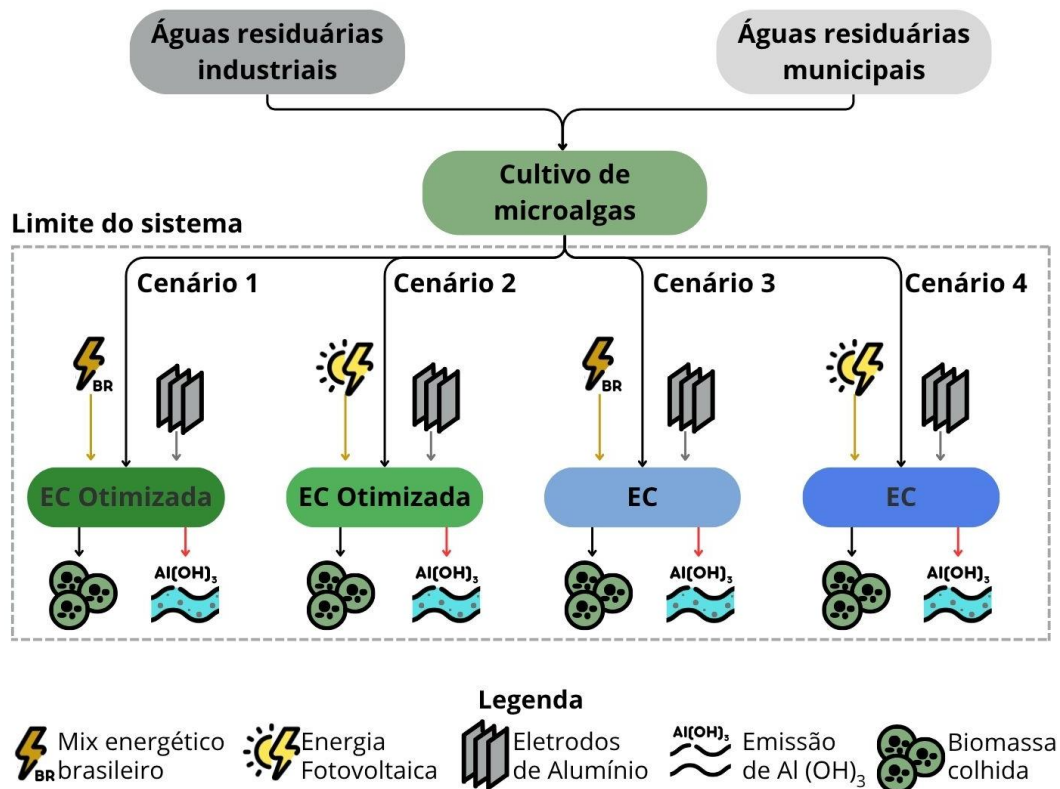


Figura 8.4. Limite do sistema da avaliação do ciclo de vida.

Adicionalmente, considerou-se a matriz energética brasileira, com base no trabalho de FERREIRA et al., (2024). A ACV não incorporou os potenciais impactos ambientais relacionados ao transporte de materiais e insumos, bem como à implementação de infraestrutura e equipamentos necessários à operação e ao fim de sua vida útil.

O software SimaPro® (PRé Sustainability® BV, Holanda, versão 9.4.0.2) e o banco de dados Ecoinvent v.3.8. ReCiPe 2016 versão 1.7, foram utilizados para avaliar os impactos do ciclo de vida por meio do método *midpoint* (H) e *endpoint* (H). A nível de *midpoint* foram avaliadas as seguintes categorias de impacto: aquecimento global, acidificação terrestre; eutrofização (água doce e marinha); ecotoxicidade (terrestre, água doce e marinha); toxicidade humana carcinogênica; escassez de recursos fósseis e consumo de água. A nível de *endpoint* danos ambientais foram quantificados para Recursos Naturais, Saúde Humana e Qualidade do Ecossistema. Estas categorias foram observadas em pesquisas relacionadas à colheita de microalgas (COLLOTTA et al., 2017;

FERREIRA et al., 2020; LEOVAC MACÉRAK et al., 2024; SCHNEIDER et al., 2018).

8.2. Resultados e discussão

8.2.1. Análise preliminar dos dados experimentais

A colheita de microalgas a partir da tecnologia de eletrocoagulação (EC) foi otimizada para as seguintes variáveis empregando um projeto estatístico CCD: pH, densidade de corrente (DC, A/m^2) e tempo de eletrolise (TE, min). Na Tabela 8.3 são apresentadas a caracterização inicial da biomassa de microalgas, bem como as propriedades da água residual do processo de EC e a biomassa colhida após cada rodada experimental. Na Tabela 8.4 são apresentados os resultados das análises de regressão para as variáveis respostas DO, SST, DQO_t , Al_{Liq} e Al_{Bio} , incluindo os respectivos coeficientes de determinação e os valores de p. Na Figura 8.5 são apresentados os gráficos de contorno para cada uma das regressões.

Tabela 8.3. Resultados da eletrocoagulação para colheita de microalgas em função dos parâmetros operacionais avaliados.

| Tratamentos | Variáveis de entrada | | | | Variáveis resposta | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------------|------------------------|-----------|------------------------|----------------------------|---|--|--|-----------------------------|-------------------------|------------|------------|-----------|---------------|------|------|------|
| | pH | DC A/m ² | TE min | DO - Remoção (%) | SST mg/L Remoção (%) | DQO _t mg/L Remoção (%) | Al _{Liq} mg/L Remoção (%) | Al _{Bio} mg/L Remoção (%) | Cond mS cm ⁻¹ | P _{zeta} mv | Temp °C | OD mg/L | Volt V | pH final - | | | |
| Biomassa | - | - | - | 1,21 | - | 371,67 | - | 674,05 | - | - | - | 1,36 | -18,96 | 21,87 | 2,46 | - | 9,45 |
| 1 | 8,0 | 6,59 | 40,0 | 0,64 | 47,29 | 270,00 | 27,03 | 246,25 | 50,65 | 14,36 | 9,84 | 1,32 | -18,67 | 22,27 | 3,40 | 0,00 | 8,42 |
| 2 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,25 | 79,16 | 156,67 | 57,66 | 244,17 | 51,07 | 10,99 | 12,56 | 1,30 | -16,10 | 22,23 | 2,76 | 4,88 | 8,83 |
| 3 | 9,0 | 20,00 | 30,0 | 0,45 | 62,69 | 227,50 | 32,43 | 206,67 | 62,17 | 32,30 | 15,75 | 1,29 | -18,50 | 22,13 | 2,48 | 7,22 | 8,95 |
| 4 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,16 | 86,58 | 130,00 | 61,39 | 146,25 | 73,23 | 23,51 | 12,11 | 1,35 | -13,30 | 24,01 | 1,68 | 5,38 | 9,17 |
| 5 | 7,0 | 20,00 | 30,0 | 0,15 | 87,56 | 151,50 | 59,05 | 116,50 | 76,65 | 26,25 | 14,63 | 1,38 | -13,40 | 22,18 | 2,85 | 6,02 | 9,04 |
| 6 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,24 | 79,99 | 132,50 | 60,64 | 150,42 | 72,46 | 10,26 | 11,35 | 1,27 | -16,63 | 23,87 | 1,91 | 4,96 | 8,96 |
| 7 | 9,68 | 15,00 | 40,0 | 0,55 | 54,95 | 211,67 | 37,13 | 281,67 | 48,44 | 34,05 | 15,48 | 1,20 | -19,07 | 23,45 | 1,89 | 5,92 | 9,38 |
| 8 | 9,0 | 20,00 | 50,0 | 0,29 | 75,79 | 164,44 | 60,13 | 245,25 | 75,46 | 26,39 | 15,08 | 1,29 | -14,47 | 22,30 | 2,50 | 0,00 | 9,32 |
| 9 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,27 | 77,93 | 148,13 | 64,09 | 191,08 | 80,88 | 9,67 | 11,80 | 1,31 | -15,77 | 23,35 | 1,58 | 5,19 | 8,80 |
| 10 | 8,0 | 15,00 | 56,82 | 0,23 | 80,81 | 159,17 | 61,41 | 272,75 | 72,71 | 24,54 | 15,40 | 1,39 | -15,03 | 21,58 | 1,47 | 5,31 | 9,19 |
| 11 | 8,0 | 15,00 | 23,1 | 0,49 | 59,89 | 174,38 | 57,73 | 272,75 | 72,71 | 10,01 | 10,77 | 1,33 | -17,90 | 22,29 | 1,66 | 5,19 | 8,71 |
| 12 | 6,32 | 15,00 | 40,0 | 0,02 | 98,60 | 32,56 | 91,14 | 172,75 | 73,48 | 0,63 | 13,64 | 1,67 | -12,50 | 23,23 | 1,43 | 4,42 | 7,13 |
| 13 | 7,0 | 10,00 | 50,0 | 0,13 | 89,62 | 84,17 | 75,00 | 105,25 | 80,73 | 5,79 | 11,99 | 1,50 | -15,07 | 23,88 | 1,88 | 0,00 | 8,46 |
| 14 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,21 | 82,46 | 115,71 | 68,51 | 105,25 | 83,84 | 17,91 | 13,89 | 1,34 | -16,50 | 26,02 | 1,65 | 4,84 | 8,62 |
| 15 | 9,0 | 10,00 | 30,0 | 0,70 | 42,19 | 285,00 | 22,45 | 383,58 | 41,12 | 9,60 | 8,48 | 1,35 | -18,60 | 22,66 | 1,55 | 3,80 | 8,99 |
| 16 | 8,0 | 15,00 | 40,0 | 0,23 | 81,14 | 133,57 | 63,65 | 129,00 | 80,20 | 15,89 | 12,70 | 1,36 | -19,33 | 22,29 | 1,19 | 4,84 | 9,08 |
| 17 | 7,0 | 20,00 | 50,0 | 0,12 | 89,79 | 135,33 | 67,19 | 129,42 | 87,05 | 12,77 | 16,17 | 1,35 | -13,37 | 21,87 | 1,55 | 6,12 | 9,00 |
| 18 | 9,0 | 10,00 | 50,0 | 0,39 | 67,96 | 232,50 | 36,73 | 227,75 | 65,04 | 31,22 | 15,53 | 1,34 | -19,67 | 22,90 | 1,74 | 3,55 | 9,22 |
| 19 | 8,0 | 23,41 | 40,0 | 0,24 | 80,07 | 246,67 | 32,88 | 130,25 | 80,01 | 30,58 | 10,27 | 1,38 | -15,10 | 23,33 | 1,59 | 6,83 | 9,20 |
| 20 | 7,0 | 10,00 | 30,0 | 0,30 | 75,29 | 160,63 | 61,06 | 205,25 | 79,46 | 1,55 | 8,52 | 1,32 | -11,77 | 23,79 | 2,23 | 3,72 | 7,45 |

Nota: DC = Densidade de correntes; TE= Tempo de Eletrólise; DO = Densidade ótica; SST = Sólidos Suspensos Totais; DQO_t = Demanda Química de Oxigênio total; Al_{Liq} = Alumínio presente na fase líquida; Al_{Bio} = Alumínio presente na biomassa; Cond = Condutividade; P_{zeta} = Potencial Zeta; Temp = Temperatura; OD = Oxigênio Dissolvido; Volt = Voltagem.

Tabela 8.4. Equações de regressão para as variáveis respostas.

| Equação | R ² | p-valor ₁ |
|---|----------------|----------------------|
| DO (%) = 89,80 -23,39 pH +10,16 DC +1,66 TE -0,2093 DC ² -0,00287 TE ² +0,279 pH.TE* -0,0620 DC.TE* | 94,68% | <0,001 |
| SST (%) = 180,5 - 30,94 pH +5,41 DC +0,515 TE -0,4519 DC ² +1,080 pH.DC | 93,61% | <0,001 |
| DQOt (%) =123,4 - 8,95 pH +1,235 DC | 49,81% | 0,003 |
| Al _{Liq} (mg/L) = -20,7 -4,47 pH +2,77 DC -0,57 TE* + 0,0959 DC ² * +0,312 pH.TE* - 0,1131 DC.TE | 83,37% | <0,001 |
| Al _{Bio} (%) =34.1 -13,46 pH* +2,093 DC+ 0,503 TE +0,871 pH ² -0,0289 DC ² * -0,0242 DC.TE | 76,03% | 0,002 |

Nota: DO = Densidade ótica; SST = Sólidos Suspensos Totais; DQO_t = Demanda Química de Oxigênio total; Al_{Liq} = Concentração de alumínio na água residual do processo de EC; Al_{Bio} = Teor de Alumínio na biomassa colhida; DC = Densidade de corrente elétrica; TE = tempo de eletrólise.

¹ p-valor da ANOVA para cada equação.

* Termos da equação com p-valor > 0,05.

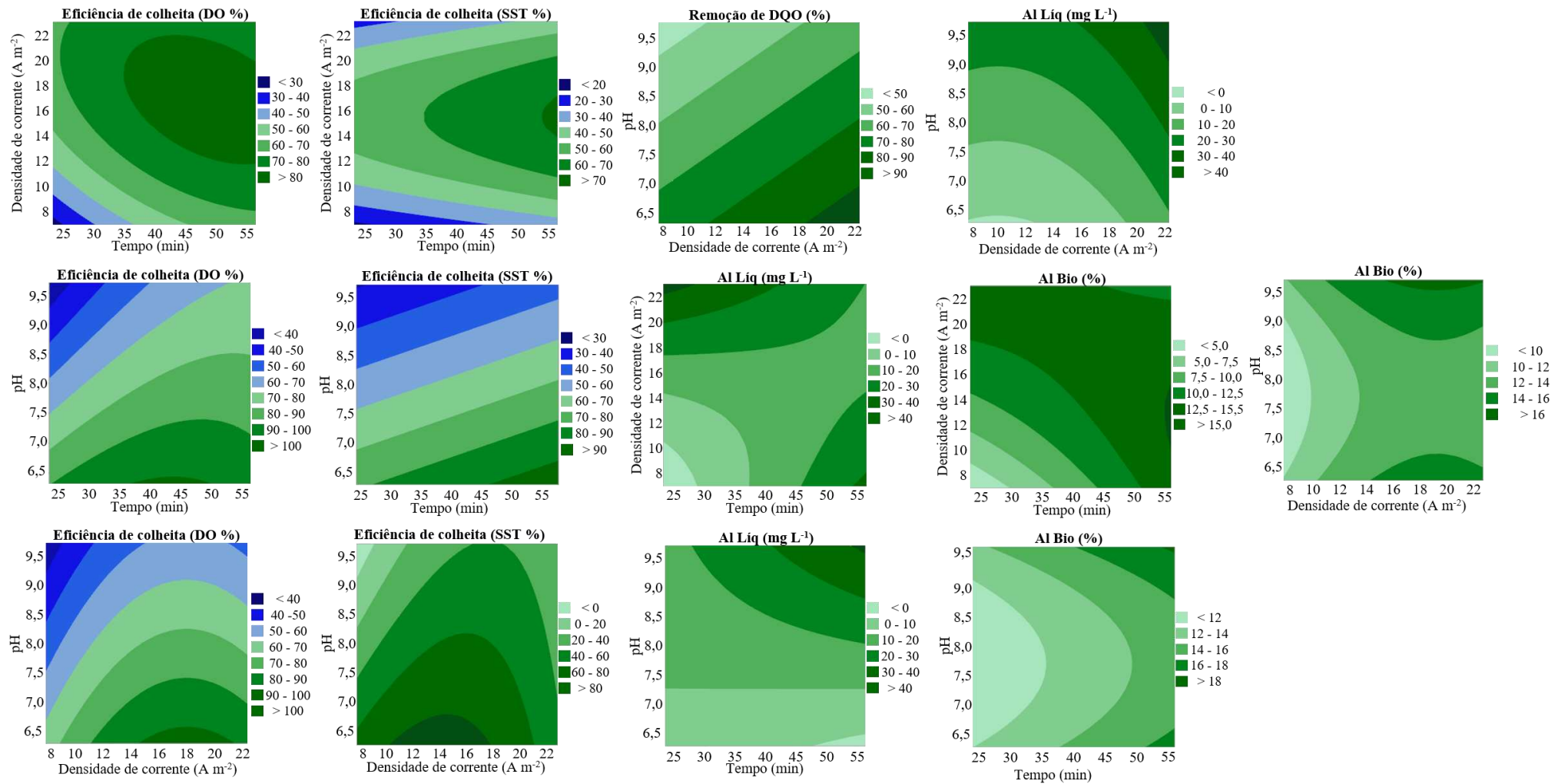


Figura 8.5. Gráfico de contorno das variáveis de resposta eficiência de colheita (DO e SST), remoção de DQO, teor de alumínio na fase líquida (Al_{Liq}) e na biomassa (Al_{Bio}) em função de diferentes parâmetros de operação.

8.2.2. Eficiência de colheita e remoção de matéria orgânica

Os resultados das equações de regressão demonstram como as variáveis de resposta foram influenciadas pela densidade de corrente elétrica (DC), pelo tempo de eletrólise (TE) e pelo pH. Entretanto, os resultados evidenciam a influência negativa do pH na solubilização do alumínio e, conseqüentemente, na eficiência da EC, refletida pelos coeficientes negativos observados nas equações de DO, SST e DQO.

A equação de eficiência de colheita, baseada na densidade óptica (DO, %), apresentou um alto coeficiente de determinação ($R^2 = 94,68\%$) indicando uma boa explicação da variação dos dados, com valores de eficiência de colheita oscilando entre 22,45% e 91,14 %. A remoção de sólidos suspensos totais (SST, %) também foi bem modelada ($R^2 = 93,61\%$), sendo reduzida pelo pH e favorecida pelo aumento da DC e do TE, com valores oscilando entre 42,19% e 98,60 %. Comparando com outras tecnologias de colheita, FERREIRA et al., (2020) observaram eficiência de colheita de 87,00 % durante a sedimentação gravitacional e 99,58 % acoplado o reator de biofilme seguido de sedimentação gravitacional.

Esses resultados são consistentes com os observados por Pratama e Hadiyanto (2024), que avaliaram diferentes eletrodos durante a EC em pequena escala (0,5 L, 30 min, sem controle de corrente, e área imersa de 65,6 cm²). O Al teve 97,34 % de eficiência, ficando atrás apenas do Mg (98,70 %), com base na densidade óptica.

A demanda química de oxigênio total (DQOt, %), relacionada à remoção de matéria orgânica, teve menor ajuste ($R^2 = 49,81\%$), sugerindo a influência de fatores não contemplados no modelo. O aumento do pH reduziu a eficiência da remoção, enquanto a DC teve efeito positivo, sem impacto significativo do TE, com valores variando de 41,12% a 87,05%. A remoção de matéria orgânica é um dos principais focos de estudos que utilizam a EC como tecnologia de tratamento, sendo aplicada em diversos tipos de águas residuárias, sendo também importante no contexto do presente trabalho (AL-QODAH et al., 2024; ASEFAW et al., 2024; COIMBRA et al., 2021; FARHAN ABBASS; AMOOEY; YASIR ALJABERI, 2024).

Nesse sentido, a eficiência máxima de 98,75 %, relatada por ASEFAW et al., (2024) com EC e eletrodos de Al em efluentes de café, foi alcançada a pH 7,

onde as condições favoreceram a formação de flocos de hidróxido. COIMBRA et al., (2021) também destacaram o impacto do pH na aplicação de EC em filtrados de branqueamento de polpa kraft, observando que um aumento de uma unidade no pH exigiu um aumento de 15 vezes na densidade de corrente para atingir 50% de biodegradabilidade (DBO_5/DQO) da matéria orgânica dissolvida. DEVLIN et al., (2019) avaliaram a EC no tratamento de águas residuárias municipais, obtendo remoção de DQO de 68% com eletrodos de Al, 30–40% com Fe e 27% com Mg. Entretanto, quando comparada com o sulfato de alumínio, a remoção de DQO foi semelhante à do processo de EC não otimizado, sugerindo que este pode atingir resultados comparáveis à adição de sal metálico (DEVLIN et al., 2019). Isso reforça a necessidade de otimizar o processo para melhorar a eficiência técnica e econômica em comparação às técnicas convencionais, tanto no tratamento de águas residuárias, quanto na colheita de microalgas.

8.2.3. Concentração de Alumínio na biomassa e na água residual

Para que o processo de EC seja aplicado como tecnologia de colheita de microalgas é necessário que a concentração de metais seja o mais baixa possível, principalmente devido aos efeitos tanto no meio ambiente, quanto na saúde humana. Conforme apresentado na Tabela 8.4 e em concordância com a Lei de Faraday, a concentração de Al na biomassa de microalgas e na água aumentou com o tempo de eletrólise e a densidade de corrente.

Na análise de regressão, os coeficientes dessas variáveis (TE e DC) apresentaram valores positivos, indicando que ambas influenciam diretamente o acúmulo de Al tanto na biomassa quanto na água residual. Esse comportamento era esperado, alinhando com as hipóteses estabelecidas. A configuração das placas e hidrodinâmica do reator, bem como as características das microalgas e do meio, como a temperatura, pH e salinidade, também podem impactar no desempenho (VISIGALLI et al., 2021). Adicionalmente, a liberação de hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) durante a EC pode contribuir para passivação do eletrodo, reduzindo a eficiência do processo (KHATIB et al., 2021). A passivação do eletrodo é um processo químico onde forma-se uma camada de óxido na superfície do eletrodo, tornando-o menos reativo.

Na literatura recente, diversos trabalhos relatam diferentes teores de metais na biomassa e na água residual do processo. O estudo realizado por FAYAD et al., (2017) avaliou o comportamento de diferentes densidades de

corrente (4,80 e 6,70 mA cm⁻²) no acúmulo de Al ao longo do tempo. Os autores observaram concentrações de Al entre 0,5 e 3,0 mg/L na água residual e de 0,9 a 2,0% na biomassa, identificando o tempo de operação e a densidade de corrente como os principais fatores que influenciam esse acúmulo. KHATIB et al., (2021) também avaliaram o desempenho da EC utilizando hastes cilíndricas e placas paralelas, além de avaliar diferentes densidades de corrente (20, 30, 40 e 50 mA cm⁻²). A contaminação de Al foi superior na operação com hastes cilíndricas para todas as densidades de corrente avaliadas. Os autores também observaram que à medida que a densidade de corrente aumentou de 40 para 50 mA cm⁻², o teor de alumínio nas algas diminuiu de 17,02 para 15,48 mg/g, devido a passivação do eletrodo.

Existem alternativas e configurações dos reatores e eletrodos que podem minimizar a contaminação de metais. O módulo composto por eletrodos concêntricos assimétricos avaliado por HAWARI et al., (2020) conseguiu reduzir em 52% o teor de Al, operando a 7,1 mA cm⁻² e 30 min de reação, em comparação com os eletrodos cilíndricos concêntricos simétricos. Adicionalmente, a presença de Al na biomassa colhida pode comprometer sua aplicação, pois adiciona massa e volume de resíduos indesejados, exigindo remoção e possível reciclagem. LANDELS et al., (2019) demonstraram que o tratamento com EC, seguido de lavagem com tampão para remoção de Al não influenciou significativamente os níveis de lipídios, mas a ausência de lavagem reduziu os níveis de FAME. Os autores também investigaram a aplicação da biomassa colhida na produção de biocombustíveis via liquefação hidrotérmica (HTL). Entretanto, os autores notaram uma redução de temperatura, possivelmente devido à decomposição endotérmica do Al(OH)₃, e uma leve diminuição na produção de bio-óleo, com aumento na produção da fase gasosa, sugerindo que a presença de Al favorece a formação de CO₂.

Portanto, é essencial otimizar a EC para minimizar a liberação de Al, bem como desenvolver tecnologias para melhorar a sua recuperação. Isso minimiza impactos ambientais e evita efeitos tóxicos na biomassa e suas aplicações, além de tornando o processo mais sustentável e econômico.

8.2.4. Condutividade elétrica, potencial zeta

Na Figura 8.6 apresenta-se os valores da condutividade elétrica e potencial zeta mensurados após cada rodada experimental. A condutividade

elétrica do efluente influencia a eficiência da EC, podendo reduzir o consumo de energia quando é elevada (GAO et al., 2010; KRISHNAMOORTHY et al., 2021; PATEL et al., 2025). No presente estudo, a condutividade elétrica inicial do meio de cultivo foi de $1,36 \text{ mS cm}^{-2}$. À medida que se reduziu o pH inicial, foi observado um aumento dos valores de condutividade, indicando a dissolução de sais metálicos no meio de cultivo e, conseqüentemente, aumentando a eficiência do processo de EC.

LUCAKOVA et al., (2022) relataram valores entre $0,23$ e $0,43 \text{ mS cm}^{-1}$ em meios sintéticos, enquanto cultivos de microalgas marinhas em meio salino atingem cerca de $62,53 \text{ mS cm}^{-1}$ (KHATIB et al., 2021).

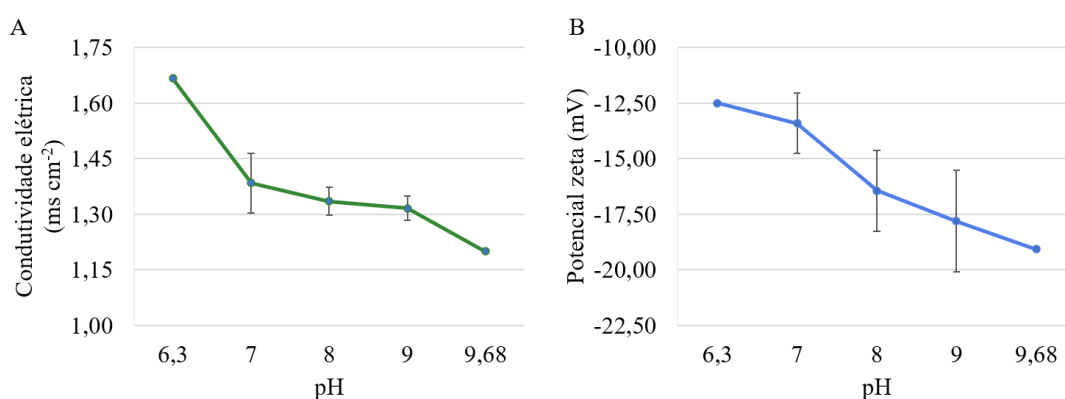


Figura 8.6. Potencial zeta e condutividade após os ensaios de EC, em diferentes valores de pH.

A variação do pH também influenciou o potencial zeta das células de microalgas. Em pH entre 6 e 7, observou-se uma redução nesse parâmetro, indicando a diminuição da carga negativa das células. Isso pode favorecer a agregação celular e a formação de flocos pela neutralização das cargas superficiais. FAYAD et al., (2017) observaram que o valor, em módulo, do potencial zeta é maior em pH mais elevado e diminui com a redução do pH.

Os valores do potencial zeta variaram entre $-11,77$ a $-19,67 \text{ mV}$ para as diferentes configurações experimentais avaliadas, sendo que a biomassa inicial apresentou valores iguais a $-18,96 \text{ mV}$. O potencial zeta é um parâmetro que indica a estabilidade de dispersões coloidais, medindo a repulsão eletrostática entre partículas de mesma carga, sendo definido como a diferença de potencial entre a superfície da partícula e a solução em massa (FAYAD et al., 2017). Dessa

forma, células de microalgas com potencial zeta acima de +30 mV ou abaixo de -30 mV são altamente estáveis, enquanto valores baixos de potencial zeta (próximos a zero) geram instabilidade e favorecem a aglutinação das células (KRISHNAMOORTHY et al., 2021; VISIGALLI et al., 2021).

8.2.5. Modelos de otimização e superfície resposta

A matriz de correlação de Pearson (Tabela 8.5) indica a força e a direção das relações entre as interações analisadas. Valores positivos indicam correlação direta, enquanto valores negativos indicam correlação inversa.

Tabela 8.5. Matriz de correlação de Pearson pareadas.

| | DO (%) | SST (%) | DQOt (%) | Al Líq (mg/L) |
|---------------|---------|---------|----------|---------------|
| SST (%) | 0,841 | | | |
| DQOt (%) | 0,769 | 0,676 | | |
| Al Líq (mg/L) | -0,202* | -0,519 | -0,155* | |
| Al Bio (%) | 0,317* | 0,204* | 0,168* | 0,558 |

*Correlações com p-valor > 0.05.

Os resultados da matriz de correlação mostram como as diferentes variáveis relacionadas à eficiência de remoção se relacionam entre si. A forte correlação positiva entre a eficiência de remoção de DO e a eficiência de remoção de SST (0,841) indica que a remoção da biomassa contribui significante para a SST. Da mesma forma, a eficiência de remoção de DO também está correlacionada com a eficiência de remoção de DQO (0,769), demonstrando que a biomassa pode estar contribuindo para a carga orgânica do meio e que sua remoção favorece a redução da DQO. Além disso, a relação positiva entre a eficiência de remoção de SST e DQO (0,676) reforça essa ideia, sugerindo que a remoção de sólidos também auxilia na remoção de matéria orgânica.

Por outro lado, a concentração de Al na fase líquida apresenta uma correlação negativa com a eficiência de remoção de SST (-0,519), indicando que, à medida que a concentração de Al aumenta, a eficiência de remoção de SST tende a diminuir. Além disso, verificou-se correlações negativas, embora mais fracas, entre a concentração de Al na fase líquida e, as eficiências de remoção de DO (-0,202) e DQO (-0,155). Isso sugere que o Al dissolvido pode ter um leve impacto negativo na remoção da biomassa e da carga orgânica. Por fim, a

correlação positiva entre o teor de Al na biomassa colhida e a concentração de Al na fase líquida (0,558), pode indicar que parte do Al dissolvido no meio pode estar sendo adsorvido ou incorporado pela biomassa. Esse comportamento era esperado, pois reflete a liberação de Al presente no eletrodo, durante o processo de EC. Os resultados da análise fatorial rotacionada são apresentados na Tabela 8.6.

Tabela 8.6. Cargas fatoriais rotacionadas e itens comuns rotação Varimax.

| Variável | Fator 1 | Fator 2 | Fator Comum |
|-----------------|----------------|----------------|--------------------|
| DO (%) | 0,938 | 0,156 | 0,903 |
| SST (%) | 0,945 | -0,113 | 0,906 |
| DQOt (%) | 0,853 | 0,102 | 0,738 |
| Al Líq (mg/L) | -0,395 | 0,864 | 0,902 |
| Al Bio (%) | 0,241 | 0,892 | 0,854 |
| % Var | 0,543 | 0,318 | 0,861 |

Os resultados indicam dois fatores principais que explicam 86,10% da variância total dos dados. O fator 1 foi melhor representado pelas variáveis DO (%), SST (%) e DQOt (%), indicando que essas variáveis estão fortemente relacionadas entre si. Além disso, o fator 1 foi responsável por 54,30 % da variação total dos dados. Essas variáveis estão interligadas no processo de tratamento, uma vez que a remoção da biomassa está diretamente associada à redução de SST e matéria orgânica, e conseqüentemente, da DO. Enquanto isso, o fator 2 foi melhor representado pelas variáveis Al_{Líq} e Al_{Bio}, sendo responsável por 31,80 % da variação total dos dados. Isso pode ser um indicativo de que a presença do Al na fase líquida e sua incorporação na biomassa são aspectos secundários, mas ainda relevantes.

Adicionalmente, a coluna "Comum" indica a proporção da variância de cada variável explicada pelos fatores extraídos na análise fatorial. Dessa forma, a comunalidade reflete o quanto uma variável é representada pelos fatores comuns, sendo uma medida fundamental para entender a estrutura subjacente dos dados. Os valores elevados de comunalidade indicam que a maior parte da variância da variável foi explicada pelos fatores identificados, reforçando a adequação do modelo fatorial.

Na Figura 8.7 é apresentado o Dendrograma de ligação de Ward com o resultado da análise de agrupamento hierárquico, mostrando a similaridade entre variáveis com base na distância do coeficiente de correlação.

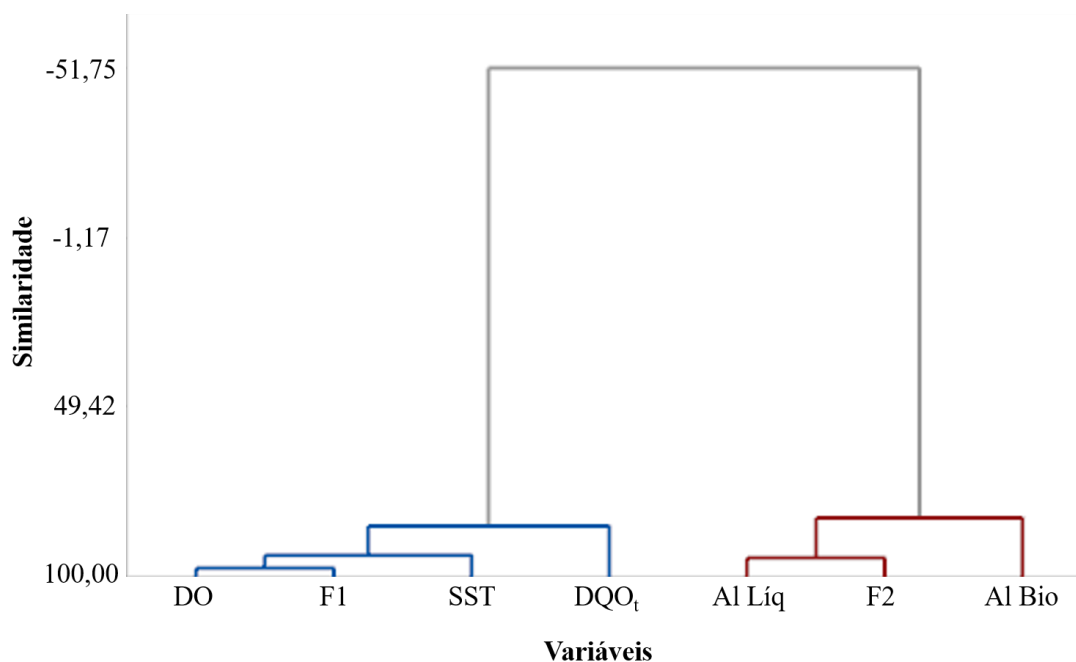


Figura 8.7. Dendrograma de ligação de Ward.

O dendrograma indica que as variáveis podem ser agrupadas em dois conjuntos principais, cada um com características semelhantes. O Grupo 1 é composto por DO (%), SST (%), DQOt (%) e F1, enquanto o Grupo 2 inclui Al Líq (mg/L), Al Bio (%) e F2. Além disso, a grande diferença entre os grupos é evidenciada pela altura da junção, sugerindo uma baixa similaridade entre os grupos.

A partir dos resultados observados na análise fatorial e na análise de cluster, optou-se por estabelecer uma regressão de F1 em função das variáveis de controle iniciais, representando de forma integrada as condições de otimização para as variáveis DO (%), SST (%) e DQOt (%). De forma semelhante, foi realizada uma regressão de F2 em função das mesmas variáveis de controle, representando as condições de otimização para o Al na biomassa e o Al na água residual.

A Equação 8.4 e Equação 8.5 representam respectivamente as equações de regressão do fator 1 (F1) e fator 2 (F2), em unidades não codificadas, e na Tabela 8.7 são apresentados os respectivos coeficientes de determinação. No

Apêndice IV, é possível observar os resultados da análise de variância de F1 e F2.

$$F1 = 0,376 - 0,853 \text{ pH} + 0,373 \text{ DC} + 0,394 \text{ TE} - 0,0438 \text{ pH}^2 - 0,4526 \text{ CE}^2 - 0,0548 \text{ TE}^2 + 0,233 \text{ pH} \cdot \text{DC} + 0,169 \text{ pH} \cdot \text{TE} - 0,063 \text{ DC} \cdot \text{TE} \quad \text{Equação 8.4}$$

$$F2 = -0,237 + 0,520 \text{ pH} + 0,637 \text{ CE} + 0,457 \text{ tempo} + 0,226 \text{ pH}^2 + 0,005 \text{ DC}^2 + 0,116 \text{ TE}^2 - 0,197 \text{ pH} \cdot \text{DC} + 0,215 \text{ pH} \cdot \text{TE} - 0,595 \text{ DC} \cdot \text{TE} \quad \text{Equação 8.5}$$

Tabela 8.7. Coeficientes de determinação dos modelos de fator 1 (F1) e do fator 2 (F2).

| Equação | Soma de Quadrados do Modelo (SQ) | R ² | R ² (ajustado) | f - Valor | p - Valor |
|---------|----------------------------------|----------------|---------------------------|-----------|-----------|
| F1 | 17,6126 | 92,70% | 86,13% | 14,11 | 0,000 |
| F2 | 16,4781 | 86,73% | 74,78% | 7,26 | 0,002 |

A análise de variância (ANOVA) realizada para o fator 1 confirmou que o modelo ajustado é estatisticamente significativo (p-valor = 0,000). O valor de F elevado e o p-valor menor que 0,001 indicam que pelo menos uma das variáveis independentes (pH, DC e TE) influencia significativamente a variável resposta F1. Dentre os fatores analisados, o pH apresentou o maior impacto, com um coeficiente negativo na equação de regressão. Isso significa que o aumento do pH resulta em uma redução de F1. Já a DC e o TE apresentaram coeficientes positivos, indicando que o aumento dessas variáveis está associado ao crescimento de F1. Em relação aos termos quadráticos, apenas o efeito quadrático da DC foi estatisticamente significativo, sugerindo que a relação entre CE e F1 não é linear. Esse resultado pode indicar a existência de um ponto ótimo de DC, no qual a maximização de F1 ocorre, seguido por uma possível redução caso a variável continue aumentando.

De forma semelhante, a ANOVA realizada para o fator 2 confirmou que o modelo ajustado é estatisticamente significativo (p-valor = 0,002). Entre os efeitos lineares, a DC apresentou mais influência sobre o fator 2, com p-valor = 0,001, seguido do pH (p-valor = 0,003) e TE (p-valor = 0,007), indicando que as

variáveis influenciaram significante F2 de forma linear. Entretanto, os efeitos quadráticos não apresentaram significância, sugerindo que a relação entre as variáveis e o fator 2 pode ser predominantemente linear.

As variáveis foram agrupadas em dois fatores que são inversamente proporcionais. Dessa forma, a otimização do processo buscou maximizar as variáveis agrupadas em F1 (DO, SST e DQO_t) e, simultaneamente, minimizar as variáveis agrupadas em F2 (Al_{bio} e Al_{Liq}). Para isso, a minimização da função F2 foi realizada conforme as restrições da Equação 8.6, considerando α igual a 1,682. Em seguida, a maximização da função F1 seguiu as restrições da Equação 8.7, garantindo que as restrições de F2 permanecessem inalteradas.

$$\text{Minimizar } E [F2 (x,z)], \text{ sujeito a restrição } x^T x \leq \alpha^2 \quad \text{Equação 8.6}$$

$$\text{Maximizar } E [F1 (x,z)], \text{ sujeito a restrição } x^T x \leq \alpha^2 \text{ e } T(F2) = F2 \quad \text{Equação 8.7}$$

A otimização em dois fatores definiu o ponto ótimo nas condições de pH 7,60, densidade de corrente de 8,41 A m⁻² e tempo de eletrólise de 30,37 minutos. A aplicação desses valores nas equações de regressão apresentadas (Tabela 8.4) resultou em: eficiência de remoção de DO de 74,79%, remoção de SST de 43,62%, remoção de DQO de 65,79%, concentração de Al de 1,20 mg L⁻¹ nas águas residuárias e teor de Al na biomassa de microalgas igual a 6,76%. Esses resultados indicam um equilíbrio entre eficiência de colheita de biomassa e minimização da contaminação por Al.

Por outro lado, quando a otimização considera somente as variáveis agrupadas em um fator (F1), o ponto ótimo foi verificado em condições diferentes (pH 6,33, densidade de corrente de 14,89 A·m⁻² e 42,21 minutos de operação). Nessa situação, as eficiências foram superiores em termos de remoção: 143,32% de DO, 88,50% de SST e 85,10% de DQO. No entanto, a concentração de Al atingiu 1,75 mg L⁻¹ na água residual e o teor de Al na biomassa chegou a 14,57%, o que representa um aumento de 115,67% em comparação ao cenário de otimização em dois fatores.

Analisando esses dois cenários, observa-se que a otimização em um fator (F1) apresenta melhor desempenho na remoção de matéria orgânica. Esse resultado é evidenciado por sua maior eficiência em DQO, parâmetro que pode

estar relacionado à remoção de biomassa de microalgas (RYU et al., 2018). No entanto, essa otimização resulta em uma contaminação por Al consideravelmente maior. Em termos percentuais, a remoção de DQO_t no cenário F1 foi 29,36 % superior, mas gerou uma contaminação por Al cerca de duas vezes maior na biomassa.

Adicionalmente, vale ressaltar que, de acordo com a lei de Faraday, maiores tempos de operação e maiores densidades de corrente aumentam tanto o consumo energético quanto a liberação de Al no meio. Dessa forma, a otimização em dois fatores (F1 + F2) equilibra a eficiência de colheita de microalgas e a minimização da contaminação por Al, ainda que com menor eficiência de remoção de DQO em relação ao cenário de otimização em um fator.

Esses resultados estão em concordância com as observações de FAYAD et al., (2017). Para evitar que a concentração de Al na água ultrapasse 2 mg L^{-1} e, simultaneamente, manter seu teor na biomassa microalgal abaixo de 1%, a EC precisou ser conduzida com menor tempo de eletrólise e menor densidade de corrente, afetando a colheita de microalgas. Com essa abordagem, os autores observaram a concentração de Al na fase líquida foi reduzida para $1,2 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto o teor de Al na biomassa atingiu apenas $0,9 \pm 0,1\%$, minimizando significativamente a contaminação tanto da água residual quanto da biomassa.

Para o parâmetro de SST, foi observado melhor desempenho na otimização com 1 fator, devido ao maior tempo de reação e maior densidade de corrente aplicados nesse cenário. Essa variável também é importante para a avaliação do desempenho do processo, sendo utilizada para acompanhar o desempenho da EC no tratamento de efluentes (ANUF et al., 2022). Adicionalmente, maiores tempos de operação e maiores densidades de corrente aumentam tanto o consumo energético quanto a liberação de Al no meio, impactando diretamente no desempenho econômico da operação (JEEVANANDAM et al., 2020). Dessa forma, a otimização em dois fatores (F1 + F2) equilibrou a eficiência de colheita de microalgas e a minimização da contaminação por Al, ainda que com menor eficiência de remoção de SST em relação ao cenário de otimização em um fator.

8.2.6. Viabilidade ambiental

O Inventário do Ciclo de Vida é apresentado na Tabela 8.8, com todas as entradas e saídas expressas em termos de unidade funcional (1 g de biomassa colhida), juntamente com os processos de fundo do banco de dados Ecoinvent usados para modelar a colheita.

Tabela 8.8. Inventário de Ciclo de Vida dos cenários

| Descrição do processo | Unid | C1 | C2 | C3 | C4 |
|--|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Biomassa colhida (unidade funcional | g | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Electricity, high voltage {BR} production mix APOS, S | MJ | 2,23 | 0 | 16,79 | 0 |
| Electricity, low voltage {MX} electricity production, photovoltaic, 570kWp open ground installation, multi-Si APOS, S | MJ | 0 | 2,23 | 0 | 16,79 |
| Aluminium, cast alloy {RoW} treatment of aluminium scrap, new, at refiner APOS, S | mg | 72,52 | 72,52 | 138,26 | 138,26 |
| Emissão de Hidróxido de alumínio (Al(OH) ₃) para a água | mg | 4,90 10 ⁻³ | 4,90 10 ⁻³ | 1,90 10 ⁻³ | 1,90 10 ⁻³ |

Nota: C1 = Cenário com EC otimizada; C2 = Cenário com EC + energia fotovoltaica; C3 = Cenário com EC; C4 = Cenário com EC + energia fotovoltaica.

Na Figura 8.8 são apresentados os resultados da Normalização por categoria de impacto, expressa em Eco-point, enfatizando impactos ambientais de *midpoint* e *endpoint*. Resultados detalhados de Caracterização e Normalização são fornecidos nos Arquivos Suplementares (Apêndice V e Apêndice VI).

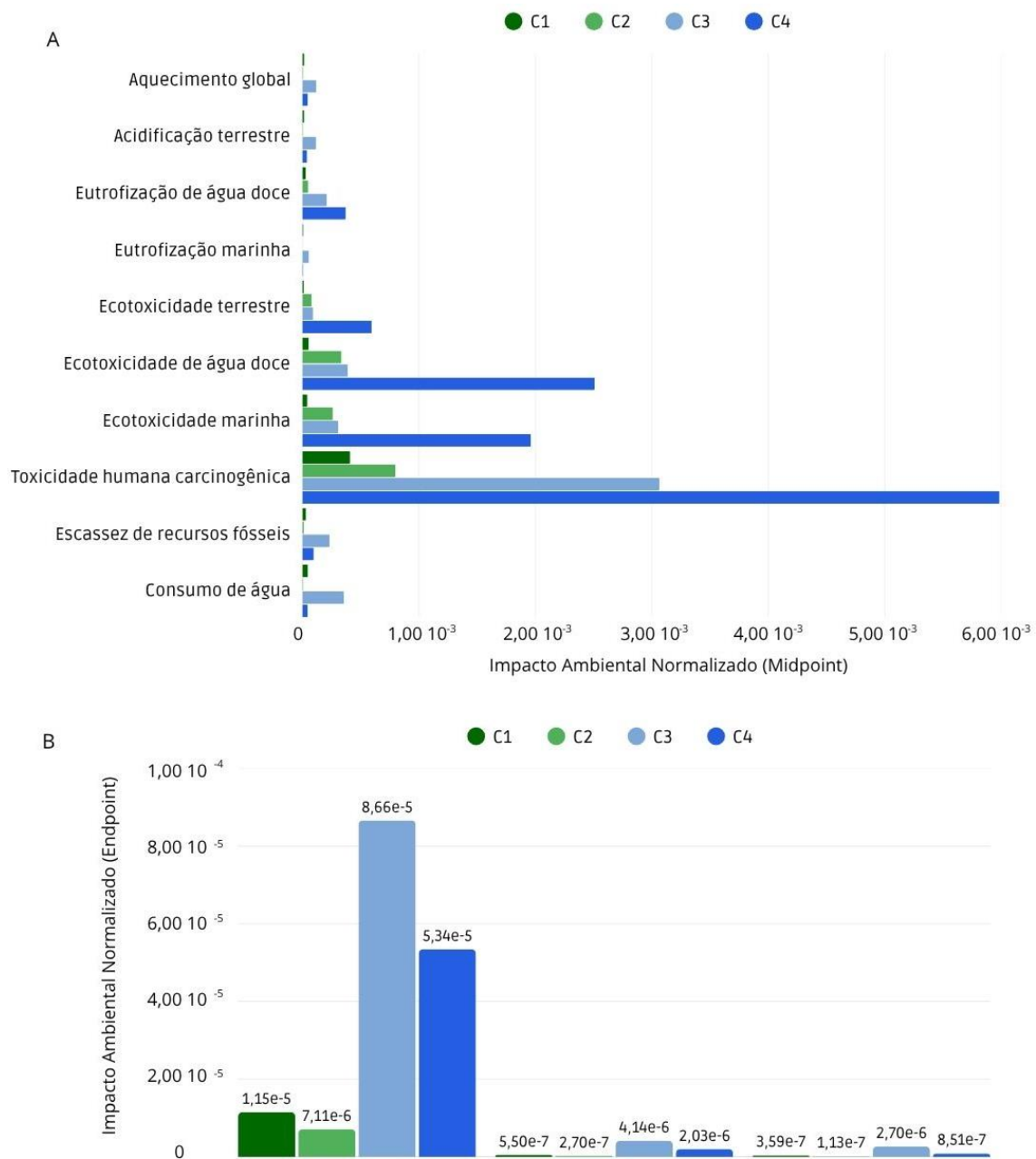


Figura 8.8. Resultados normalizados a *nível mid point* (A) e *end point* (B), para os cenários avaliados: Colheita otimizada (C1); Colheita otimizada + energia fotovoltaica (C2); Colheita não otimizada (C3); Colheita não otimizada + energia fotovoltaica (C4).

A otimização dos cenários resultou em uma diminuição do consumo de energia no sistema de EC e, ao incorporar o uso de energia fotovoltaica, observou-se uma redução significativa dos impactos ambientais, tanto no cenário otimizado quanto no não otimizado. Entre as categorias de impacto mais relevantes, destaca-se a toxicidade humana carcinogênica, cujos maiores valores normalizados foram observados no cenário C4 ($5,99 \times 10^{-3}$), seguido por

C3 ($3,06 \times 10^{-3}$), C2 ($7,98 \times 10^{-4}$) e C1 ($4,09 \times 10^{-4}$). No que se refere à ecotoxicidade, o cenário C4 também apresentou valores elevados, sobretudo para água doce ($2,51 \times 10^{-3}$), marinha ($1,96 \times 10^{-3}$) e terrestre ($5,95 \times 10^{-4}$).

Outro ponto crítico evidenciado pelos resultados foi o consumo de recursos fósseis, especialmente no cenário C3 ($2,32 \times 10^{-4}$), indicando forte dependência de fontes não renováveis. Na categoria de aquecimento global, destacaram-se os cenários C3 ($1,18 \times 10^{-4}$) e C4 ($4,58 \times 10^{-5}$), que apresentaram emissões mais elevadas de gases de efeito estufa. De modo geral, os impactos observados relacionam-se mais ao consumo energético do que à emissão de Al pelos eletrodos.

Nesse contexto, ficou evidente que a mudança na fonte de energia teve efeito marcante na redução dos impactos, sobretudo em nível *endpoint* (Figura 8.8). Mesmo com maiores valores de toxicidade humana carcinogênica em nível *midpoint*, a adoção de energia fotovoltaica diminuiu o impacto geral sobre o indicador de Saúde Humana em nível *endpoint*, pois esse nível de avaliação integra diversas categorias simultaneamente.

Por outro lado, o uso de placas fotovoltaicas elevou alguns impactos nas categorias de toxicidade e ecotoxicidade. PIOTROWSKA et al., (2022) discutiram essa questão ao comparar energia fotovoltaica e eólica, enfatizando a influência das emissões de cromo (particularmente sais de ácido crômico VI) na água, amplamente utilizados em indústrias metalúrgicas, químicas e de construção, bem como na fabricação de pigmentos, polímeros e vidros. Assim, níveis significativos de emissões desse elemento são registrados no ciclo de vida tanto de usinas eólicas quanto fotovoltaicas, sobretudo na etapa de produção dos materiais e componentes.

No contexto de aplicação prática, MACÉRAK et al., (2024) analisaram a EC aplicada ao tratamento de efluentes domésticos, indicando que melhorias ambientais podem advir principalmente do uso de fontes renováveis de energia e da substituição de materiais de eletrodos convencionais por alternativas mais sustentáveis. Já LI et al., (2024) compararam Al, Fe e Mg como materiais de eletrodo, concluindo que o Al apresenta os menores impactos associados. Dessa forma, para o avanço na redução de impactos, faz-se necessário avaliar tanto a adoção de energias limpas quanto o uso de ligas ou materiais mais inovadores e ambientalmente amigáveis para os eletrodos. Ainda assim, o principal desafio

continua sendo o consumo energético e seus processos associados, reforçando a importância de fontes renováveis para a minimização dos impactos ambientais. Na Figura 8.9 são apresentados os resultados da avaliação de impactos no nível de pontuação única, expressa em milipontos (mPt).

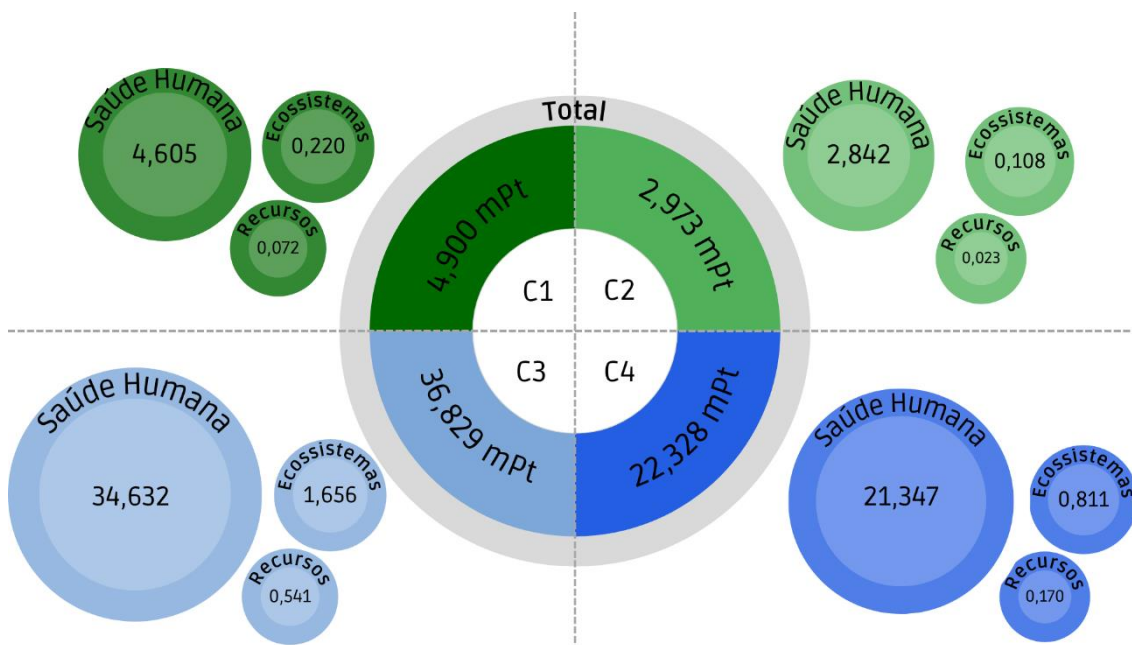


Figura 8.9. Pontuação única, a nível *end point*, para os cenários avaliados: Colheita via EC otimizada (C1); Colheita via EC otimizada + energia fotovoltaica (C2); Colheita via EC não otimizada (C3); Colheita Via EC não otimizada + energia fotovoltaica (C4).

A introdução da energia fotovoltaica no cenário otimizado resultou em uma redução de aproximadamente 39,30 % no impacto ambiental. Além disso, a análise da contribuição dos processos no ciclo de vida revelou que o consumo de energia é o principal fator determinante para a viabilidade ambiental da colheita de microalgas. De fato, a energia representou entre 99,70 % (C2) e 99,95 % (C3) dos impactos totais do sistema, destacando a importância de fontes energéticas mais sustentáveis na mitigação dos impactos ambientais associados ao processo. Em contrapartida, o AI representou entre 0,05 % (C3) a 0,30 % (C2) do total de contribuição no processo.

Esses resultados corroboram com o observado por LI et al., (2024), que realizaram uma avaliação de ciclo de vida para comparar os eletrodos de Al, Fe e Mg no tratamento de águas residuárias. O estudo indicou que o coeficiente de sensibilidade da energia elétrica de entrada foi maior para o eletrodo de Al

(0,8873), sugerindo que a energia elétrica é mais crítica do que a massa do eletrodo.

Uma estratégia eficaz para aprimorar o desempenho energético e ambiental do sistema é a recuperação do hidrogênio gerado durante o processo de EC. O gás hidrogênio (H_2), coproduto da eletrólise da água, ocorre juntamente com o gás oxigênio (O_2) e pode ser aproveitado como uma fonte de energia renovável, reduzindo a dependência de fontes fósseis. Nos estudos realizados por RAHMANI et al., (2017) durante a colheita de *Chlorella pyrenoidosa* via EC, o rendimento de H_2 representou entre 10% e 19% da demanda energética do processo. Portanto, a recuperação desse coproduto não só contribui para atender parte da demanda energética, como também melhora a eficiência ambiental do sistema, promovendo uma abordagem mais sustentável.

8.2.7. Perspectivas Futuras e Direções para Pesquisas em EC

As perspectivas futuras de pesquisa para melhorar a colheita de biomassa, via EC, apontam para várias direções promissoras. Por exemplo, a variável concentração de biomassa desempenha um papel crucial no desempenho do processo de eletrocoagulação, já que concentrações mais baixas resultam em uma eletrocoagulação menos eficiente, exigindo mais potência/energia para ser concluída (PECHSIRI et al., 2023). Pesquisas futuras podem explorar o impacto da concentração de biomassa na eficiência do processo, especialmente considerando que podem ocorrer flutuações nessa variável. Compreender a relação entre a concentração de biomassa e o desempenho do processo é fundamental, principalmente em cenários de ampliação de escala, onde essas variações podem se tornar mais significativas.

Outro aspecto relevante é a recuperação de H_2 durante o processo de EC, uma estratégia que pode agregar valor ao sistema e otimizar sua eficiência. Pesquisas futuras podem focar no desenvolvimento de estratégias para maximizar a recuperação de H_2 . Esse avanço pode contribuir para a viabilização econômica de tecnologias de EC e para a redução dos impactos ambientais associados à geração de energia.

Diferentes configurações de células de EC e o uso de materiais alternativos, como eletrodos não sacrificiais, para eletrodos também devem ser investigados, visando otimizar a colheita de biomassa e reduzir os requisitos energéticos do processo. A modificação e o aprimoramento das configurações

de EC, aliados à seleção de materiais de eletrodos mais eficientes, podem aumentar a eficiência do processo, minimizando a potência necessária para operação e ampliando a viabilidade técnica e econômica da tecnologia.

Assim, as pesquisas futuras devem concentrar-se no aprimoramento da eficiência energética e da sustentabilidade dos processos de EC, visando torná-los escalonáveis e viáveis em larga escala. Isso inclui otimizar o uso de biomassa, recuperar subprodutos como o H_2 , integrar fontes de energia renováveis e adoção de materiais ecológicos. Alcançar esses objetivos é essencial para garantir que o processo seja economicamente viável, energeticamente eficiente e ambientalmente sustentável, permitindo sua aplicação em escala industrial e contribuindo para a transição para tecnologias mais limpas e eficientes.

8.3. Conclusão

Este estudo investigou a otimização da colheita de microalgas utilizando a tecnologia de EC, com foco na eficiência e viabilidade ambiental do processo. O pH apresentou o maior coeficiente nas regressões, influenciando de forma significativa tanto a eficiência da colheita (DO e SST) quanto a solubilização do Al. A pesquisa evidenciou a dificuldade de conciliar dois fatores concorrentes: a contaminação por Al com a eficiência da remoção. Isso porque a maior eficiência na remoção de biomassa e matéria orgânica ocorre em condições que também favorecem a liberação de Al na fase líquida e na biomassa. O estudo reforçou a necessidade equilibrar esses fatores e garantir a viabilidade técnica e ambiental da biomassa colhida.

Contudo, a aplicação da metodologia de superfície de resposta permitiu identificar as condições operacionais ideais para a EC (pH 7,60, densidade de corrente igual a $8,41 \text{ A m}^{-2}$ e 30,37 minutos de operação). Os principais resultados mostraram que otimização em dois fatores pode conciliar a eficiência de colheita de microalgas e a minimização da contaminação por Al, ainda que com menor remoção em termos de DQO e SST em comparação à otimização em um fator. Em comparação com um cenário de otimização considerando um fator (pH 6,33, densidade de corrente de $14,89 \text{ A m}^{-2}$ e 42,21 minutos), tempos de eletrólise mais longos e densidades de corrente mais altas aumentam o consumo de energia e a liberação de Al, podendo comprometer a viabilidade do processo.

Quanto à viabilidade ambiental do sistema, a ACV mostrou que a otimização do processo e a integração de energia fotovoltaica reduziram significativamente os impactos ambientais, principalmente as categorias de saúde humana. O consumo de energia foi identificado como o principal fator de impacto, representando entre 99,70 % e 99,95 % dos impactos totais. A adoção de fontes renováveis de energia, como a fotovoltaica, reduziu os impactos em 39,30 %, destacando a importância de estratégias sustentáveis para a viabilidade ambiental do processo. As pesquisas futuras devem, portanto, focar na otimização energética, na reutilização de subprodutos como o hidrogênio e no desenvolvimento de diferentes configurações de eletrodos que reduzam a liberação de contaminação, tornando a tecnologia mais sustentável e aplicável em larga escala.

Referências bibliográficas

ABOULHASSAN, M. A. *et al.* Coagulation efficacy of a tannin coagulant agent compared to metal salts for paint manufacturing wastewater treatment. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 41, p. 19199–19205, 1 set. 2016.

AL-QODAH, Z. *et al.* Enhancement of dairy wastewater treatment efficiency in batch chemical-assisted solar-powered electrocoagulation-adsorption system. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 9, p. 100760, jun. 2024.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. Washington: [s.n.].

ANUF, A. R. *et al.* Optimization of electrocoagulation process for treatment of rice mill effluent using response surface methodology. **Journal of Water Process Engineering**, v. 49, p. 103074, out. 2022.

APHA. **Standard Methods for examination of water and wastewater**. [s.l.] American Water Work Association, Water Environmental Federation, 2012.

ARDHIANTO, R. *et al.* A study of continuous-flow electrocoagulation process to minimize chemicals dosing in the full-scale treatment of plastic plating industry wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 60, p. 105217, abr. 2024.

ASEFAW, K. T. *et al.* Investigation on pulsed-electrocoagulation process for the treatment of wet coffee processing wastewater using an aluminum electrode. **Sustainable Chemistry for the Environment**, v. 6, p. 100085, jun. 2024.

COIMBRA, E. C. L. *et al.* Electrocoagulation of kraft pulp bleaching filtrates to improve biotreatability. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 147, p. 346–355, 1 mar. 2021.

COLLOTTA, M. *et al.* Comparative LCA of Flocculation for the Harvesting of Microalgae for Biofuels Production. **Procedia CIRP**, v. 61, p. 756–760, 2017.

DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Reducing electrocoagulation harvesting costs for practical microalgal biodiesel production. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 6, p. 691–697, 19 mar. 2014.

DEVLIN, T. R. *et al.* Electrocoagulation of wastewater using aluminum, iron, and magnesium electrodes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 368, p. 862–868, abr. 2019.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. [s.l.] Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

FARHAN ABBASS, R.; AMOOEY, A. A.; YASIR ALJABERI, F. Electrocoagulation removal of COD and TDS from real municipal wastewater sourced from the Euphrates River using multipole arrangement. **Results in Chemistry**, v. 9, p. 101613, jul. 2024.

FAYAD, N. *et al.* Harvesting of microalgae *Chlorella vulgaris* using electrocoagulation-flocculation in the batch mode. **Algal Research**, v. 25, p. 1–11, 1 jul. 2017.

FERREIRA, J. *et al.* Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

_____. Carotenoids from wastewater-grown microalgae biomass: Life cycle assessment and techno-economical analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 434, p. 140526, jan. 2024.

FIGUEIREDO, D. *et al.* Nannochloropsis oceanica biomass enriched by electrocoagulation harvesting with promising agricultural applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100979, fev. 2022.

GAO, S. *et al.* Electro-coagulation–flotation process for algae removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 336–343, maio 2010.

HAWARI, A. H. *et al.* Effect of the induced dielectrophoretic force on harvesting of marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) in electrocoagulation. **Journal of Environmental Management**, v. 260, 15 abr. 2020.

HERRERA, A. *et al.* Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, n. 125005, p. 12, 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14040 - Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principles and Framework**. [s.l.: s.n.].

_____. **ISO 14044 - Environmental Management - Life Cycle Assessment - Requires and Guidelines**. [s.l.: s.n.].

JEEVANANDAM, J. *et al.* Microalgal Biomass Generation via Electroflotation: A Cost-Effective Dewatering Technology. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 9053, fev. 2020.

KHATIB, W. A. *et al.* Enhancing the electrocoagulation process for harvesting marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) using interdigitated electrodes. **Journal of Environmental Management**, v. 292, n. February, p. 112761, 2021.

KOMAREK, J.; FOTT, B. **Das Phytoplankton im Susswasser Chlorophyceae (Grunanlagen) Ordnung: Chlorococcales: Bd 7 1.** [s.l.] Schweizerbart'sche, E., 1983.

KRISHNAMOORTHY, N. *et al.* Recent advances and future prospects of electrochemical processes for microalgae harvesting. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 105875, out. 2021.

LANDELS, A. *et al.* Improving electrocoagulation floatation for harvesting microalgae. **Algal Research**, v. 39, p. 101446, maio 2019.

LEOVAC MAĆERAK, A. *et al.* Electrocoagulation in treatment of municipal wastewater– life cycle impact assessment. **Chemosphere**, v. 355, p. 141701, maio 2024.

LI, G. *et al.* Phosphate Removal Efficiency and Life Cycle Assessment of Different Anode Materials in Electrocoagulation Treatment of Wastewater. **Sustainability**, v. 16, n. 9, p. 3836, 2 maio 2024.

LUCAKOVA, S. *et al.* Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae. **Bioresource Technology**, v. 323, 1 mar. 2021.

____. Continuous electrocoagulation of *Chlorella vulgaris* in a novel channel-flow reactor: A pilot-scale harvesting study. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126996, maio 2022.

MAGALHÃES, I. B. *et al.* Agro-industrial wastewater-grown microalgae: A techno-environmental assessment of open and closed systems. **Science of The Total Environment**, v. 834, p. 155282, ago. 2022.

MAHMOOD, A.; HWAN KIM, J.; PARK, J. W. Application of metal-air fuel cell electrocoagulation for the harvesting of *Nannochloropsis salina* marine microalgae. **Renewable Energy**, v. 171, p. 1224–1235, 1 jun. 2021.

NAJJAR, Y. S. H.; ABU-SHAMLEH, A. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 51, p. 102046, 1 out. 2020.

NEW ZEALAND GUIDELINES FOR FRESH AND MARINE WATER QUALITY. **Correlation between water quality variables**. Disponível em: <<https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/monitoring/data-analysis/correlation-between-variables>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

OLIVEIRA, C. H. DE. **Otimização robusta multivariada no fresamento de topo do aço inoxidável duplex UNS S32205**. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2022.

PANDEY, A. *et al.* Experimental studies on zeta potential of flocculants for harvesting of algae. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 562–569, fev. 2019.

PARMENTIER, D. *et al.* A new reactor design for harvesting algae through electrocoagulation-flotation in a continuous mode. **Algal Research**, v. 47, 1 maio 2020.

PARRA, O. A. *et al.* Chlorophyceae Parte I Volvocales, Tetrasporales, Chlorococcales y Ulothricales. *Em: Manual taxonomico del fitoplâncton de águas continentales*. [s.l: s.n.]. .

PATEL, S. K. *et al.* State of the art review for industrial wastewater treatment by electrocoagulation process: Mechanism, cost and sludge analysis. **Desalination and Water Treatment**, v. 321, p. 100915, jan. 2025.

PECHSIRI, J. S. *et al.* Comparative life cycle assessment of conventional and novel microalgae production systems and environmental impact mitigation in urban-industrial symbiosis. **Science of The Total Environment**, v. 854, p. 158445, jan. 2023.

PIOTROWSKA, K. *et al.* Assessment of the Life Cycle of a Wind and Photovoltaic Power Plant in the Context of Sustainable Development of Energy Systems. **Materials**, v. 15, n. 21, p. 7778, 4 nov. 2022.

PRATAMA, W. D.; HADIYANTO, H. Evaluation of different electrodes in electrocoagulation-flotation process for *Chlorella vulgaris* harvesting. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 10, p. 100801, dez. 2024.

RAEISSADATI, M.; MOHEIMANI, N. R.; BAHRI, P. A. Evaluation of electrocoagulation, flocculation, and sedimentation harvesting methods on microalgae consortium grown in anaerobically digested abattoir effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 3, p. 1631–1642, 16 jun. 2021.

RAHMANI, A. *et al.* Hydrogen recovery from the photovoltaic electroflocculation-flotation process for harvesting *Chlorella pyrenoidosa* microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 31, p. 19591–19596, 3 ago. 2017.

RYU, B.-G. *et al.* Evaluation of an electro-flotation-oxidation process for harvesting bio-flocculated algal biomass and simultaneous treatment of residual pollutants in coke wastewater following an algal-bacterial process. **Algal Research**, v. 31, p. 497–505, abr. 2018.

SCHNEIDER, R. DE C. DE S. *et al.* Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. **Algal Research**, v. 32, p. 280–292, 1 jun. 2018.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. **Microalgae harvesting techniques: A review** *Journal of Environmental Management* Academic Press, , 1 jul. 2018.

UTHERMÖHL, H. **Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton - Methodik**. [s.l.] Stuttgart Schweizerbart, 1958.

VISIGALLI, S. *et al.* Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting – A review. **Separation and Purification Technology**, v. 271, p. 118684, 2021.

WANG, Q.; OSHITA, K.; TAKAOKA, M. Flocculation properties of eight microalgae induced by aluminum chloride, chitosan, amphoteric polyacrylamide, and alkaline: Life-cycle assessment for screening species and harvesting methods. **Algal Research**, v. 54, p. 102226, abr. 2021.

WONG, Y. K. *et al.* Enhancement of *Chlorella vulgaris* harvesting via the electro-coagulation-flotation (ECF) method. **Environmental science and pollution research international**, v. 24, n. 10, p. 9102–9110, 1 abr. 2017.

ZHANG, H. *et al.* Environmental and economic assessment of electro-dewatering application to sewage sludge: A case study of an Italian wastewater treatment plant. **Journal of Cleaner Production**, v. 210, p. 1180–1192, 2019.

9. CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo demonstrou que o cultivo de microalgas em águas residuárias, aliado à otimização de tecnologias de colheita, pode impulsionar tanto a produção de bioprodutos quanto o tratamento de efluentes. A adequação da razão C/N, combinando águas residuárias municipais e industriais, aumentou a concentração de clorofila-a em até 1,54 vezes (C/N 7,52) em comparação ao uso exclusivo de esgoto doméstico (C/N = 1,75). Além disso, a razão C/N de 30,67 aumentou o teor de lipídios (26,39 %) e carboidratos (30,07 %), enquanto a razão intermediária (7,52) favoreceu a produção de proteína (33,00 %). Com o aumento da escala e a investigação em lagoas de alta taxa em escala piloto, a razão C/N de 9,65 resultou em maior teor proteico (25,37 %), e a de 52,71 promoveu o acúmulo de ácidos graxos saturados (C16:0 em 40,39 % e C18:0 em 10,08 %), indicando potencial para rotas de biocombustíveis. Contudo, é fundamental continuar a otimização de parâmetros operacionais e integrar abordagens de biorrefinaria para a recuperação de múltiplos bioprodutos.

No que se refere à colheita, a otimização da eletrocoagulação consolidou-se como etapa-chave para tornar a produção de biomassa atrativa. A aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta permitiu ajustar as variáveis de pH, densidade de corrente e tempo de operação para conciliar dois fatores concorrentes: contaminação por alumínio e eficiência da colheita. As condições ideais de operação foram observadas em pH 7,60, densidade de corrente igual a 8,41 A m⁻² e 30,37 minutos, equilibrando eficiência de colheita e minimização da contaminação por alumínio (1,20 mg L⁻¹ nas águas residuárias e 6,76 % na biomassa). Além disso, a avaliação de ciclo de vida indicou que o consumo de energia elétrica é a principal fonte de impactos ambientais, recomendando-se, portanto, o uso de fontes renováveis para mitigar esse efeito. Esses resultados reforçam a necessidade de estudos de escalonamento e análise econômica do processo para viabilizar a aplicação da tecnologia em larga escala.

10. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Os resultados deste estudo evidenciaram o potencial do cultivo de microalgas em águas residuárias combinadas e da eletrocoagulação como método de colheita. Embora as microalgas possam ser uma alternativa promissora para o manejo sustentável de efluentes, ainda existem desafios a serem superados. As futuras pesquisas devem priorizar a otimização da composição do meio de cultivo e a seleção de linhagens mais eficientes de microalgas para desenvolver cepas com maior estabilidade fisiológica. Além disso, é essencial aprofundar o estudo da simbiose entre microalgas e bactérias para aprimorar a eficiência do tratamento de efluentes e melhorar o acúmulo de compostos durante o cultivo. Esses avanços são decisivos para impulsionar a produtividade das microalgas, aprimorar a eficiência dos processos de tratamento, viabilizar a produção de bioprodutos e consolidar a biotecnologia de microalgas como uma solução estratégica para o saneamento ambiental.

No contexto da tecnologia de eletrocoagulação para a colheita de microalgas, ainda é necessário superar desafios para viabilizar sua aplicação em larga escala de forma econômica e ambientalmente sustentável no âmbito das biorrefinarias de microalgas. Dessa forma, as pesquisas futuras devem concentrar os esforços na investigação de diferentes configurações do reator, para reduzir o consumo energético e minimizar problemas como a passivação dos eletrodos. Adicionalmente, a investigação de diferentes materiais de eletrodos, incluindo ânodos alternativos como magnésio, zinco, carbono e aço inoxidável, considerando sua durabilidade, eficiência na remoção de biomassa e menor impacto na qualidade final da biomassa colhida e do efluente tratado. O desenvolvimento de modelos preditivos que integrem aspectos técnicos, econômicos e ambientais pode ser uma alternativa para melhorar a compreensão da viabilidade da EC.

Por fim, a integração dessas estratégias no contexto de biorrefinarias de microalgas deve priorizar abordagens que considerem não apenas o potencial da biomassa para a produção de biocombustíveis, biofertilizantes e outros bioprodutos de valor agregado, mas também a compatibilidade com aspectos técnico-econômicos e ambientais, garantindo a viabilidade dos processos.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, Tamires Condé de *et al.* Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1160–1169, abr. 2019.

CAI, Yihui *et al.* Effects of C/N ratio on the growth and protein accumulation of heterotrophic *Chlorella* in broken rice hydrolysate. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 15, n. 1, p. 102, 8 out. 2022.

CALIJURI, Maria Lúcia *et al.* Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 305, p. 135508, out. 2022.

CHENG, Sze Yin *et al.* Incorporating biowaste into circular bioeconomy: A critical review of current trend and scaling up feasibility. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, p. 101034, 2020.

CHOUDHARY, Poonam *et al.* A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. **Science of the Total Environment**, v. 726, n. 271, p. 137961, 2020.

DAS, Pranjal P.; SHARMA, Mukesh; PURKAIT, Mihir K. **Recent progress on electrocoagulation process for wastewater treatment: A review. Separation and Purification Technology** Elsevier B.V., , 1 jul. 2022.

FALLAHI, Alireza *et al.* Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 272, p. 129878, jun. 2021.

FAROOQ, Wasif *et al.* **Monitoring lipids profile, CO₂ fixation, and water recyclability for the economic viability of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivation at different initial nitrogen.** **Journal of Biotechnology** Elsevier B.V., , 10 fev. 2022.

FERREIRA, Jéssica *et al.* Carotenoids from wastewater-grown microalgae biomass: Life cycle assessment and techno-economical analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 434, p. 140526, jan. 2024.

FIGUEIREDO, Daniel *et al.* *Nannochloropsis oceanica* biomass enriched by electrocoagulation harvesting with promising agricultural applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100979, fev. 2022.

HAWARI, Alaa H. *et al.* Effect of the induced dielectrophoretic force on harvesting of marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) in electrocoagulation. **Journal of Environmental Management**, v. 260, 15 abr. 2020.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, Andrea *et al.* Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 435–444, fev. 2019.

HERRERA, Axel *et al.* Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, n. 125005, p. 12, 2021.

JEEVANANDAM, Jaison *et al.* Microalgal Biomass Generation via Electroflotation: A Cost-Effective Dewatering Technology. **Applied Sciences**, v. 10, n. 24, p. 9053, fev. 2020.

KHATIB, Wardan A. *et al.* Enhancing the electrocoagulation process for harvesting marine microalgae (*Tetraselmis* sp.) using interdigitated electrodes. **Journal of Environmental Management**, v. 292, n. February, p. 112761, 2021.

KONG, Fanying *et al.* Improved decolorization and mineralization of azo dye in an integrated system of anaerobic bioelectrochemical modules and aerobic moving bed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 353, p. 127147, jun. 2022.

LAM, Ka Leung; ZLATANOVIĆ, Ljiljana; VAN DER HOEK, Jan Peter. Life cycle assessment of nutrient recycling from wastewater: A critical review. **Water Research**, v. 173, 2020.

LIU, Huan *et al.* A review of the strategy to promote microalgae value in CO₂ conversion-lipid enrichment-biodiesel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 436, p. 140538, jan. 2024.

LOGANATHAN, Bhalamurugan Gatamaneni *et al.* A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1445–1455, 8 ago. 2020.

LUCAKOVA, Simona *et al.* Electrocoagulation reduces harvesting costs for microalgae. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124606, 1 mar. 2021.

LUCAKOVA, Simona *et al.* Continuous electrocoagulation of *Chlorella vulgaris* in a novel channel-flow reactor: A pilot-scale harvesting study. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126996, maio 2022.

MAHMOOD, Asad; HWAN KIM, Jung; PARK, Jae Woo. Application of metal-air fuel cell electrocoagulation for the harvesting of *Nannochloropsis salina* marine microalgae. **Renewable Energy**, v. 171, p. 1224–1235, 1 jun. 2021.

MENDONÇA, Henrique Vieira de *et al.* Microalgae in a global world: New solutions for old problems? **Renewable Energy**, v. 165, p. 842–862, 2021.

MORENO-GARCIA, L. *et al.* Factors affecting the fatty acid profile of wastewater-grown-algae oil as feedstock for biodiesel. **Fuel**, v. 304, p. 121367, nov. 2021.

NAJJAR, Yousef S. H.; ABU-SHAMLEH, Amer. Harvesting of microalgae by centrifugation for biodiesel production: A review. **Algal Research**, v. 51, p. 102046, 1 out. 2020.

PAGELS, Fernando *et al.* **Pigments from microalgae**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2020.

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula *et al.* Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies. **Science of The Total Environment**, v. 920, p. 170918, abr. 2024a.

PEREIRA, Alexia Saleme Aona de Paula *et al.* Municipal and industrial wastewater blending: Effect of the carbon/nitrogen ratio on microalgae productivity and biocompound accumulation. **Journal of Environmental Management**, v. 370, p. 122760, nov. 2024b.

PRATAMA, Wahyu Diski; HADIYANTO, Hadiyanto. Evaluation of different electrodes in electrocoagulation-flotation process for *Chlorella vulgaris* harvesting. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, v. 10, p. 100801, dez. 2024.

RAEISSADATI, Mohammadjavad; MOHEIMANI, Navid R.; BAHRI, Parisa A. Evaluation of electrocoagulation, flocculation, and sedimentation harvesting methods on microalgae consortium grown in anaerobically digested abattoir effluent. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 3, p. 1631–1642, 16 jun. 2021.

RAHMANI, Abdellatif *et al.* Hydrogen recovery from the photovoltaic electroflocculation-flotation process for harvesting *Chlorella pyrenoidosa*

microalgae. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 31, p. 19591–19596, 3 ago. 2017.

REN, Hong-Yu *et al.* Lipid production characteristics of a newly isolated microalga *Asterarcys quadricellulare* R-56 as biodiesel feedstock. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 48339–48350, 9 fev. 2023.

SARATALE, Rijuta Ganesh *et al.* Microalgae cultivation strategies using cost-effective nutrient sources: Recent updates and progress towards biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127691, out. 2022.

SINGH, Gulab; PATIDAR, S. K. **Microalgae harvesting techniques: A review**. **Journal of Environmental Management** Academic Press, , 1 jul. 2018.

SONG, Xueting *et al.* Simultaneous chromium removal and lipid accumulation by microalgae under acidic and low temperature conditions for promising biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 370, p. 128515, fev. 2023.

VISIGALLI, Simone *et al.* Electrocoagulation–flotation (ECF) for microalgae harvesting – A review. **Separation and Purification Technology**, v. 271, p. 118684, 2021.

XIE, Bingham *et al.* Blending high concentration of anaerobic digestion effluent and rainwater for cost-effective *Chlorella vulgaris* cultivation in the photobioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 360, p. 861–865, mar. 2019.

YANG, Limin; LI, Huankai; WANG, Qin. A novel one-step method for oil-rich biomass production and harvesting by co-cultivating microalgae with filamentous fungi in molasses wastewater. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 35–43, mar. 2019.

YOU, Xiaogang *et al.* Sustainability and carbon neutrality trends for microalgae-based wastewater treatment: A review. **Environmental Research**, v. 209, p. 112860, 1 jun. 2022.

YU, Mingran *et al.* Treatment of mixed wastewater by vertical rotating microalgae-bacteria symbiotic biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 393, p. 130057, fev. 2024.

ZHENG, Hongli *et al.* Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 479–486, fev. 2018.

12. APÊNDICE I

Science of the Total Environment 920 (2024) 170918



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Review

Biocompounds from wastewater-grown microalgae: a review of emerging cultivation and harvesting technologies

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira^{a,*}, Thiago Abrantes Silva^a, Iara Barbosa Magalhães^a,
Jessica Ferreira^a, Matheus Quintão Braga^a, Juliana Ferreira Lorentz^a, Paula
Peixoto Assemany^b, Eduardo de Aguiar do Couto^c, Maria Lúcia Calijuri^a

^a Federal University of Viçosa, Department of Civil Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Federal University of Lavras, Department of Environmental Engineering, Lavras, Minas Gerais, Brazil

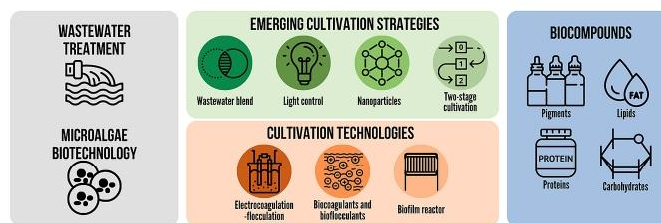
^c Federal University of Itajuba, Institute of Pure and Applied Sciences, Itabira, Minas Gerais, Brazil



HIGHLIGHTS

- Cultivation and harvesting strategies for microalgae in wastewater are reviewed.
- Wastewater blend, light control, nanoparticles, and two-stage growth were evaluated.
- Cultivation strategies can improve the accumulation and production of biocompounds.
- Electrocoagulation, biofilm reactor, bioflocculant and bio-coagulant were evaluated.
- The main challenges and opportunities of the evaluated strategies were identified.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Qilin Wang

Keywords:

Microalgae
Wastewater
Nutrient removal
Cultivation
Harvesting
Biomass production

ABSTRACT

Microalgae biomass has attracted attention as a feedstock to produce biofuels, biofertilizers, and pigments. However, the high production cost associated with cultivation and separation stages is a challenge for the microalgae biotechnology application on a large scale. A promising approach to overcome the technical-economic limitations of microalgae production is using wastewater as a nutrient and water source for cultivation. This strategy reduces cultivation costs and contributes to valorizing sanitation resources. Therefore, this article presents a comprehensive literature review on the status of microalgae biomass cultivation in wastewater, focusing on production strategies and the accumulation of valuable compounds such as lipids, carbohydrates, proteins, fatty acids, and pigments. This review also covers emerging techniques for harvesting microalgae

Abbreviations: Al, Aluminum; BR, Biofilm reactor; C, Carbon; Ca, Calcium; CO₂, Carbon dioxide; ECF, Electrocoagulation-flocculation; EPS, Extracellular polymeric substances; Fe, iron; Fe₂O₃, Iron (III) oxide; GS, Gravitational sedimentation; HRAP, high-rate algal ponds; Mg, magnesium; N, Nitrogen; NaCl, Sodium chloride; NP, Nanoparticle; P, Phosphorus; pH, Potential hydrogen; PUFAs, Polyunsaturated fatty acids; sCOD, Soluble chemical oxygen demand; SiC, Silicon carbide; TC, Tannin coagulation; TN, Total nitrogen; TP, Total phosphorus.

* Corresponding author at: Department of Civil Engineering, Federal University of Viçosa (Universidade Federal de Viçosa/UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil.

E-mail addresses: alexia.pereira@ufv.br (A.S.A.P. Pereira), thiago.abrantes@ufv.br (T.A. Silva), iara.barbosa@ufv.br (I.B. Magalhães), jessica.f.ferreira@ufv.br (J. Ferreira), matheus.braga@ufv.br (M.Q. Braga), juliana.lorentz@ufv.br (J.F. Lorentz), paula.assemany@ufla.br (P.P. Assemany), eduardocouto@unifei.edu.br (E.A. Couto), calijuri@ufv.br (M.L. Calijuri).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170918>

Received 29 November 2023; Received in revised form 22 January 2024; Accepted 10 February 2024

Available online 12 February 2024

0048-9697/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvman

Research article

Municipal and industrial wastewater blending: Effect of the carbon/nitrogen ratio on microalgae productivity and biocompound accumulation

Alexia Saleme Aona de Paula Pereira^{a,*}, Iara Barbosa Magalhães^a, Thiago Abrantes Silva^a, Alberto Jose Delgado dos Reis^b, Eduardo de Aguiar do Couto^c, Maria Lucia Calijuri^a

^a Civil Engineering Department, Federal University of Viçosa, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Bioenergy and Biorefineries Unit, National Laboratory of Energy and Geology, Lisbon, Portugal

^c Institute of Pure and Applied Sciences, Federal University of Itajuba, Itabira, Minas Gerais, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Microalgae
Biomass
Nutrients removal
Resource recovery
Wastewater treatment
C/N ratio

ABSTRACT

Municipal wastewater (MW) and industrial wastewater from juice processing (IWJ) were blended in different proportions to assess the effect of the carbon/nitrogen (C/N) ratio on pollutant removal, microalgal biomass (MB) cultivation, and the accumulation of carotenoids and biocompounds. MB development was not observed in treatments with higher C/N ratios (>30.67). The wastewater mixture favored the removal of dissolved organic carbon (75.61 and 81.90%) and soluble chemical oxygen demand (66.78–88.85%), compared to the treatment composed exclusively of MW (T7). Treatments T3 and T6 (C/N ratio equal to 30.67 and 7.52, respectively) showed higher Chlorophyll-*a* concentrations, 1.47 and 1.54 times higher than T7 (C/N ratio 1.75). It was also observed that the C/N ratio of 30.67 favored the accumulation of carbohydrates and lipids (30.07% and 26.39%, respectively), while the C/N ratio of 7.52 improved protein accumulation (33.00%). The fatty acids C16:0, C18:1, C18:2, and C18:3 had the highest concentrations. Additionally, increasing the C/N ratio can be an efficient strategy to improve the production of fatty acids for biofuels, mainly due to the increased concentration of shorter-chain fatty acids (C16:0). These findings suggest that blending wastewater not only enhances treatment performance but also increases the accumulation of valuable carbohydrates and lipids in MB, and optimizes fatty acid production for biofuel applications. This research represents significant progress towards feasibility of using MB produced from wastewater.

1. Introduction

Microalgal biomass (MB) production can be effectively integrated into wastewater treatment due to the abundance of nutrients and organic matter, which is crucial for the symbiotic interactions between microalgae and bacteria. Moreover, the MB produced at the end of this process can be utilized in biofertilizer and biofuel production pathways (Castro et al., 2023; Pereira et al., 2024), enhancing the valorization of sanitation resources (Liyanaarachchi et al., 2021; Pereira et al., 2023). However, several challenges can impact MB production performance, such as carbon (C) limitation, which is commonly reported in municipal wastewater (MW) (Moreno-Garcia et al., 2019; Xie et al., 2019a). A viable alternative is to co-treat MW with other types of wastewater that have a higher carbon concentration. This approach can provide a

medium with a more favorable carbon/nitrogen (C/N) ratio, enhancing MB cultivation performance.

The interaction between algae and bacteria improves the efficiency of biological nitrogen (N) and phosphorus (P) removal and effectively reduces aeration energy consumption (Yu et al., 2024). However, the availability of C, N, and P can vary between different types of wastewater and, consequently, influence microalgae development (Xie et al., 2019b) and biocompound accumulation (Ferreira et al., 2024; Liang et al., 2023). Wastewater from different sources has been used as a cultivation medium for MB, including MW (Assis et al., 2017; Gao et al., 2022; Khan et al., 2022), swine wastewater (Cheng et al., 2017; Oliveira et al., 2023a, 2023b; Qu et al., 2019), agro-industrial sector (Pereira et al., 2021; Silva et al., 2021; Wu et al., 2019), and brewery industry (Gama et al., 2023; Zheng et al., 2018). However, the composition of the culture medium plays a fundamental role in biomass production and

* Corresponding author. Department of Civil Engineering, Federal University of Viçosa (Universidade Federal de Viçosa/UFV), Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, 36570-900, Brazil.

E-mail addresses: alexia.aona94@gmail.com, alexia.pereira@ufv.br (A.S.A.P. Pereira), iara.barbosa@ufv.br (I.B. Magalhães), thiago.abrantes@ufv.br (T.A. Silva), alberto.reis@lneg.pt (A.J.D. Reis), eduardo.couto@ufia.br (E.A. Couto), calijuri@ufv.br (M.L. Calijuri).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.122760>

Received 15 July 2024; Received in revised form 3 September 2024; Accepted 29 September 2024

Available online 9 October 2024

0301-4797/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

14. APÊNDICE III



10th-14th November, 2024
Curitiba-Brazil

Harvesting microalgae biomass from wastewater via electrocoagulation: Operational parameters and efficiency

Pereira, A. S. A. P.* , Santos, W. G. S.** , Pereira, H. A.*** , Couto, E. A.**** , and Calijuri, M. L.*

* Federal University of Viçosa, Department of Civil Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

** Federal University of Viçosa, Department of Chemistry, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

*** Federal University of Viçosa, Department of Electrical Engineering, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

**** Federal University of Lavras, Department of Environmental Engineering, Lavras, Minas Gerais, Brazil

Highlights:

- Operating conditions (pH 6, 7, 8), time (3, 5, 7 min), and electric current (1, 3, 5 A) were assessed;
- The process performance was evaluated based on harvest efficiency and aluminum content;
- Highest harvesting efficiency (92.61%) achieved at pH 8, 5A electric current, and 7-minute operation time.

Keywords: Microalgae; Wastewater; Electrocoagulation.

INTRODUCTION

Microalgae biotechnology, a promising alternative that integrates nutrient recovery with wastewater treatment, faces a significant challenge in biomass harvesting. This challenge is due to the operational complexity, high energy consumption, and elevated costs associated with conventional methods (Pereira et al., 2024). However, these alternatives are slower processes, requiring chemical inputs that affect nutrient concentrations and increase salinity (Morais et al., 2023). In this context electrocoagulation (EC) technology emerges as a promising method for efficient, rapid, and low-energy consumption harvesting. The EC process, which occurs through the electrolytic oxidation of an anode, releases ions that neutralize the negative electrostatic charges on the microalgae surface, thus facilitating the harvesting (Lucakova et al., 2022). The efficiency of this method can be influenced by various factors, from operational parameters to the characteristics of the wastewater used. Therefore, the study aims to evaluate the performance of an EC reactor as a harvesting technology for microalgae cultivated in wastewater, investigating the impact of current intensity, reaction time, and pH on the process.

METHODOLOGY

The microalgal biomass (MB) was cultivated using domestic wastewater as the culture medium. This effluent was collected after passing through a septic tank at a wastewater treatment plant. MB production was carried out in batch mode in pilot-scale high-rate algae ponds (HRAPs). At the end of the batch, the treated domestic wastewater presented the following characteristics: 10.15 mg/L of



15. APÊNDICE IV

| Análise de variância do fator 1 (F1) | | | | | |
|---|-----------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
| Modelo | 9 | 17,6126 | 1,95696 | 14,11 | 0,000 |
| Linear | 3 | 13,9666 | 4,65553 | 33,56 | 0,000 |
| pH | 1 | 9,9468 | 9,94684 | 71,70 | 0,000 |
| CE | 1 | 1,9027 | 1,90269 | 13,71 | 0,004 |
| tempo | 1 | 2,1171 | 2,11707 | 15,26 | 0,003 |
| Quadrado | 3 | 2,9534 | 0,98446 | 7,10 | 0,008 |
| pH*pH | 1 | 0,0276 | 0,02761 | 0,20 | 0,665 |
| CE*CE | 1 | 2,9519 | 2,95189 | 21,28 | 0,001 |
| tempo*tempo | 1 | 0,0433 | 0,04333 | 0,31 | 0,589 |
| Interação com 2 Fatores | 3 | 0,6927 | 0,23089 | 1,66 | 0,237 |
| pH*CE | 1 | 0,4333 | 0,43330 | 3,12 | 0,108 |
| pH*tempo | 1 | 0,2276 | 0,22756 | 1,64 | 0,229 |
| CE*tempo | 1 | 0,0318 | 0,03181 | 0,23 | 0,642 |
| Erro | 10 | 1,3874 | 0,13874 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 0,7120 | 0,14239 | 1,05 | 0,478 |
| Erro puro | 5 | 0,6754 | 0,13508 | * | * |
| Total | 19 | 19,0000 | | | |

| Análise de variância do fator 2 (F2) | | | | | |
|---|-----------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| Fonte | GL | SQ (Aj.) | QM (Aj.) | Valor F | Valor-P |
| Modelo | 9 | 16,4781 | 1,83090 | 7,26 | 0,002 |
| Linear | 3 | 12,0905 | 4,03017 | 15,98 | 0,000 |
| pH | 1 | 3,6965 | 3,69646 | 14,66 | 0,003 |
| CE | 1 | 5,5379 | 5,53795 | 21,96 | 0,001 |
| tempo | 1 | 2,8561 | 2,85610 | 11,33 | 0,007 |
| Quadrado | 3 | 0,8736 | 0,29120 | 1,15 | 0,374 |
| pH*pH | 1 | 0,7351 | 0,73512 | 2,91 | 0,119 |
| CE*CE | 1 | 0,0004 | 0,00035 | 0,00 | 0,971 |
| tempo*tempo | 1 | 0,1953 | 0,19532 | 0,77 | 0,399 |
| Interação com 2 Fatores | 3 | 3,5140 | 1,17134 | 4,64 | 0,028 |
| pH*CE | 1 | 0,3111 | 0,31110 | 1,23 | 0,293 |
| pH*tempo | 1 | 0,3699 | 0,36994 | 1,47 | 0,254 |
| CE*tempo | 1 | 2,8330 | 2,83298 | 11,23 | 0,007 |
| Erro | 10 | 2,5219 | 0,25219 | | |
| Falta de ajuste | 5 | 1,6099 | 0,32197 | 1,77 | 0,274 |
| Erro puro | 5 | 0,9120 | 0,18240 | * | * |
| Total | 19 | 19,0000 | | | |

16. APÊNDICE V

| Caracterização - Midpoint | | | | | | |
|----------------------------------|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Categoria de impacto | de | Unidade | C1 | C2 | C3 | C4 |
| Aquecimento global | | kg CO2 eq | 0,12566 | 0,04871 | 0,94533 | 0,36624 |
| Acidificação terrestre | | kg SO2 eq | 1 | 5 | 4 | 9 |
| Eutrofização de água doce | | kg P eq | 0,00063 | 0,00021 | 0,00475 | |
| Eutrofização marinha | | kg N eq | 2 | 8 | 5 | 0,00164 |
| Ecotoxicidade terrestre | | kg 1,4-DCB | 0,00013 | | 0,00025 | 0,00024 |
| Ecotoxicidade de água doce | | kg 1,4-DCB | 1,80E-05 | 3,20E-05 | 5 | 1 |
| Ecotoxicidade marinha | | kg 1,4-DCB | 3,38E-05 | 3,55E-06 | 4 | 2,66E-05 |
| Toxicidade carcinogênica humana | | kg 1,4-DCB | 0,18477 | 1,20274 | 1,37972 | 9,04084 |
| Escassez de recursos fósseis | | kg oil eq | 0,00132 | 0,00842 | 0,00978 | 0,06321 |
| Consumo de água | | m3 | 0,00181 | 0,01136 | 0,01336 | 8 |
| | | | 4 | 8 | 6 | 0,08527 |
| | | | 0,00421 | 0,00821 | 0,03156 | 0,06164 |
| | | | 7 | 4 | 1 | 4 |
| | | | 0,03026 | 0,01268 | 0,22768 | |
| | | | 5 | 5 | 1 | 0,09537 |
| | | | 0,01256 | 0,00156 | 0,09457 | 0,01177 |
| | | | 9 | 7 | 8 | 5 |

| Normalização - Midpoint | | | | |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Categoria de impacto | C1 | C2 | C3 | C4 |
| Aquecimento global | 1,57E-05 | 6,09E-06 | 1,18E-04 | 4,58E-05 |
| Acidificação terrestre | 1,54E-05 | 5,32E-06 | 1,16E-04 | 4,00E-05 |
| Eutrofização de água doce | 2,78E-05 | 4,93E-05 | 2,08E-04 | 3,70E-04 |
| Eutrofização marinha | 7,33E-06 | 7,69E-07 | 5,52E-05 | 5,78E-06 |
| Ecotoxicidade terrestre | 1,22E-05 | 7,91E-05 | 9,08E-05 | 5,95E-04 |
| Ecotoxicidade de água doce | 5,27E-05 | 3,35E-04 | 3,88E-04 | 2,51E-03 |
| Ecotoxicidade marinha | 4,17E-05 | 2,61E-04 | 3,07E-04 | 1,96E-03 |
| Toxicidade carcinogênica humana | 4,09E-04 | 7,98E-04 | 3,06E-03 | 5,99E-03 |
| Escassez de recursos fósseis | 3,09E-05 | 1,29E-05 | 2,32E-04 | 9,73E-05 |
| Consumo de água | 4,71E-05 | 5,88E-06 | 3,55E-04 | 4,42E-05 |

17. APÊNDICE VI

| Pontuação única - <i>Endpoint</i> | | | | | |
|--|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Categoria de danos | Unidade | C1 | C2 | C3 | C4 |
| Total | mPt | 4,900 | 2,973 | 36,829 | 22,328 |
| Saúde humana | mPt | 4,608 | 2,843 | 34,632 | 21,347 |
| Ecosistemas | mPt | 0,220 | 0,108 | 1,656 | 0,811 |
| Recursos | mPt | 0,072 | 0,023 | 0,541 | 0,170 |

| Caracterização - <i>Endpoint</i> | | | | | |
|--|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Categoria de impacto | Unidade | C1 | C2 | C3 | C4 |
| Aquecimento global, Saúde humana | DALY | 1,17E-07 | 4,52E-08 | 8,78E-07 | 3,40E-07 |
| Aquecimento global, Ecosistemas terrestres | species.yr | 3,52E-10 | 1,36E-10 | 2,65E-09 | 1,03E-09 |
| Aquecimento global, Ecosistemas de água doce | species.yr | 9,61E-15 | 3,73E-15 | 7,23E-14 | 2,80E-14 |
| Depleção do ozônio estratosférico | DALY | 1,86E-10 | 1,16E-11 | 1,40E-09 | 8,69E-11 |
| Radiação ionizante | DALY | 9,97E-11 | 3,10E-11 | 7,50E-10 | 2,33E-10 |
| Formação de ozônio, Saúde humana | DALY | 2,06E-10 | 1,17E-10 | 1,55E-09 | 8,83E-10 |
| Formação de partículas finas de ozônio, Ecosistemas terrestres | species.yr | 1,33E-07 | 6,62E-08 | 1,00E-06 | 4,98E-07 |
| Acidificação terrestre | species.yr | 3,03E-11 | 1,74E-11 | 2,28E-10 | 1,31E-10 |
| Eutrofização de água doce | species.yr | 1,34E-10 | 4,63E-11 | 1,01E-09 | 3,48E-10 |
| Eutrofização marinha | species.yr | 1,21E-11 | 2,15E-11 | 9,07E-11 | 1,61E-10 |
| Ecotoxicidade terrestre | species.yr | 5,74E-14 | 6,03E-15 | 4,32E-13 | 4,53E-14 |
| Ecotoxicidade de água doce | species.yr | 2,11E-12 | 1,37E-11 | 1,57E-11 | 1,03E-10 |
| Ecotoxicidade marinha | species.yr | 9,21E-13 | 5,83E-12 | 6,78E-12 | 4,37E-11 |
| Toxicidade carcinogênica humana | species.yr | 1,91E-13 | 1,20E-12 | 1,40E-12 | 8,96E-12 |
| Toxicidade não carcinogênica humana | DALY | 1,40E-08 | 2,73E-08 | 1,05E-07 | 2,05E-07 |
| Uso da terra | DALY | 1,06E-08 | 2,93E-08 | 7,82E-08 | 2,19E-07 |
| Escassez de recursos minerais | species.yr | 2,51E-10 | 1,42E-10 | 1,89E-09 | 1,07E-09 |
| Escassez de recursos fósseis | USD2013 | 5,25E-05 | 0,000147 | 0,00039 | 0,001104 |
| Consumo de água, Saúde humana | USD2013 | 0,010015 | 0,003026 | 0,07535 | 0,022747 |
| Consumo de água, Ecosistema terrestre | DALY | 1,49E-09 | 2,26E-09 | 1,12E-08 | 1,70E-08 |
| Consumo de água, Ecosistemas aquáticos | species.yr | 3,16E-11 | 1,45E-11 | 2,38E-10 | 1,09E-10 |
| | species.yr | 2,94E-14 | 9,64E-16 | 2,22E-13 | 7,25E-15 |