

**ADRIANA PAULO DE SOUSA OLIVEIRA**

**EFEITOS DO COBRE E ZINCO NO TRATAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA  
SUINOCULTURA EM LAGOAS DE ALTA TAXA E VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA  
DA BIOMASSA VIA CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA**

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 Lúcia Calijuri

Coorientadora: Paula Peixoto Assemany

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

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

T

O48e  
2022

Oliveira, Adriana Paulo de Sousa, 1988-

Efeitos do cobre e zinco no tratamento da água residuária da suinocultura em lagoas de alta taxa e valorização energética da biomassa via carbonização hidrotérmica / Adriana Paulo de Sousa Oliveira. - Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (144 f.): il. (algumas color.).

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Civil, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.248>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico.

2. Biorremediação. 3. Biocombustíveis. 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. 628.35

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

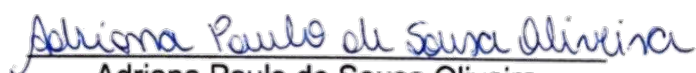
**ADRIANA PAULO DE SOUSA OLIVEIRA**

**EFEITOS DO COBRE E ZINCO NO TRATAMENTO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA  
SUINOCULTURA EM LAGOAS DE ALTA TAXA E VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA  
DA BIOMASSA VIA CARBONIZAÇÃO HIDROTÉRMICA**

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: 14 de fevereiro de 2022.

Assentimento:

  
Adriana Paulo de Sousa Oliveira  
Autora

  
Maria Lucia Calijuri  
Orientadora

*Aos meus pais Maria do Rosário e Francisco*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a Sua misericórdia me conferiu forças para prosseguir.

Aos meus pais Maria do Rosário e Francisco por tudo que fizeram por mim e por me conferir um amor genuíno. Ao meu esposo Renê por ter mudado o curso da sua vida para me acompanhar e pelo incentivo constante. Sem você eu não conseguiria dar esse passo tão importante na minha vida. Ao meu irmão Emerson pelos conselhos, direcionamento e amizade. À minha amiga Edvânia por sempre torcer por mim e por compartilhar comigo aventuras que jamais esqueerei.

À professora Lúcia pelo incentivo e motivação na busca pelo aperfeiçoamento e aprendizado. Você é fantástica por tudo que faz, é um exemplo de determinação, dedicação e competência. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos. À professora Paula por ter auxiliado na definição desse trabalho e por te acompanhado em todas as etapas. Agradeço a acolhida, carinho e acima de tudo, pela paciência. Você é uma inspiração.

Aos estagiários Mariana, Carolina, Iann, Giordanna, Lara, Mylenna, Pedro, Miriam, Bruna e Fabrício que me auxiliaram nos diferentes momentos de condução dos experimentos. Aos amigos do Sigeo por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao professor Alysson Saraiva e a todos os funcionários da Unidade de Ensino Pesquisa e Extensão em Suinocultura por permitirem a coleta da água residuária da suinocultura, pela disponibilidade em ajudar e pelo agradável convívio.

À Eliane Pereira e aos professores Jonathas Silva (UFJF), Renata Pereira (UFJF) e Érika Pinheiro (UFRRJ) por contribuírem de forma ímpar para a minha formação. À professora Maria do Carmo e professor Eduardo Couto pelas contribuições valorosas apresentadas durante a Qualificação. A todos os membros da banca examinadora pela presença e solicitude.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

OLIVEIRA, Adriana Paulo de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Efeitos do cobre e zinco no tratamento da água residuária da suinocultura em lagoas de alta taxa e valorização energética da biomassa via carbonização hidrotérmica.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri. Coorientadora: Paula Peixoto Assemany.

Nesse estudo foram avaliadas otimizações no processo integrado de cultivo de microalgas na água residuária da suinocultura (ARS) e conversão da biomassa em hidrochar. Para tanto, lagoas de alta taxa (LAT) em escala piloto foram alimentadas com ARS com diferentes teores dos micronutrientes Cu e Zn considerando misturas desses elementos e também concentrações individuais. Para as misturas (0,1 - 3,0 mg Cu/L + 0,5 - 25,0 mg Zn/L), o maior número de células de microalgas foi estabelecido em 1,8 mg Cu/L + 15,0 mg Zn/L. Quando os teores individuais de Cu (0,1 - 4,0 mg Cu/L) ou Zn (0,5 - 70,0 mg Zn/L) foram variados, a condição mais propícia para o desenvolvimento algal foi obtido em 1,0 mg Cu/L e 40 mg Zn/L. Em todos os testes realizados ficou evidente que o Cu e o Zn comprometeram a remoção de nitrogênio amoniacal enquanto a redução de fósforo solúvel foi potencializada com a adequação desses micronutrientes. A remoção de Cu na ARS tratada em LAT variou de 46 a 91% com a precipitação sendo o processo predominante, já a remoção de Zn alcançou 78 a 99% no qual a adsorção pela biomassa foi um importante mecanismo. Ao analisar a constituição bioquímica das biomassas cultivadas em diferentes teores de Cu e Zn verificou-se que o conteúdo de lipídeos neutros (> 6%) é pouco atrativo para a obtenção de biodiesel. Já os carboidratos atingiram 58,8% na biomassa seca livre de cinzas, com potencial para a conversão em hidrochar por meio da carbonização hidrotérmica (CHT). As cinzas também apresentaram concentrações expressivas (35 - 55%) sendo necessário identificar as interferências desse constituinte no processo de CHT. Para essa avaliação, quatro biomassas foram selecionadas e cada uma foi dividida em duas frações. Uma fração foi submetida ao pré-tratamento com solução ácida para redução de cinzas enquanto a outra permaneceu com o conteúdo de cinzas original. Ambas as frações foram utilizadas na CHT. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento favoreceu a recuperação de energia nos hidrochars a qual alcançou até 73,5%. Porém, as cinzas podem apresentar constituintes que atuam na hidrólise da biomassa ou como catalisadores.

Assim, as cinzas possuem efeitos indesejáveis e favoráveis na CHT e os hidrochars produzidos com e sem a redução desse constituinte são indicados para aplicações energéticas e recuperação de áreas degradadas respectivamente.

Palavras-chave: Bioremediação. Recuperação de nutrientes. Bioenergia.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Adriana Paulo de Sousa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Effects of copper and zinc in swine wastewater treatment in high-rate algae ponds and biomass energy recovery through hydrothermal carbonization.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri. Co-adviser: Paula Peixoto Assemany.

Optimizations in the integrated process of microalgae cultivation in swine wastewater (SW) and subsequent biomass conversion into hydrochar were evaluated. For this purpose, pilot-scale high-rate algae ponds were fed with SW with different Cu and Zn contents considering mixtures of these elements and individual concentrations. For the mixtures (0.1 - 3.0 mgCu/L + 0.5 - 25.0 mgZn/L), algal growth was favored at a dose of 1.8 mgCu/L + 15.0 mgZn/L. When only Cu concentration was tested (0.1 - 4.0 mgCu/L) the most favorable condition was obtained at 1.0 mgCu/L. Meanwhile, for different Zn contents (0.5 - 70.0 mgZn/L), a stimulatory effect on algal growth was observed in the 40.0 and 55.0 mg Zn/L treatments. Cu and Zn compromised the removal of ammonia nitrogen while soluble phosphorus removal was enhanced in all tests performed. In Cu removal (46 - 91%), precipitation was predominant, while in Zn removal (78 - 99%), adsorption by biomass was an important mechanism. When analyzing the biochemical constitution of biomass grown in different levels of Cu and Zn it was found that the content of neutral lipids (> 6%) is unattractive for obtaining biodiesel. The carbohydrates reached 58.8% in ash-free dry biomass, with potential for conversion into hydrochar by hydrothermal carbonization (HTC). The ash also showed significant concentrations (35 - 55%) being necessary to identify the interference of this constituent in the HTC process. For this evaluation, four biomasses were selected and each one was divided into two fractions. One fraction was submitted to pre-treatment with acid solution for ash reduction while the other remained with the original ash content. Both fractions were used in the HTC. The results demonstrated that pre-treatment favors energy recovery in hydrochars, which reached up to 73.5%. However, the ash may present constituents that act in the hydrolysis of biomass or as catalysts. Thus, the ash can present undesirable and favorable effects in HTC and the the hydrochars produced with and without the reduction of this constituent are indicated for energy applications and recovery of degraded areas, respectively.

Keywords: Bioremediation. Nutrient recovery. Bioenergy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 – Model that describes the number of cells of <i>Chlorella</i> sp. as a function of the different concentrations of Cu and Zn. The red dots refer to the number of cells quantified in each treatment .....	31
Figura 4.2 – Concentration of chlorophyll a obtained during the monitoring of the development of microalgae cultivated in SW with different Cu and Zn concentrations .....	32
Figura 4.3 – Effects of different concentrations of Cu and Zn on the levels of volatile suspended solids monitored during the treatment of SW in HRAPs.....	34
Figura 4.4 – pH (A and B) and oxygen saturation (C and D) recorded during the operation of HRAPs fed with SW with different Cu and Zn concentrations.....	35
Figura 4.5 – Soluble chemical oxygen demand variation during the operation of HRAP fed with SW with different Cu and Zn concentrations.....	36
Figura 4.6 – Percentages of nitrogen forms in high rate algal ponds treating swine wastewater with different Cu and Zn concentrations.....	38
Figura 4.7 – Reaction rate for ammonia nitrogen ( $k_{NH_4^+}$ ) obtained through first-order kinetics. $k_{NH_4^+}$ were quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAPs. The red dots refer to the $k_{NH_4^+}$ quantified in each treatment.....	39
Figura 4.8 – Soluble phosphorus monitored during the operation of HRAPs fed with SW with different Cu and Zn concentrations.....	40
Figura 4.9 – Reaction rate for soluble phosphorus ( $k_{Ps}$ ) obtained through first-order kinetics. $k_{Ps}$ were quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAP. The red dots refer to the $k_{Ps}$ quantified in each treatment.....	41
Figura 4.10 – Capacity to remove Cu ( $q_{Cu}$ ) (A) and Zn ( $q_{Zn}$ ) (B) quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAP. The red dots refer to the $q_{Cu}$ and $q_{Zn}$ quantified in each treatment.....	43
Figura 5.1 – Concentração de clorofila a durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2). .....	61
Figura 5.2 – Variações do pH (A) e saturação de oxigênio (B) durante a operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.....	63
Figura 5.3 – Variação das concentrações de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e taxa de remoção durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2) .....	64

Figura 5.4 – Balanço de massa para as diferentes formas de N quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuárias da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.....	65
Figura 5.5 – Variação das concentrações de Ps e taxa de remoção durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2). .....	66
Figura 5.6 – Balanço de massa para as diferentes formas de P quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuárias da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.....	67
Figura 5.7 – Efeitos do estresse ambiental externo induzido pelo Cu na remoção de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> e Ps.....	68
Figura 5.8 – Variações de Cu dissolvido durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2).....	68
Figura 5.9 – Balanço de massa para as diferentes formas de Cu quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuárias da suinocultura.....	69
Figura 6.1 – Clorofila a (A) e carotenoides totais (B) quantificados durante o cultivo de microalgas em diferentes concentrações de Zn. Concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (C) e MDA (D) quantificados na biomassa que se desenvolveu em lagoas de alta taxa alimentada com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Zn (n=2). .....	88
Figura 6.2 – Concentração de nitrogênio amoniacal (A), nitrato (B), fósforo dissolvido (C), demanda química de oxigênio dissolvida (D) e substâncias poliméricas extracelulares na forma de proteínas (E) e carboidratos (F) quantificadas durante o cultivo de microalgas em diferentes concentrações de Zn (n=2).....	92
Figura 6.3 – Balanço de massa para as diferentes formas de Zn quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuárias da suinocultura.....	94
Figura 7.1 – Fluxograma da metodologia adotada.....	109
Figura 7.2 – Recuperação de sólidos (A), poder calorífico superior (B), teor de cinzas (%) e recuperação de energia (%) determinados para hidrochars produzidos a partir de biomassa de microalgas (n=3, barras verticais representam o desvio padrão). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.....	114
Figura 7.3 – Diagrama de van Krevelen e as razões atômicas H/C e O/C das biomassas e hidrochars. Os valores referentes aos hidrochars correspondem a média de três repetições (n=3).....	116

Figura 7.4 – Difratoogramas de raios-X determinados nas biomassas brutas (A), após redução de cinzas (B) e os respectivos hidrochars H-B (C) e H-DB (D). \* CaCO<sub>3</sub>, o C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>Na, ¨ C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, + SiO<sub>2</sub>, ^ Fe(PO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, x relacionado ao Mg, # NaCl..... 119

Figura 7.5 – Microscopia eletrônica de varredura obtida para as biomassas brutas (A-D), após redução de cinzas (E-G) e os respectivos hidrochars H-B (I-L) e H-DB (M-P) ..... 121

Figura 7.6 – Espectros FT-IR de biomassas brutas (A), após redução de cinzas (B) e os hidrochars correspondentes H-B (C) e H-DB (D)..... 122

Figura 7.7 – Caracterização da fase aquosa obtida após a CHT para as biomassas de microalgas com e sem o pré-tratamento para a remoção de cinzas..... 126

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Physical and chemical characterization of swine wastewater (SW) used as a microalgae growth medium in high rate algal ponds.....	26
Tabela 4.2 – Productivity of chlorophyll a during microalgae cultivation in SW with different Cu and Zn concentrations.....	33
Tabela 4.3 – Concentrations of proteins, carbohydrates, and lipids quantified in dry ash-free biomass cultivated in SW with different concentrations of Cu and Zn.....	45
Tabela 5.1 – Caracterização da água residuária da suinocultura coletada na lagoa aerada e utilizada como meio de cultivo de microalgas.....	57
Tabela 5.2 – Concentração de proteínas, carboidratos, lipídeos e carotenoides quantificados na biomassa seca livre de cinzas cultivada na água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2).....	71
Tabela 6.1 – Composição bioquímica da biomassa após o cultivo em diferentes concentrações de Zn (n=2).....	96
Tabela 7.1 – Caracterização bioquímica das biomassas utilizadas nos testes de carbonização hidrotérmica.....	112
Tabela 7.2 – Caracterização dos hidrochars obtidos após a aplicação da carbonização hidrotérmica. Os valores são referentes as médias (n=3).....	123

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato.
ARS	Água residuária da suinocultura.
ATP	Adenosina trifosfato.
B	Biomassa sem o pré-tratamento para remoção de cinzas.
C	Concentração de nutriente.
C <sub>0</sub>	Concentração inicial de nutriente.
CE	Condutividade elétrica.
chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i> .
CHT	Carbonização hidrotérmica.
DB	Biomassa após a redução de cinzas.
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio.
DQO	Demanda química de oxigênio.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio.
H-B	Hidrochar derivado de B.
H-DB	Hidrochar derivado de DB.
k	Taxa de reação.
kN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Taxa de reação do nitrogênio amoniacal.
kPs	Taxa de reação do fósforo solúvel.
LAT	Lagoa de alta taxa.
m <sub>biomassa</sub>	Massa de biomassa.
m <sub>char</sub>	Massa do hidrochar.
MDA	Malondialdeído.
NaOH	Hidróxido de sódio.
NH <sub>3</sub>	Amônia.
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio amoniacal.
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato.
Norg	Nitrogênio orgânico.
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl.
OD	Oxigênio dissolvido.
Phidro	Fósforo hidrolisável.
Porg	Fósforo orgânico.

Pr	Fósforo reativo.
Ps	Fósforo solúvel.
q	Capacidade de remoção de metal.
Q	Estresse ambiental externo.
qCu	Capacidade de remoção de cobre.
qZn	Capacidade de remoção de zinco.
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação.
Re	Recuperação de energia.
RNA	Ácido ribonucleico.
Rs	Rendimento de sólidos.
SPE	Substâncias poliméricas extracelulares.
SSF	Sólidos suspensos fixos.
SST	Sólidos suspensos totais.
SSV	Sólidos suspensos voláteis.
t	Tempo.
UEPE	Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Suinocultura.
UFV	Universidade Federal de Viçosa.
V	Volume.
W	Massa de biomassa seca.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. HIPÓTESES DE PESQUISA.....	21
3. OBJETIVO GERAL.....	22
4. ARTIGO I. Swine wastewater treatment in high rate algal ponds: effects of Cu and Zn on nutrient removal, productivity and biomass composition*.....	23
4.1. Introduction.....	23
4.2. Materials and Methods.....	25
4.2.1. Experimental conditions.....	26
4.2.2. Variables monitored during the operation of HRAPs.....	27
4.2.3. Identification and quantification of microalgae.....	29
4.2.4. Biochemical characterization of the obtained biomass.....	29
4.2.5. Statistical analysis.....	30
4.3. Results and Discussion.....	30
4.3.1. Biomass development.....	30
4.3.2. Environmental variables.....	34
4.3.3. Removal of organic matter and nutrients.....	36
4.3.4. Removal of metals.....	42
4.3.5. Biomass composition.....	43
4.4. Conclusion.....	46
4.5. Formatting of funding sources.....	46
References.....	46
5. ARTIGO II. Efeitos do cobre na constituição da biomassa microalgal e na remoção de nutrientes durante o tratamento de água residuária da suinocultura em lagoas de alta taxa.....	53
5.1. Introdução.....	53
5.2. Materiais e Métodos.....	56
5.2.1. Água residuária da suinocultura (ARS).....	56
5.2.2. Operação das lagoas de alta taxa.....	57
5.2.3. Avaliação da remoção de nutrientes.....	58
5.2.4. Avaliação da remoção de cobre.....	59
5.2.5. Caracterização bioquímica da biomassa produzida.....	59
5.2.6. Análises estatísticas.....	60
5.3. Resultados e Discussão.....	60

5.3.1.	Produção de biomassa.....	60
5.3.2.	Variações do pH e saturação de oxigênio .....	62
5.3.3.	Remoção de nitrogênio e fósforo .....	63
5.3.4.	Remoção de cobre .....	68
5.3.5.	Composição bioquímica da biomassa .....	71
5.4.	Conclusão .....	74
6.	ARTIGO III. Tratamento da água residuária da suinocultura à base de microalgas para remoção de micropoluentes: desempenho de lagoas de algas de alta taxa operadas com diferentes concentrações de zinco.....	81
6.1.	Introdução .....	81
6.2.	Materiais e Métodos.....	83
6.2.1.	Água residuária da suinocultura .....	83
6.2.2.	Lagoas de alta taxa .....	84
6.2.3.	Monitoramento das lagoas de alta taxa.....	85
6.2.4.	Ánálises estatísticas .....	87
6.3.	Resultados e Discussão.....	87
6.3.1.	Crescimento algal e indicadores de dano oxidativo .....	87
6.3.2.	Varição nas concentrações de nutrientes e matéria orgânica .....	89
6.3.3.	Remoção de zinco.....	94
6.3.4.	Composição bioquímica da biomassa .....	95
6.4.	Conclusão .....	97
7.	ARTIGO IV. Carbonização hidrotérmica de microalga cultivada em água residuária: uma abordagem sobre os efeitos das cinzas .....	104
7.1.	Introdução .....	104
7.2.	Materiais e Métodos.....	107
7.2.1.	Biomassas .....	107
7.2.2.	Remoção de cinzas .....	107
7.2.3.	Carbonização hidrotérmica.....	108
	Figura 7.1: Fluxograma da metodologia adotada.....	109
7.2.4.	Caracterização das biomassas, hidrochars e fase aquosa .....	109
7.2.5.	Ánálises estatísticas .....	111
7.3.	Resultados e Discussão.....	111
7.3.1.	Caracterização inicial das biomassas.....	111
7.3.2.	Carbonização hidrotérmica.....	113
7.3.3.	Caracterização da fase aquosa .....	126
7.3.4.	Conclusão .....	128

8.	CONCLUSÕES GERAIS .....	135
9.	RECOMENDAÇÕES .....	136
	REFERÊNCIAS .....	137
	APÊNDICE A.....	141
	APÊNDICE B.....	142
	APÊNDICE C .....	143
	ANEXO A .....	144

## APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa integra os estudos realizados no Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas (SIGEO<sub>n</sub>PA), do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que desenvolve pesquisas visando o tratamento de efluentes concomitante com a produção de biomassa algal para posterior conversão em biocombustíveis. Essa pesquisa também tem sua origem no projeto “Recuperação de energia no saneamento ambiental: microalgas para biorremediação de efluentes e produção de bioenergia”, aprovado em 2019 junto ao CNPq edital n°28/2018, processo 420429/2018-2.

Esse documento foi estruturado em 4 Capítulos relacionados com a pesquisa desenvolvida. No primeiro capítulo estão apresentados os resultados referentes à avaliação de diferentes misturas de Cu e Zn no cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa (LATs) alimentadas com água residuária da suinocultura (ARS). Por meio de curvas de superfície resposta foi possível analisar as interferências desses elementos no número de células, nas taxas de remoção de nutrientes, na capacidade de remoção de metais e na composição bioquímica da biomassa. Os resultados foram publicados no Journal of Environmental Management.

No segundo e terceiro capítulos foram identificados os efeitos das concentrações individuais de Cu e Zn, respectivamente, no cultivo de microalgas em LATs alimentadas com ARS. Essa avaliação ocorreu por meio do monitoramento do crescimento das microalgas e aplicação de balanços de massas referentes as diferentes formas de N, P, Cu e Zn. Além disso, no segundo capítulo estão apresentados os resultados da aplicação de modelos matemáticos que possibilitaram identificar a dose máxima de Cu que compromete minimamente a remoção de nutrientes. No terceiro capítulo estão apresentados resultados adicionais referentes ao estresse oxidativo e a correlação entre a produção de substâncias poliméricas extracelulares e demanda química de oxigênio.

A partir dos resultados obtidos nos capítulos anteriores verificou-se que o Cu e o Zn contribuíram para acréscimos os teores de cinzas nas biomassas. Os efeitos favoráveis e indesejáveis desse comportamento na conversão da biomassa algal em bioenergia foram identificados. Para tanto, a carbonização hidrotérmica (CHT) com e sem pré-tratamento para redução no conteúdo de cinzas foi adotada e os resultados estão apresentados no quarto capítulo

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos que além da importância na cadeia trófica e na atuação como sumidouros dos gases de efeito estufa, tornaram-se também fonte de biomassa e biomoléculas. Entre os produtos obtidos da biomassa algal, a conversão em bioenergia se destaca uma vez que a demanda crescente por energia constitui uma preocupação global (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Outra característica das microalgas consiste na capacidade de tratar efluentes por meio da assimilação de nutrientes e por fornecer o oxigênio para a degradação biológica da matéria orgânica (BHATIA et al., 2021). Superar o déficit hídrico mundial é um dos principais desafios sociais e econômicos do século 21 (MORILLAS-ESPAÑA et al., 2021) sendo urgente o tratamento dos efluentes e a redução da contaminação dos recursos hídricos. No entanto, o tratamento de efluentes é um processo dispendioso o que requer proposições viáveis economicamente (BHATIA et al., 2021). As microalgas podem compor as soluções para superar esses desafios por permitir a obtenção de biomassa com valor agregado.

Todas essas possibilidades da biotecnologia das microalgas estão em consonância com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. Contudo, esforços significativos são necessários para otimizar o sistema integrado de tratamento de efluentes, produção de biomassa e conversão em bioenergia (BHATIA et al., 2021; SALAMA et al., 2017). Entre eles, é necessário aumentar a produtividade algal. Nos reatores de cultivo operados com esgoto doméstico, como as lagoas de alta taxa (LATs), a produtividade geralmente não ultrapassa 40 g/m<sup>2</sup>.dia (PARK; CRAGGS, 2011; RANJAN; GUPTA; GUPTA, 2019), este valor máximo é cerca de 2x menor que o potencial teórico determinado para as condições ideais (77 g/m<sup>2</sup>.dia) (MELIS, 2009). A baixa produtividade aumenta o consumo de recursos e energia envolvidos no cultivo e processamento de biomassa o que torna o biocombustível oneroso (CHEN; ZHAO; QI, 2015).

Entre os principais fatores controladores do crescimento das microalgas tem-se as condições de luminosidade e temperatura, disponibilidade de sílica e concentrações dos macronutrientes. Para esses fatores foram realizadas diversas pesquisas que permitiram identificar as condições mais adequadas (MARTÍNEZ; JIMÉNEZ; EL YOUSFI, 1999; MENEGOL et al., 2017; MILITÃO et al., 2019; MOHAMAD et al., 2017; RAS; STEYER; BERNARD, 2013). Por exemplo, para os

macronutrientes foi observado que diferentes efluentes podem apresentar uma relação proporcionalmente desequilibrada entre os teores de C, N e P. Para esses casos, algumas estratégias foram aplicadas como a suplementação de CO<sub>2</sub> para compensar a limitação de C e a mistura de diferentes águas residuárias para corrigir as deficiências de N ou P (ASSIS et al., 2019; MOHSENPOUR et al., 2021; PASKULIAKOVA et al., 2018; POSADAS et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2016; ZHENG et al., 2018). Portanto, existem formas bem estabelecidas para ajustar a composição das águas residuárias em termos de macronutrientes.

No entanto, a presença dos micronutrientes nas águas residuárias é uma característica menos explorada no contexto da biotecnologia de microalgas. Estudos conduzidos em ecossistemas marinhos demonstraram que a produtividade algal estava relacionada com a disponibilidade de micronutrientes como o cobre (Cu) e zinco (Zn) (COALE, 1991; STERNER, 1994; SUNDA; HUNTSMAN, 1996). A mesma abordagem pode ser adotada para potencializar o crescimento algal em LATs. O Cu atua no transporte de elétrons e o Zn compoem enzimas de assimilação de CO<sub>2</sub> e P (LI et al., 2018, 2020b). Logo, ajustar os teores de C e P pode não ser suficientes para maximizar o crescimento das microalgas se a possível limitação de Zn também não for corrigida.

Apesar da importância desses elementos para o desenvolvimento das microalgas, os estudos se dedicaram em avaliar os efeitos tóxicos (BAYSAL; OZBEK; AKM, 2013; DOSHI et al., 2008; NOVÁK et al., 2020; SANGJUMRAS et al., 2018; ZERAATKAR et al., 2016; ZINICOVSCAIA et al., 2015). A possibilidade de causar alterações nos ciclos bioquímicos e conferir riscos ecológicos são fatores que motivam e justificam essas investigações. No entanto, a presente pesquisa pretende, de uma forma mais abrangente, investigar os efeitos negativos e positivos do Cu e Zn no cultivo de microalgas em LATs alimentadas com água residuária.

A água residuária da suinocultura (ARS) é adequada para essa avaliação por ser reconhecida em apresentar concentrações elevadas de Cu e Zn (0,8 a 59,4 mg Cu/L e 0,5 a 234,1 mg Zn/L) (CHENG et al., 2019; ZENG et al., 2021). Na ARS o Cu e o Zn têm origem na ração fornecida aos suínos pois são considerados promotores do crescimento, sendo reportados teores entre 0,15 a 0,25 g Cu e de 1 a 3 g Zn por quilo de ração (HEJNA et al., 2021). Assim, o cultivo de microalgas na ARS possibilita uma exploração dos efeitos do Cu e Zn na dinâmica de tratamento e produção de biomassa nas LATs de forma realista. Ademais, permite verificar a capacidade desse

sistema em remover os metais. A avaliação do desempenho da biotecnologia de microalgas no tratamento de águas residuárias ocorre predominantemente por meio da remoção de matéria orgânica e nutrientes (AGUIRRE et al., 2011; ASSIS et al., 2017; DELGADILLO-MIRQUEZ et al., 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017; KEBEDE-WESTHEAD; PIZARRO; MULBRY, 2006; LUO et al., 2016). Enquanto as informações sobre o desempenho e mecanismos envolvidos na remoção de metais são escassas.

Determinar essa capacidade é necessário para consorciar um aumento na produtividade de biomassa com a adequação do efluente aos padrões ambientais. Além disso, ao identificar a atuação dos microrganismos cultivados nas LATs na remoção de metais é possível avaliar as transferências desses elementos para biomassa e as implicações nas rotas de valorização energética. Devido as interações entre os metais, as microalgas, demais microrganismos e matéria orgânica presentes nas LATs, espera-se que a biomassa produzida apresente esses elementos em sua constituição. Essa incorporação pode ser atribuída as precipitações que podem ocorrer durante o tratamento e a sorção pela biomassa. Essa característica, juntamente com a presença dos demais compostos inorgânicos presentes no efluente, contribui para acréscimos nos teores de cinzas, sendo reportados porcentagens de até 62% (URRUTIA; YAÑEZ-MANSILLA; JEISON, 2019).

As cinzas podem reduzir o poder calorífico dos combustíveis e contribuir para a incrustação, corrosão e formação de escória (HESS et al., 2019; LIU et al., 2019; MARIN-BATISTA et al., 2019). Por outro lado, os processos de conversão das microalgas em biocombustível como a gaseificação e a liquefação hidrotérmica foram potencializados por constituintes que integram as cinzas devido a ação catalisadora (CHEN et al., 2017; HOGNON et al., 2014). Para uma melhor compreensão desses efeitos é essencial conhecer a composição das cinzas e avançar nas pesquisas considerando as interferências nos demais processos de obtenção de biocombustível de microalgas, como a carbonização hidrotérmica (CHT).

Na CHT é possível obter hidrochar, um material rico em carbono e que pode ser utilizado como combustível sólido. A CHT converte predominantemente carboidratos em hidrochar (LI et al., 2019), sendo este um dos principais constituintes da biomassa cultivada na ARS (20 a 58%) (CHENG et al., 2019; SILVEIRA et al., 2021). Assim, o cultivo de microalgas na ARS seguido de CHT pode ser considerado um processo integrado e sinérgico que pode conferir maiores possibilidades de

sucesso no tratamento de efluentes, produção de biomassa e obtenção de bioenergia. Contudo, poucos estudos foram encontrados na literatura referente a CHT de microalgas cultivada em ARS (MARIN-BATISTA et al., 2019) o que demonstra que as pesquisas referentes ao tema ainda estão em andamento e são poucas as informações reportadas na literatura. Entre elas, tem-se a necessidade de investigar os efeitos indesejáveis e favoráveis das cinzas (CASTRO et al., 2021; LIU et al., 2019). As cinzas são inerentes na biomassa e a identificação das interferências na CHT permitirão o desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias e equipamentos destinados a obtenção de biocombustível de microalgas.

Diante do exposto, sobre o que já foi realizado para aumentar a produção de microalgas em águas residuárias, sobre o que é aplicável em termos práticos e considerando o aprimoramento das metodologias que ainda precisam ser avaliadas quanto a CHT, propõe-se nesse estudo a otimização da produção e valorização energética da biomassa de microalgas cultivada em água residuária.

## **2. HIPÓTESES DE PESQUISA**

- Ajustes nas concentração de Cu e Zn podem ser utilizados para compor uma estratégia para otimizar o desempenho das lagoas de alta taxa no que se refere a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e metais (cobre e zinco) e produção de biomassa;
- As lagoas de alta taxa podem ser aplicadas como unidades de tratamento para a remoção de cobre e zinco presentes na água residuária da suinocultura;
- A adequação de cobre e zinco na água residuária da suinocultura pode promover um acréscimo no conteúdo de cinzas da biomassa;
- O pré-tratamento para redução do conteúdo de cinzas pode potencializar a recuperação de energia presente na biomassa.
- A carbonização hidrotérmica pode ser aplicada como rota de valorização energética da biomassa cultivada na água residuária da suinocultura com adequação de cobre e zinco após a redução no conteúdo de cinzas.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de microalgas em diferentes concentrações de cobre e zinco presentes na água residuária da suinocultura utilizada como meio de cultivo e avaliar as interferências das cinzas presentes na biomassa no processo de carbonização hidrotérmica.

#### **Objetivos específicos**

- Avaliar as interferências dos elementos cobre e zinco no crescimento das microalgas considerando misturas desses elementos e também variações nas concentrações individuais;
- Determinar a produção e composição bioquímica da biomassa cultivada em água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de cobre e zinco;
- Avaliar a remoção de nutrientes (nitrogênio e fósforo), matéria orgânica e metais (cobre e zinco) da água residuária da suinocultura tratada em lagoas de alta taxa;
- Analisar a composição das cinzas presentes na biomassa de microalgas cultivada na água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de cobre e zinco;
- Identificar o pré-tratamento para redução nos teores de cinzas;
- Avaliar as interferências da inclusão do pré-tratamento para redução de cinzas no rendimento e nas características dos produtos da carbonização hidrotérmica.

#### 4. ARTIGO I. Swine wastewater treatment in high rate algal ponds: effects of Cu and Zn on nutrient removal, productivity and biomass composition\*

**Abstract:** This study aimed to evaluate the simultaneous interferences of Cu and Zn found in swine wastewater (SW) in the development of microalgae considering real conditions of cultivation in high rate algal ponds (HRAPs). Ten HRAPs on a pilot scale were fed with SW with different mixtures of Cu (0.5 to 3.0 mg/L) and Zn (5.0 to 25.0 mg/L). The interferences of these metals in removing nutrients (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and soluble phosphorus (Ps)) from the SW were determined. In addition, this study evaluated the effects on biomass growth and biochemical composition. *Chlorella* sp. was dominant in all HRAPs and the condition that potentiated its growth occurred in medium containing 1.8 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L, while higher concentrations conferred inhibition. Only Cu compromised the removal rates of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> while the effects of Zn were not significant. Contrary, Zn interfered with Ps removal rates, but the impact of Cu was not significant. The greatest Cu applications increased the protein levels by biomass (50.5 to 55.2%). Carbohydrate accumulation was favored by conditions that inhibited the development of microalgae due to either limitation or excess of metals. Copper and Zn compromised the levels of lipids, and the control treatment had the highest content (24.5%). The presence of Cu and Zn changed the dynamics of HRAPs.

**Keywords:** *Chlorella* sp.; bioremediation; nutrient recovery; agroindustrial effluent.

##### 4.1. Introduction

The supply of water and energy is essential for human and economic development. Thus, technological alternatives that make it possible to combine renewable energy generation in a systematic and coordinated approach with the protection of water resources are urgent. In this scenario, the cultivation of microalgae in wastewater has gained notoriety. As they develop, microalgae assimilate the nutrients from the wastewater and provide oxygen, allowing biological oxidation of organic matter and effluent treatment. The microalgae biomass produced in this process can be used as a source of bioenergy (FALLAHI et al., 2021; SINGH et al., 2021) or other value-added products.

\* ANEXO A

However, several contaminants are present in wastewater. They can act as inhibitors of algal growth and consequently limit the integrated wastewater treatment system, biomass production, and bioenergy production. Heavy metals are among the biologically toxic compounds. Various wastewater such as those of industrial origin (metallurgical, mining, textile, tannery, among others) and agroindustry (cattle, swine) have metals in their composition (BURAKOV et al., 2018; HEJNA et al., 2021). The most common elements in these effluents include copper (Cu) and zinc (Zn) (AKPOR, 2014; HEJNA et al., 2021). For example, swine farming uses Cu and Zn as feed additives; therefore, swine wastewater (SW) has high concentrations of these elements, reaching up to 13.5 mg Cu/L and 94.0 mg Zn/L (CESTONARO DO AMARAL et al., 2014).

Copper and Zn are critical elements in algae cultivation (GEDDIE; HALL, 2019). The excess of these metals can cause the formation of reactive oxygen species, which can damage various biochemical components of cells. On the other hand, Cu and Zn in low concentrations are essential for the microalgae development. Copper is an important component of the photosynthetic apparatus, being responsible for transferring electrons from photosystems II to I (MIAZEK et al., 2015; YONG et al., 2020). Zinc, in turn composes several essential enzymes for the development of microalgae, such as alkaline phosphatase that acts on the absorption of P and carbonic anhydrase that integrates the CO<sub>2</sub> transport and fixation system (BAŚCIK-REMISIEWICZ et al., 2009).

Therefore, the success of microalgae cultivation for biotechnological applications is associated with the adequacy of Cu and Zn levels, but literature little explores this topic. Establishing the concentrations of these elements that stimulate and inhibit microalgae growth is necessary to propose the conditions to maximize algal productivity and increase effluent treatment efficiency. Besides, metals can affect the biochemical composition of biomass resulting in altered levels of carbohydrates, lipids, and proteins (ERMIS et al., 2020; MIAZEK et al., 2015; YANG et al., 2015).

Recent research conducted on lab scale and controlled conditions found that SW with a concentration above 1.0 mg Zn/L inhibited in the growth of microalgae *Coelastrella* sp. This same behavior was not observed for the protein content, which improved from 0.09 to 0.21 g/g, with Zn concentrations from 0.5 to 8.0 mg Zn/L in the medium (LI et al., 2020). Similarly, an increase in Cu concentrations in SW from 0.1 to 3.0 mg Cu/L reduced the concentration of *Coelastrella* sp. by about 55% and the

protein content in biomass by 35%. The removal of ammonia nitrogen was also altered, from 61.6 to 38.6%, and phosphorus reduced from 70.5 to 12.6% (LI et al., 2018).

These studies demonstrate the importance of understanding the complex interactions between the microalgae physiology and the presence of metals in wastewater. Thus, further research efforts are necessary in order to assess the simultaneous interference of Cu and Zn in the wastewater. The metals co-occur in the SW, but the effects of this mixture on microalgae growth are not well known and cannot be predicted considering the toxicity of the elements individually and without knowing the dominant microalgae species. In addition, simplified strategies that consist in the use of filtered and autoclaved effluents do not portray the complex and heterogeneous composition of the SW. Furthermore, they also disregard the critical role of other microorganisms present in the effluent, which can interfere with the effects of Cu and Zn. These simplified systems also do not correspond to the actual cultivation conditions in large reactors such as high rate algal ponds (HRAP). The scarcity of studies using this approach limits the identification of trends and the consolidation of information.

Given these gaps, the objectives of this study were to (i) identify the concentrations of Cu and Zn that inhibit and promote the development of microalgae, (ii) evaluate the interferences of these elements in the removal of nutrients and organic matter from the SW treated in HRAP, (iii) determine the removal of the metals Cu and Zn from the SW treated in HRAP and (iv) quantify the productivity and composition of the biomass cultivated in the SW with different concentrations of these metals. For a realistic analysis, the experimental unit comprised ten outdoor HRAPs. Each HRAP was operated with SW with different mixtures of Cu and Zn. The interferences of these elements in microalgae growth were identified using a response surface curve, which allowed the establishment of conditions that enhance the treatment and resources recovery from SW.

## **4.2. Materials and Methods**

The experiment was conducted outside of the Laboratory of Sanitary and Environmental Engineering at the Federal University of Viçosa, Brazil (20° 45' 37" S 42° 52' 04" O) during August 2020 (APÊNDICE A). This month corresponds to the winter, characterized by a dry period. During the experiment period, the accumulated

daily precipitation was equal to 0.0 mm. The average air temperature was 18.2 to 24.1°C, and the average solar radiation was 836.9 kJ/m<sup>2</sup>.

#### 4.2.1. Experimental conditions

Ten HRAPs on a pilot scale were used as experimental units with the following dimensions: 1.28 m wide, 2.86 m long, a surface area of 3.3 m<sup>2</sup>, and a useful depth of 0.30 m. These ponds were made of fiberglass with six-blade steel paddlewheels moved by a 1 hp electric motor that maintains the effluent speed between 0.10 m/s and 0.15 m/s. So, the revolving of the medium and the exposure of microalgae to sunlight were guaranteed.

The HRAPs were operated in batches using the SW from the Teaching, Research, and Extension Unit in Swine Farming from the Department of Animal Science at UFV. In this unit, sixty matrices are maintained in the intensive confinement system with a complete production cycle. The SW generated in the cleaning of the facilities is directed to an anaerobic biodigester and aerated pond. The last unit was the SW collection site used in this study (Table 4.1).

**Table 4.1.** Physical and chemical characterization of swine wastewater (SW) used as a microalgae growth medium in high rate algal ponds.

Variable	Value	Variable	Value
pH	8.56	Ps (mg/L)	18.7
CODt (mg/L)	436.8	EC (mS/cm)	3.9
CODs (mg/L)	209.7	Total alkalinity (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	1960.0
BOD (mg/L)	120.0	TSS (mg/L)	228.0
TKN (mg/L)	595.9	VSS (mg/L)	58.0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	82.0	FSS (mg/L)	170.0
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	435.3	Cu (mg/L)	0.1
Pt (mg/L)	25.8	Zn (mg/L)	0.5

All analyzes were performed according to APHA (2017). CODt: total chemical oxygen demand. CODs: soluble chemical oxygen demand. BOD: biochemical oxygen demand. TKN: total Kjeldahl nitrogen. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: nitrate. N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: ammonia nitrogen. Pt: total phosphorus. Ps: soluble phosphorus. EC: Electric conductivity. TSS: total suspended solids. VSS: volatile suspended solids. FSS: fixed suspended solids.

The central composite design-centered face ( $\alpha = 1$ ) was used to identify the interferences of different Cu and Zn concentrations in HRAP performance. This methodology proved to be efficient in evaluating the effects of mixing metals on microalgae growth, simultaneously enabling a low consumption of time and resources to carry out the experiments (SINGH et al., 2016; SONG et al., 2012). The

concentrations varied between 0.5 and 3.0 mg Cu/L and from 5.0 to 25.0 mg Zn/L, which were defined considering the environmentally relevant concentrations. An additional HRAP was operated without the addition of Cu and Zn, used as a control.

First, volumes of 800 L of SW and 100 L of inoculum were added to each HRAP. The inoculum consists of mixed biomass previously cultivated in a HRAP fed with SW operated in batch for 15 days. The biomass was composed of different microorganisms, such as bacteria, protozoa, and microalgae, and presented a total suspended solids equal to 480.0 mg/L and chlorophyll *a* concentration of 2.4 mg/L. According to classification system of Chlorophyceae, only the genus *Chlorella* sp. was observed (BICUDO; MENEZES, 2006). Then, the concentrations of Cu and Zn were added. Stock solutions of copper chloride (200 g/L) and zinc chloride (300 g/L) were previously prepared and used to promote each HRAP concentration established in the central composite design.

#### **4.2.2. Variables monitored during the operation of HRAPs**

HRAPs were operated until the chlorophyll *a* (chl *a*) levels decreased. Chl *a* contents were determined every two days by extraction with 80% hot ethanol as previously described in the Dutch standard (NEDERLANDS NORM, 1981), based on Nush (1980). During this period, pH, temperature, and dissolved oxygen (DO) concentration were determined daily, at 12 and 1 pm, and *in situ* using a Hach multiparameter probe model HQ30D/LDO.

The concentrations of volatile suspended solids (VSS), soluble phosphorus (Ps), soluble chemical oxygen demand (CODs), ammonia nitrogen (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), and total Kjeldahl nitrogen (TKN) were quantified every two days, following the procedures described in APHA (2017). The concentrations of organic nitrogen (Norg) were obtained through the difference between TKN and N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Un-ionized ammonia (NH<sub>3</sub>) was quantified from the concentrations of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and the values of temperature and pH, as presented by Uggetti et al. (2014). Nitrite concentrations were not determined because this compound undergoes rapid oxidation to NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and may not be found in appreciable quantities. The different forms of N quantified in this study (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Norg, and NH<sub>3</sub>) were used in the mass balance considering that the sum

of these compounds was equal to 100%, the concentrations were normalized for each day of monitoring.

At the beginning and the end of the experiment, the soluble and total Cu and Zn concentrations were quantified. Such analyzes occurred through digestion followed by reading on an atomic absorption spectrophotometer (Varian SpectraAA 1000). The concentrations of total Cu and Zn were used to verify the maintenance of the applied dose. Total suspended solids (TSS) were also determined at the end of the experiment, according to APHA (2017).

Chl a concentrations were used in productivity calculations (Equation 4.1).

$$P = \frac{b_{\max} * V}{A * T} \quad \text{Equation 4.1}$$

Where: P is the productivity of chl a (g/m<sup>2</sup>.d). The term  $b_{\max}$  refers to the maximum concentration of chl a (g/m<sup>3</sup>), V is the volume (0.9 m<sup>3</sup>), A is the area of the HRAP (3.3 m<sup>2</sup>), and T is the time necessary to reach the maximum  $b_{\max}$  concentration (d).

Coefficients of the kinetic models of zero and first-order (Equation 4.2 and 4.3, respectively) were determined to evaluate interferences of Cu and Zn addition in the removal of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Ps.

$$C = C_0 - k \cdot t \quad \text{Equation 4.2}$$

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Equation 4.3}$$

Where: C is the concentration of the nutrient (mg/L), t is the time (d), C<sub>0</sub> is the initial concentration of the nutrient (mg/L), and k is the reaction rate in mg/L.d for the order zero kinetics and d<sup>-1</sup> for first-order kinetics.

The HRAP performance in removing Cu and Zn was analyzed using the metal removal capacity (Equation 4.4) also used in other researches (NOVÁK et al., 2020; RUGNINI et al., 2017a; SAAVEDRA et al., 2018; YANG et al., 2015).

$$q = \frac{V * (C_i - C_f)}{w} \quad \text{Equation 4.4}$$

Where:  $q$  is the metal removal capacity by biomass (mg/g),  $C_i$  is the applied metal concentration,  $C_f$  is the final concentration of the metal in the soluble form (mg/L), and  $W$  refers to the mass of dry biomass, which in this study was considered as TSS (g/L).

#### **4.2.3. Identification and quantification of microalgae**

To identify and quantify microalgae, samples of 90 mL of each HRAP were collected when chl *a* concentration reached its maximum value. After collection, the samples were preserved with 10 mL of 4% formaldehyde solution. The identification occurred according to Bicudo and Menezes (2006). The final cell concentration was determined by counting cells in a Neubauer chamber using a microscope (model CX40 RF 100, Olympus Corporation) configured with a 40x magnification objective.

#### **4.2.4. Biochemical characterization of the obtained biomass**

The biomass harvesting was carried out through coagulation with NaOH (240 g/L), which promoted the pH adjustment to values previously defined in JarTest assays. Coagulation was carried out in the HRAP itself and occurred by vigorously stirring the effluent to disperse the NaOH, followed by resting for 12 hours to provide biomass sedimentation. The supernatant was discarded, and the biomass was frozen and lyophilized.

For quantifying the protein content in the biomass, a nitrogen to protein conversion factor of 6.25 (ZHONG et al., 2012) was adopted. Nitrogen, in turn, was quantified according to APHA (2017). The carbohydrate concentration was determined from the quantitative acid hydrolysis of the biomass (HOEBLER et al., 1989), followed by the phenol-sulfuric method (DUBOIS et al., 1956). The reading occurred in spectrophotometry (490 nm) using the standard glucose curve.

The lipid content was determined by the Soxhlet extraction method (AOAC, 2000). After macerating the biomass, neutral lipids were extracted in the fat determiner (Tecnal TE-044-8/50) for 6 hours, with 99% hexane solvent. After in the same equipment, membrane lipids were extracted with 96% ethanol for 3 hours, and quantification was performed by gravimetry.

Determination of ash content consisted of weighting 1 g of biomass to previously weighed porcelain crucibles placed in a muffle furnace at 550 ° C for 1 h. The difference in masses calculated the ash content before and after the combustion of the sample.

#### 4.2.5. Statistical analysis

The results obtained for the number of cells, reaction rate, and metal removal capacity were analyzed by determining the response surface curve, the coefficient of determination and significance of the coefficients at the level of 5% and 10% using *t*-test. For other parameters, descriptive statistics were applied. All analyzes were performed using the SigmaPlot 12.0 software.

### 4.3. Results and Discussion

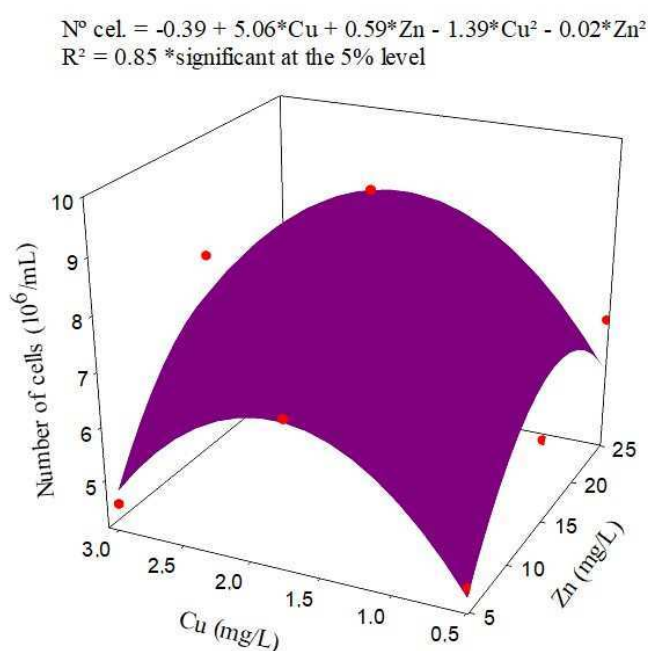
#### 4.3.1. Biomass development

HRAP monitoring varied between 16 and 20 days, depending on the decay of the chl *a* levels. The identification and quantification of the algal cells demonstrated that *Chlorella* sp. initially present in the inoculum was dominant in all HRAPs. No development of another genus was observed. *Chlorella* sp. is recognized for its ability to adapt to different cultivation conditions since the rigidity of the cell wall may protect against aggressive substances and acts to preserve the integrity of the cell (SAFI et al., 2014).

The number of cells of *Chlorella* sp. for the different mixtures of Cu and Zn is presented in the Figure 4.1. The equation that describes data dispersion indicates that both Cu and Zn elements had significant effects ( $p < 0.05$ ) on cell density. The inflection point of the paraboloid function corresponds to the dose of 1.8 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L, giving a Zn:Cu ratio of 8.3:1 equally observed in the biomass of *Scenedesmus* sp. (SHAABAN et al., 2010). This condition enhances microalgae growth; other values indicate a deficiency of these elements or an excess that can cause toxicity.

For example, HRAP with 0.5 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L showed the lowest number of cells among the HRAPs with metals application ( $4.52 \times 10^6$  cell/mL) which can be attributed to a possible limitation of these elements. While the addition of higher

doses, such as 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L ( $5.67 \times 10^6$  cell/mL), probably inhibited algal growth due to excess. A third inhibitory condition may have occurred in treatments with the limitation of one element concomitant with the high concentration of another. This seems to be the case for the HRAP that received 3.0 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L ( $4.57 \times 10^6$  cell/mL), possibly the Cu dose was high and caused toxicity, while the addition of Zn was not enough to support the growth of *Chlorella* sp. Therefore, microalgae cultivation for biotechnological applications is related to the adequacy in Cu and Zn concentrations, which is little explored. The present study makes an important contribution in this regard.



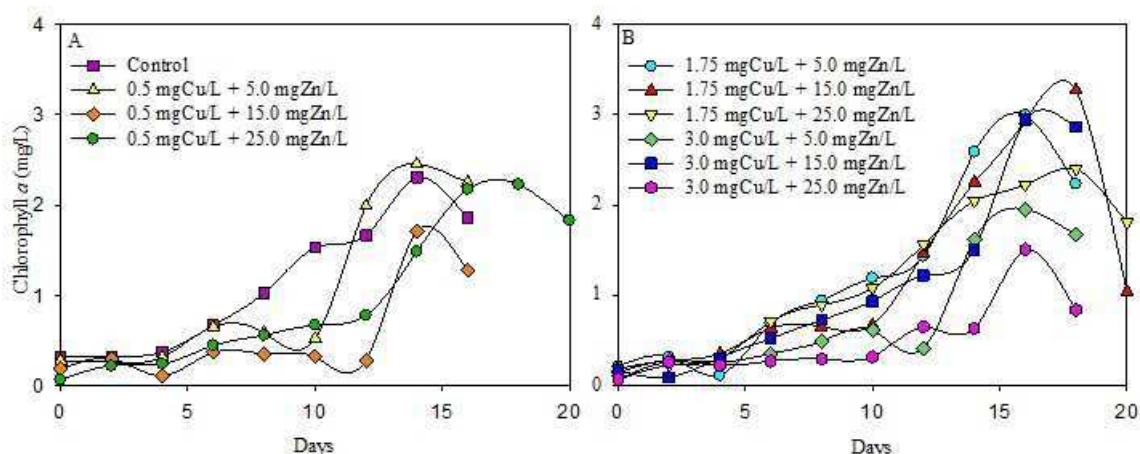
**Figure 4.1.** Model that describes the number of cells of *Chlorella* sp. as a function of the different concentrations of Cu and Zn. The red dots refer to the number of cells quantified in each treatment.

To assess the inhibitory effects of Cu and Zn, the concentrations of chl *a* were determined over time. The HRAP that received the largest applications of Cu and Zn (3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L) showed a chl *a* content that was approximately constant during the first 10 days, while in the other HRAPs, the adaptation period was around 5 days (Figures 4.2A and 4.2B). The maximum concentration of chl *a* in this treatment did not exceed 1.52 mg/L, which is 34.8% less than that observed in the control and 54.0% less than the addition of 1.75 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L.

Similar results were previously reported. During the cultivation of *Coelastrella* sp. in the SW, a reduction of chl *a* concentration of about 71% was observed in 2.0 mg

Cu/L (LI et al., 2018) and approximately 59% with 8.0 mg Zn/L (LI et al., 2020). The growth of *Chlamydomonas* sp. was not feasible in landfill leachate in concentrations above 4.0 mg Cu/L (PASKULIAKOVA et al., 2018). The tannery effluent with concentrations of 4.9 mg Cu/L, 7.9 mg Zn/L, 3.2 mg Pb/L, and 12.8 mg Cr/L was unsuitable for cultivating *Scenedesmus* sp. (AJAYAN et al., 2015).

Copper and Zn compromise the development of microalgae due to the increased production of reactive oxygen species and the ability to replace the  $Mg^{2+}$  ion in the chlorophyll molecule (Li et al., 2018; Li et al., 2020). However, in the same concentration, Cu is more toxic to microalgae than Zn (OUYANG et al., 2012; YANG et al., 2015). Copper's ability to reduce D1 protein synthesis, affect intracellular osmotic balance, and inhibit cell division (LI et al., 2018; YONG et al., 2020).



**Figure 4.2.** Concentration of chlorophyll a obtained during the monitoring of the development of microalgae cultivated in SW with different Cu and Zn concentrations.

The behavior of the chl a level was reflected in the chl a productivity. The HRAP with the highest application of Cu and Zn had the lowest value (25.42 mg chl a/m<sup>2</sup> d) (Table 4.2). On the other hand, a productivity 2x higher was obtained in HRAP with 1.75 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L (50.53 mg chl a/m<sup>2</sup> d). The need to increase productivity is one requirement to optimize the integrated system of wastewater treatment and microalgae biomass production (BHATIA et al., 2021; SALAMA et al., 2017). Low productivity increases the consumption of resources and energy involved in the cultivation and processing of biomass, making the biofuel produced more expensive (CHEN; ZHAO; QI, 2015). The present study results demonstrate that the adjustment in the concentrations of Cu and Zn improves the performance of HRAP in

terms of algal growth and can be a strategy to adapt the culture medium with micronutrients.

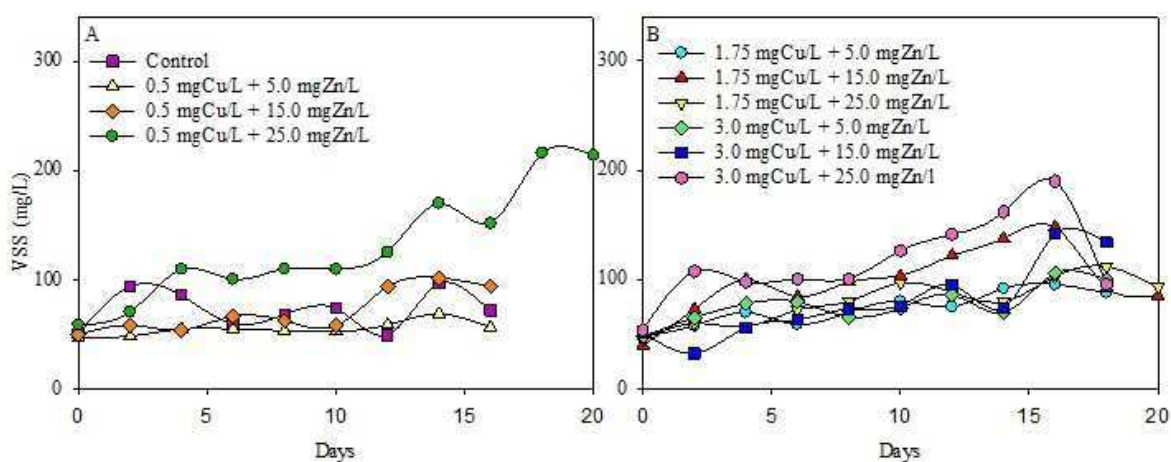
Levels of VSS during the monitoring varied from 40 to 216 mg/L (Figures 4.3A and 4.3B), reflecting the diverse community of microorganisms in the HRAPs. de Godos et al. (2009) obtained up to 1,500 mg/L in HRAP operated with diluted SW. The higher concentration observed by the authors can be attributed to the pH that remained approximately constant ( $\approx 8$ ) and the dilution that probably reduced the toxic compounds in the SW, such as metals and antibiotics (CHENG et al., 2019).

The addition of 0.5 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L showed an increasing trend of VSS over time, reaching the maximum concentration of 216 mg/L. The proportion of Zn and Cu in this treatment was equal to 50:1, which differs from the proportion of 8.3:1 established as the most suitable for microalgae growth (Figure 4.1). Bacteria, in general, encode few enzymes that depend on Cu (SAMANOVIC et al., 2012). On the other hand, this element is necessary for photosynthetic organisms (MIAZEK et al., 2015; YONG et al., 2020).

**Table 4.2.** Productivity of chlorophyll *a* during microalgae cultivation in SW with different Cu and Zn concentrations.

Treatment (mg Cu/L + mg Zn/L)	Productivity of chl <i>a</i> (mg chl <i>a</i> /m <sup>2</sup> d)
Control	44.55
0.5 + 5.0	47.35
0.5 + 15.0	33.09
0.5 + 25.0	33.48
1.75 + 5.0	50.53
1.75 + 15.0	49.10
1.75 + 25.0	35.99
3.0 + 5.0	32.96
3.0 + 15.0	49.59
3.0 + 25.0	25.42

This difference between the most suitable proportions of Zn:Cu for the development of microalgae (8.3:1) and other microorganisms present in HRAPs (50:1) can represent a challenge to maintain the balance of the microbial community and reconcile efficient treatment wastewater with maximum algal growth. These results suggest that the Cu demand for microalgae growth may compromise the development of other microorganisms.



**Figure 4.3.** Effects of different concentrations of Cu and Zn on the levels of volatile suspended solids monitored during the treatment of SW in HRAPs.

Previous research has shown that the biomass of activated sludge was negatively affected at concentrations above 1.0 mg Cu/L (LIN; YANG; LIU, 2003). Ermis et al. (2020) investigated the effects of Fe addition on SW on the development of a microorganism mixed culture. The authors found that the addition of Fe provided a 2.5x increase in the abundance of *Chlorella sorokiniana*. However, other microorganisms such as *Azospirillum*, *Thermomonas fusca*, *Poteriorospumella*, and *Desulfovibrio oxamicus* almost disappeared in this condition.

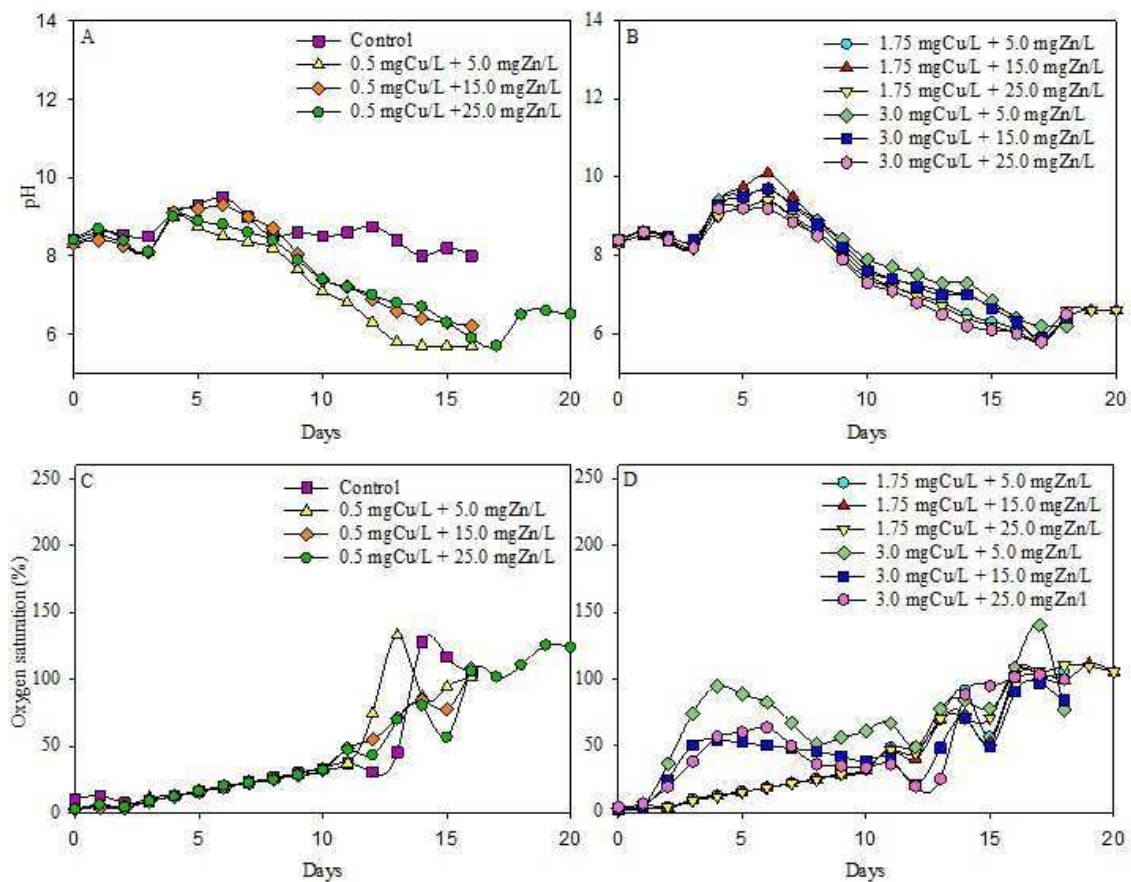
#### 4.3.2. Environmental variables

An approximately constant pH was observed until the 4<sup>th</sup> day (Figures 4.4A and 4.4B). There was an increase between the 5<sup>th</sup> and the 7<sup>th</sup> day, and the values reached 9.0 - 10.1. This result can be attributed to the consumption, by microalgae, of dissolved CO<sub>2</sub> (POSADAS et al., 2017). The low biodegradability of SW (BOD/COD = 3.64, Table 1) possibly limited the CO<sub>2</sub> supply provided by heterotrophic bacteria. An increase in pH is expected when photosynthesis is intense and consumes CO<sub>2</sub> faster than can be replenished by bacterial respiration. Carbonate and bicarbonate ions dissociate and generate an accumulation of hydroxyl ions (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012), being responsible for pH increasing.

From the 7<sup>th</sup> day onwards, pH decreased continuously and reached a value close to 6.0 at the monitoring end. Nitrification (discussed in item 4.3.3) is a process that can acidify the medium, and the presence of Zn<sup>2+</sup> may have contributed to

accentuating pH reduction as it produces  $H^+$  ions in contact with water (KREŽEL; MARET, 2016). The maintenance of a pH higher than 8.0 observed in the control throughout the period reinforces this hypothesis.

The pH values observed in this study do not seem to limit the development of micr algae, as these microorganisms can grow in the SW in a pH range of 6 to 10 (CHENG et al., 2019), these being the values observed in the present study. However, other microorganisms were possibly inhibited. For example, a pH greater than 8.5 does not favor the development of aerobic heterotrophic bacteria (CRAGGS et al., 2014) that act on the degradation of organic matter.



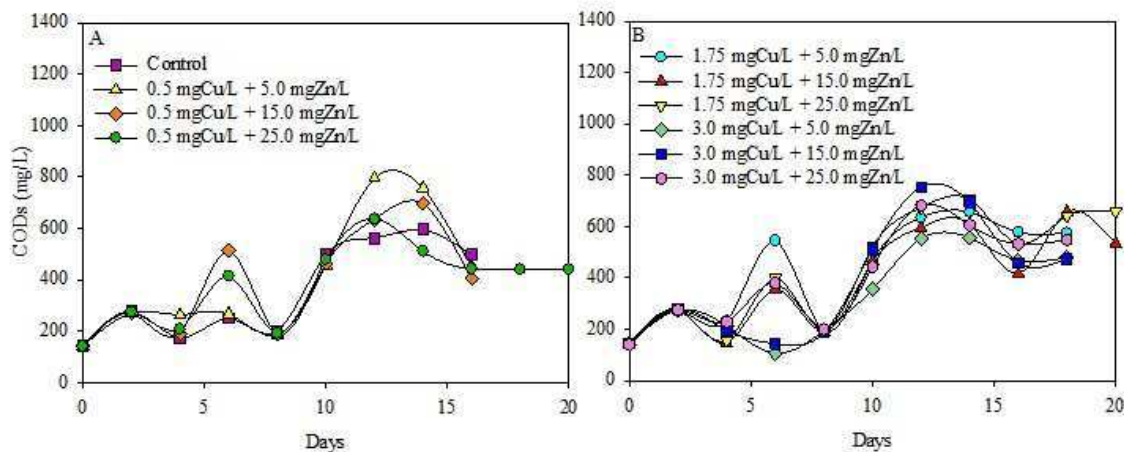
**Figure 4.4.** pH (A and B) and oxygen saturation (C and D) recorded during the operation of HRAPs fed with SW with different Cu and Zn concentrations.

Oxygen saturation (Figures 4.4C and 4.4D) increased during all HRAPs operations, from 1.6 - 10.1% at the beginning of the monitoring to up to 140.4% at the end of the experiment. Microalgae are recognized for their remarkable ability, through photosynthesis, to promote aerobic conditions in HRAP. This ability has the advantage of lowering 2x the operating and maintenance costs than an activated sludge system

(GARFÍ; FLORES; FERRER, 2017). However, it is important to highlight that the excess of oxygen may also indicate that the presence of Cu and Zn and pH variations compromised the development of bacteria and, consequently, the consumption of DO, resulting in an accumulation.

#### 4.3.3. Removal of organic matter and nutrients

In all HRAPs, CODs concentrations increased (Figures 4.5A and 4.5B). The treatments that favored the growth of microorganisms such as bacteria, referred to as VSS concentrations, provided the lowest increase in CODs values. This was the case of HRAPs with 0.5 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L where the CODs concentration at the end of monitoring was equal to 441.0 mg/L. Conversely, the highest CODs values were observed in treatments that inhibited the growth of microorganisms due to a limitation or excess of Cu and Zn. The HRAP with low concentration of these elements (0.5 mg Cu/L + 5.0 mg/L) reached a CODs concentration of up to 795.0 mg/L and in the HRAPs with the highest applications of Cu and Zn (3.0 + 15.0 and 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L) values of CODs reached 753.3 and 682.5 mg/L, respectively.



**Figure 4.5.** Soluble chemical oxygen demand variation during the operation of HRAP fed with SW with different Cu and Zn concentrations.

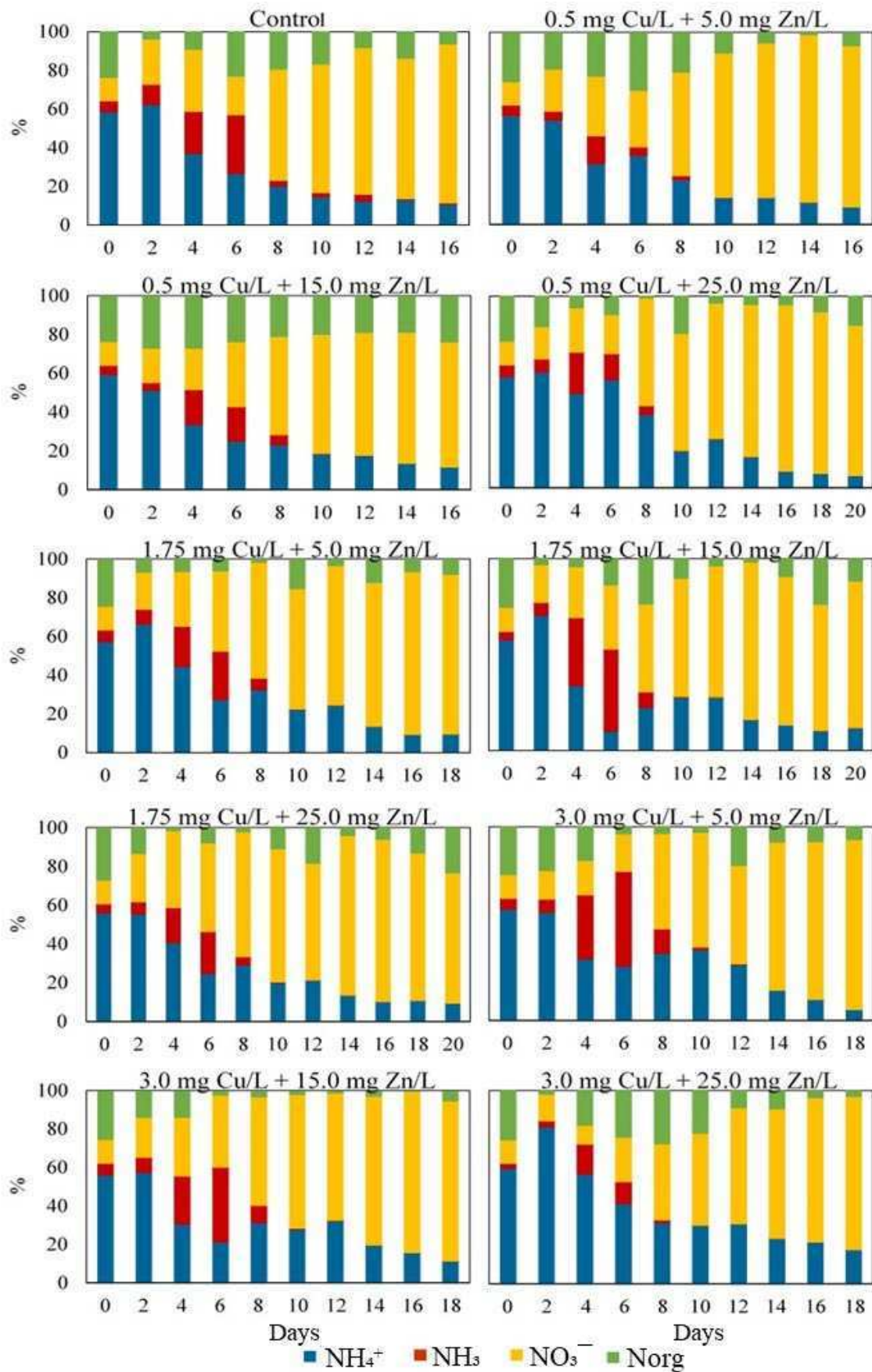
These results may reflect a possible inhibition of bacteria responsible for the organic matter degradation. The low concentrations of VSS and accumulation of DO presented in items 4.3.1 and 4.3.2 are also indicators of this inhibition. This behavior associated with the ability of microalgae and bacteria to produce extracellular polymeric substances (EPS) due to the presence of metals may have contributed to

the increase in CODs. Kiran and Thanasekaran (2011) observed that in a medium containing 2.0 mg Cu/L, the cyanobacteria *Lyngbya putealis* increased by 2.3x the production of EPS in the form of exoprotein compared to the treatment with 0.1 mg Cu/L.

The main routes of N conversion in HRAPs were evaluated by quantifying  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$  and Norg during the monitoring (Figure 4.6). At the beginning of the experiment, the most considerable fraction of N was  $\text{NH}_4^+$ , varying from 56.0 to 59.3%. Between the 5th and 7th days,  $\text{NH}_3$  levels increased due to high pH values (9.0 to 10.1), giving percentages between 15.7% in the HRAPs with 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L and 49.1% with the application of 3.0 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L. In this last treatment, the  $\text{NH}_3$  concentration reached 122.0 mg/L, which may pose a risk of toxicity for the microbial community of the HRAPs. Kwon et al. (2020) observed that the number of *Chlorella vulgaris* cells grown in SW with 100 mg/L of  $\text{NH}_3$  was lower when compared to the synthetic medium.

In the following days,  $\text{NO}_3^-$  concentrations continually increased to 87.6% (534.7 mg/L). This result associated with decreases in  $\text{NH}_4^+$  suggests recovery of the microbial community affected by  $\text{NH}_3$  and the promotion of nitrification. However, this process was compromised with the application of 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L, where the reduction of  $\text{NH}_4^+$  was only 66.1%. In the other treatments, removal varied from 81.0 to 92.0%. Other studies showed that nitrification was negatively affected in the activated sludge reactor with 5 mg Cu/L (LEE et al., 2009) and 10 mg Zn/L (KAPOOR et al., 2015).

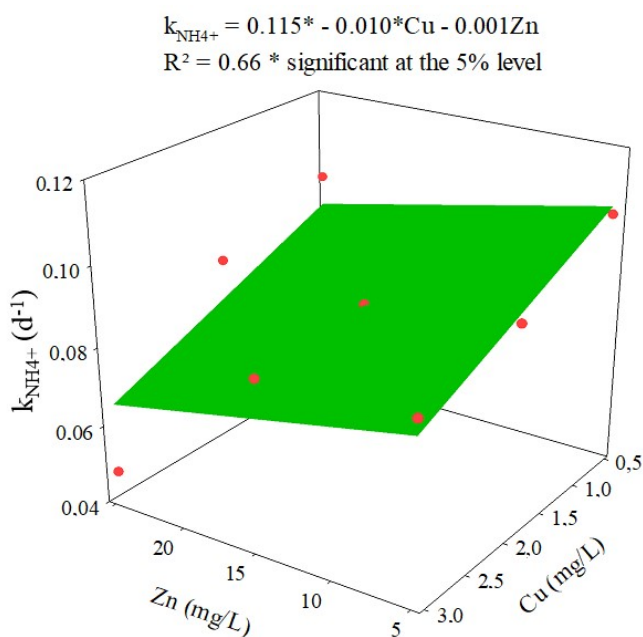
As for Norg, the highest percentage was found in HRAP with 0.5 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L, an average value equal to 22.7% (164.3 mg/L), which remained approximately constant during the monitoring. The application of 3.0 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L gave a minimum value of 0.42% (2.5 mg/L), indicating that N's assimilation was not viable. For the other HRAPs, an oscillation was observed over the days. This behavior is expected for batch tests because, at the beginning of the experiment, it is likely that the concentration of Norg in the SW represented the un-degraded organic compounds. N can be made available and assimilated by biomass with the action of heterotrophic bacteria (COUTO et al., 2015). This assimilation contributes to the addition of Norg that makes up biomass.



**Figure 4.6.** Percentages of nitrogen forms in HRAPs treating SW with different Cu and Zn concentrations.

The N transformations observed in the present study indicated that the excess of metal negatively affected the conversions of  $\text{NH}_4^+$  through nitrification as observed in the HRAP with 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L; and assimilation as verified in the HRAP with 3.0 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L. The reaction rates for  $\text{NH}_4^+$  ( $k_{\text{NH}_4^+}$ ) were determined using first-order kinetics, which is the model that best adjusted to variations in the concentrations of  $\text{NH}_4^+$  ( $R^2$  between 0.92 and 0.99).

The values of  $k_{\text{NH}_4^+}$  and the model that describes data dispersion are presented in the Figure 4.7. The addition of Zn did not show significant interference in  $k_{\text{NH}_4^+}$  ( $p > 0.10$ ), while the effects of Cu were significant ( $p < 0.05$ ). The addition of 0.5 mg Cu/L gave the highest values of  $k_{\text{NH}_4^+}$ , from 0.104  $\text{d}^{-1}$  to 0.089  $\text{d}^{-1}$  regardless of the addition of Zn. The control showed a similar result (0.108  $\text{d}^{-1}$ ), while the performance of HRAP with 3 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L was about half (0.048  $\text{d}^{-1}$ ). These results show that an increase in the concentration of Cu reduces the values of  $k_{\text{NH}_4^+}$ .



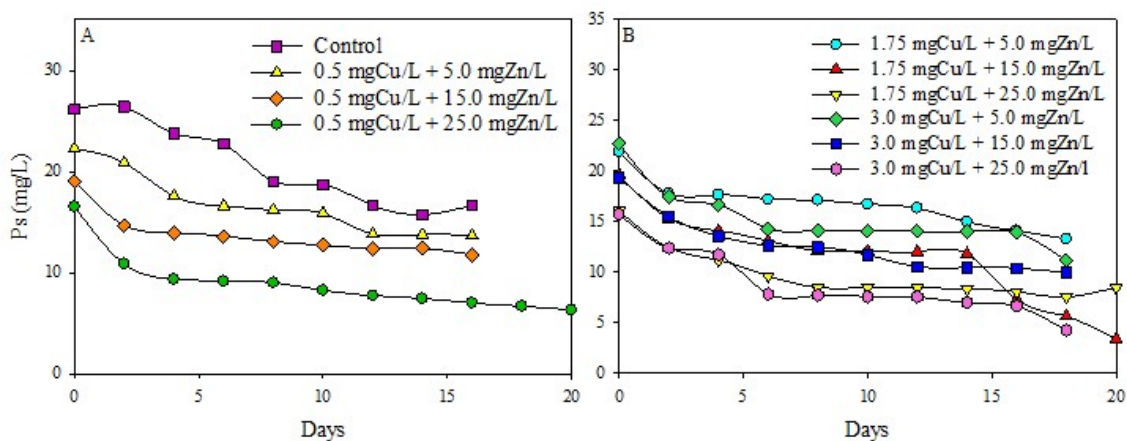
**Figure 4.7.** Reaction rate for ammonia nitrogen ( $k_{\text{NH}_4^+}$ ) obtained through first-order kinetics.  $k_{\text{NH}_4^+}$  were quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAPs. The red dots refer to the  $k_{\text{NH}_4^+}$  quantified in each treatment.

Zhou et al. (2019) reported a similar result when calculating the reaction rates of synthetic SW treatment in a duckweed system. Values varied from 0.097 to 0.079  $\text{d}^{-1}$  when using 0.1 to 1.0 mg Cu/L, and decreased to 0.031  $\text{d}^{-1}$  when 2.0 mg Cu/L was tested. For the authors, the excess of Cu ( $> 2.0$  mg/L) resulted in the production of reactive oxygen species, which inhibited the assimilation of ammonia nitrogen by the

biomass and the nitrification-denitrification resulting from the rhizosphere microorganisms activity.

Ps can be removed through adsorption and assimilation by biomass and chemical precipitation during microalgae cultivation in wastewater. It is possible to suggest that all of these processes occurred during the operation of the HRAPs. At the beginning of the experiment, the initial concentration of Ps was 26.1 mg/L. However, Ps concentrations decreased to ~22.3 mg/L with 5.0 mg Zn/L followed by 19.3 mg/L in the 15.0 mg Zn/L HRAP and 18.1 mg/L after the application of 25.0 mg Zn/L (Figure 4.8). This reduction indicates that the application of Zn contributed to the formation of precipitates in the form of zinc phosphate, also found by Li et al. (2020) after the application of different concentrations of Zn in the SW.

Besides, between the 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days, pH values were adequate for removing Ps by precipitation with cations, such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . In the following days, with biomass growth, assimilation and adsorption were probably the dominant processes. An indication of this occurrence is observed for HRAP with 1.75 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L. This treatment presented the most suitable conditions for microalgae growth and conferred the highest percentage of removal of Ps (82.8%) at the end of the experiment.

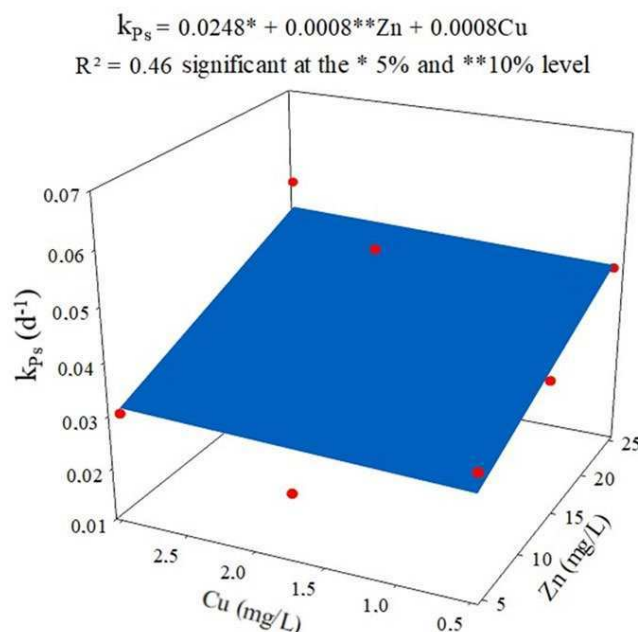


**Figure 4.8.** Soluble phosphorus monitored during the operation of HRAPs fed with SW with different Cu and Zn concentrations.

Interestingly, the second-best performance in removing Ps, 73.0%, occurred in the HRAP that inhibited biomass growth (3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L). Li et al. (2020) found that an increase in Zn from 0.5 to 4.0 mg/L inhibited the growth of microalgae *Coelastrella* sp. in SW but increased P removal from 68.0 to 76.4%. The

energy demand to adapt to a medium with an excess of metals and the use of polyphosphates as an intracellular detoxification mechanism for microalgae (LAPORTE et al., 2020; ZHOU et al., 2012) may have contributed to greater assimilation of P. This behavior is also demonstrated when analyzing the lowest percentages of removal of Ps, which occurred with the minimum applications of Cu and Zn: control (36.4%); 0.5 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L (38.6%) and 0.5 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L (38.1%).

Another result that shows this characteristic refers to the values obtained for the reaction rate of Ps ( $k_{Ps}$ ) (Figure 4.9) using models of first-order kinetics ( $R^2$  between 0.73 to 0.94). The equation that describes the dispersion of the  $k_{Ps}$  values shows that only the application of Zn caused significant interferences ( $p < 0.10$ ). The higher the Zn dose, the higher the  $k_{Ps}$  values. They reached 0.054 and 0.053  $d^{-1}$  with the application of 1.75 Cu/L + 15.0 mg Zn/L and 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L, respectively. The lowest value was 0.030 – 0.022  $d^{-1}$  with the addition of 5.0 mg Zn/L, regardless of the Cu application. Li et al. (2020) also noticed this trend during the cultivation of *Coelastrella sp.* in the SW. The authors observed that with the addition of 2.0 mg Zn/L,  $k_{Ps}$  was 0.053  $d^{-1}$ , whereas in a medium with 8.0 mg/L, it reached 0.078  $d^{-1}$ .



**Figure 4.9.** Reaction rate for soluble phosphorus ( $k_{Ps}$ ) obtained through first-order kinetics.  $k_{Ps}$  were quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAP. The red dots refer to the  $k_{Ps}$  quantified in each treatment.

#### 4.3.4. Removal of metals

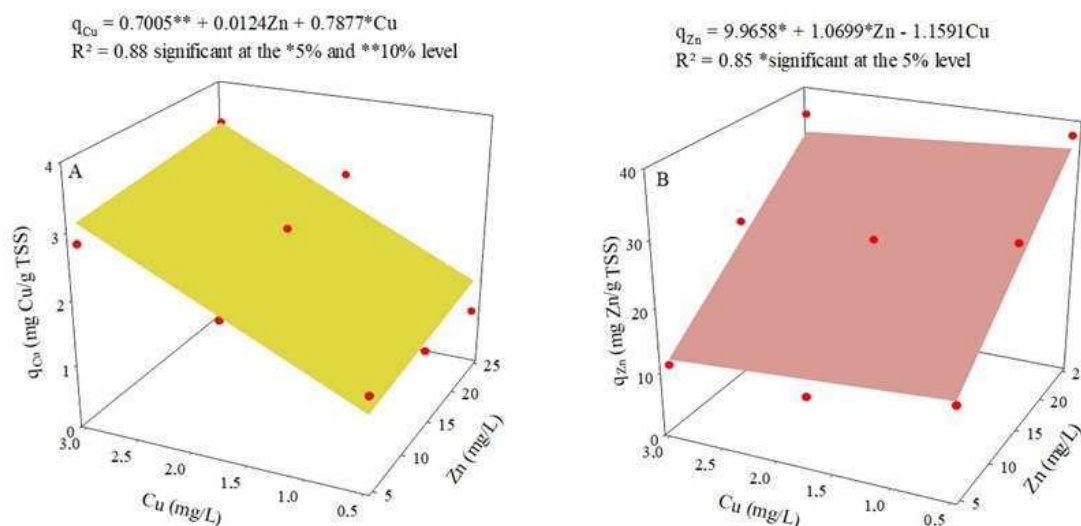
The performance of HRAPs in removing Cu and Zn metals was determined considering the removal capacity (Figures 4.10A and 4.10B), which considers the amount of metal removed per mass of solids. The equations in Figure 4.10 have two crucial characteristics. The first one shows that Cu and Zn did not compete for binding sites. Only the concentrations of Cu significantly interfered in the ability to remove Cu ( $q_{Cu}$ ) ( $p < 0.05$ ), and only the application of Zn showed significant effects on the ability to remove Zn ( $q_{Zn}$ ) ( $p < 0.05$ ).

The second characteristic refers to the proportionality between the application of metal and the values of  $q$ . The higher the Cu concentration, the higher the  $q_{Cu}$  values. Average capacities were equal to 1.1; 2.5 and 3.1 mg/g for HRAPs with 0.5; 1.75 and 3.0 mg Cu/L, respectively. The same trend was observed for  $q_{Zn}$ , where the averages were equal to 11.9; 26.7, and 33.3 mg/g in treatments that received 5.0; 15.0, and 25.0 mg Zn/L, respectively. A higher value of  $q$  was expected for treatments that favored algal growth in detriment over treatments that inhibited it. However, this behavior did not occur. The HRAP that inhibits algal growth due to an excess of metal (3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L) presented a  $q_{Cu}$  (3.4 mg/g) and  $q_{Zn}$  (36.1 mg/g) superior to that obtained in the treatment that favored the development of microalgae (1.75 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L;  $q_{Cu} = 2.6$  mg/g and  $q_{Zn} = 25.9$  mg/g). Thus, there was no correlation between the levels of cell number or chl *a* or productivity of chl *a* with  $q$  ( $R^2 < 0.20$ ).

Microalgae cell multiplication contributes to reducing dissolved Cu and Zn through complexes formed with EPS, cell wall binding, and assimilation. EPS and the cell wall of microalgae have functional groups that enable the characteristic coordination binding of the  $Cu^{2+}$  ion (KUMAR et al., 2015). As for assimilation, it was reported that *Chlorella* sp. contributed up to 18% of the total Cu removal through intracellular adsorption (WILDE et al., 2006). This ability was not evident in the present study.

This result does not indicate that microalgae did not act to remove metals; it only suggests that in HRAP fed with SW, other factors also contributed, such as the pH that remained above 6.0, and this condition does not favor the ionic forms of Cu and Zn in water (LANGMUIR et al., 2004). Furthermore, due to its high electronegativity and lower ionic radius, Cu interacts strongly with organic matter (BEZERRA; TAKIYAMA; BEZERRA, 2009), contributing to the complexation of this element. As for

Zn, this element can interact with SW constituents and form several inorganic compounds, such as zinc phosphate (discussed in item 4.3.3) and different forms of zinc hydroxides (KREŻEL AND MARET., 2016).



**Figure 4.10.** Capacity to remove Cu ( $q_{Cu}$ ) (A) and Zn ( $q_{Zn}$ ) (B) quantified during SW treatment with different mixtures of Cu and Zn in HRAP. The red dots refer to the  $q_{Cu}$  and  $q_{Zn}$  quantified in each treatment.

The different routes suggested for metals removal (complexation, precipitation, assimilation) resulted in similar removal of dissolved Cu and Zn in treatments that stimulated and inhibited algal growth. The HRAP with 1.75 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L provided removal of dissolved Cu and Zn equal to 77.1 and 88.8%, respectively, while the application of 3.0 mg Cu/L + 25.0 mg Zn/L promoted a reduction of 69.3 and 86.1%, respectively. The average removals considering all treatments were equal to 75.4% for Cu and 88.6% for Zn. Although few studies have evaluated the removal of metals from wastewater treated in HRAPs, the reported results are similar to those of the present study. For example, the removals of Cu and Zn from domestic sewage were 81-87% and 73-88%, respectively (TOUMI; NEJMEDDINE; BELKOURA, 2003; TOUMI; NEJMEDDINE; EL HAMOURI, 2000).

#### 4.3.5. Biomass composition

The determination of the biomass composition is essential to establish the best applications. In the present study, the addition of Cu and Zn promoted an increase in

ash contents, which remained between 35.8 and 40.9%, exceeding the concentration observed in the control (17.4%). The ash concentrations may vary according to the characteristics of the growth medium and the cultivation conditions, with percentages of 10.6% in the biomass cultivated in synthetic medium (TORO et al., 2013) up to 62.0% for the biomass grown in effluent from the mining (URRUTIA; YAÑEZ-MANSILLA; JEISON, 2019).

A high concentration of ash in the microalgae biomass represents a significant challenge for the production of biofuels, as this characteristic reduces the calorific value of the feedstock. Also, the costs associated with ash removal can increase the sale price of biofuel (HESS et al., 2019). On the other hand, macro and micronutrients may be present in the ash composition, making attractive the biomass application as a biofertilizer (DINIZ et al., 2017).

Dry ash-free biomass was considered to assess the interferences of the metals Cu and Zn in the contents of the other compounds (proteins, carbohydrates, and lipids). The significant fraction corresponded to proteins, with levels ranging from 31.7 to 55.2% (Table 4.3). The microalgae biomass that was grown in a medium with high concentrations of N, as observed in the SW ( $\text{TKN} + \text{NO}_3^- = 677.9 \text{ mg/L}$ ), contributes to the formation of proteins (MENEGOL et al., 2017). The contents of this metabolite observed in the present research are consistent with the percentages of 16.2 to 53.1% reported in the literature for microalgae biomass grown in wastewater (FERREIRA et al., 2018; MOHEIMANI et al., 2018; MONTERO et al., 2018). The highest protein level was observed with the addition of 3.0 mg Cu/L (50.5 to 55.2%) in the same HRAPs that presented the highest increases in CODs, as discussed in item 4.3.3. Given this result, it is possible to suggest that the excess of Cu induced the synthesis of EPS in the form of exoproteins also observed in other studies (KIRAN; THANASEKARAN, 2011; TANGO et al., 2018).

Protein-rich biomass can be used as an ingredient or supplement in the animal diet. A previous study showed that the protein concentrations present in the microalgae biomass grown in the SW were comparable to the soybean meal used in the swine's feeding (from 37 to 44%) (MOHEIMANI et al., 2018). However, the risks associated with this practice, such as toxic compounds in biomass and the animal's adaptability to microalgae as a food ingredient, should be investigated.

**Table 4.3.** Concentrations of proteins, carbohydrates, and lipids quantified in dry ash-free biomass cultivated in SW with different concentrations of Cu and Zn.

Treatment (mg Cu/L + mg Zn/L)	Proteins (%)	Carbohydrates (%)	Total lipids (%)
Control	45.9	26.2	24.5
0.5 + 5.0	37.1	31.8	8.1
0.5 + 15.0	52.5	33.2	8.1
0.5 + 25.0	32.4	10.8	14.0
1.75 + 5.0	34.1	20.5	14.2
1.75 + 15.0	31.7	18.9	16.4
1.75 + 25.0	34.0	17.3	20.2
3.0 + 5.0	55.2	24.6	17.9
3.0 + 15.0	54.6	19.6	22.7
3.0 + 25.0	50.5	29.3	8.7

The highest concentrations of carbohydrates occurred in conditions that inhibited the development of microalgae, either due to the Cu limitation observed in HRAPs with 0.5 mg Cu/L + 5.0 mg Zn/L (31.8%) and 0.5 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L (33.2%) or excess of both elements as verified in the HRAP with 3.0 mg Cu/L + 25 mg Zn/L (29.3%). Microalgae can store carbohydrates to ensure survival in extreme environments and synthesize osmoprotectants such as glycerol and sugars (SUN et al., 2014). Silva et al. (2018) mentioned that phytoplankton could synthesize carbohydrates as a defense mechanism because this metabolite can bind to metal, decreasing bioavailability.

The synthesis of carbohydrates and lipids can compete (RIZWAN; MUJTABA; LEE, 2017). Therefore, differently from carbohydrates, the production of lipids was compromised under conditions of limitation or excess of Cu and Zn. Control treatment had the maximum lipid (24.5%). Rugini et al. (2018) found a 26.7% reduction in the levels of lipids in the biomass of *Desmodesmus* sp. when grown without medium with 9.8 mg Cu/L and 7.4 mg Ni/L compared to the control treatment. Conversely, Yang et al. (2015) found that the lipids in the *Chlorella minutissima* biomass increased, in relation to control, 21.1 and 18.3% when grown at 25.4 mg Cu/L and 392.3 mg Zn/L, respectively.

The previous researches report divergent results. An increase in lipid levels may occur due to stress induced by metals, but these elements can also result in lipid peroxidation (LI et al., 2018; YANG et al., 2015). It is possible that the metal concentration that stimulates the production of lipids is specific to each species of

microalgae and is likely to be affected by the conditions of cultivation and composition of the wastewater.

#### **4.4. Conclusion**

The condition that potentiates the growth of microalgae was 1.8 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L, and the addition of 0.5 mg Cu/L + 25 mg Zn/L provided the greatest increase of VSS. An increase in CODs was observed in all treatments, emphasizing the HRAPs that received the major application of metals. The addition of Cu interfered negatively in the reaction rate of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> while the application of Zn favored the rate of reaction of Ps. The presence of Cu did not affect the removal capacity of Zn, and this metal did not interfere with the removal capacity of Cu. A large removal of Cu and Zn was observed; however, the microalgae seem to present a modest contribution to this performance. The treatments with the lowest concentrations of Cu and Zn provided the highest concentrations of carbohydrates but resulted in a decrease in lipid content. The treatments with an excess of Cu (3.0 mg Cu/L) stimulated the production of proteins.

#### **4.5. Formatting of funding sources**

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grant number 420429/2018-2]; and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) [Finance Code 001].

#### **References**

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment Saudi Journal of Biological Sciences Elsevier, , 1 jul. 2012.
- AJAYAN, K. V. et al. Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae Scenedesmus Species. International Journal of Phytoremediation, v. 17, n. 10, p. 907–916, 3 out. 2015.
- AKPOR, O. B. Heavy Metal Pollutants in Wastewater Effluents: Sources, Effects and Remediation. Advances in Bioscience and Bioengineering, v. 2, n. 4, p. 37, 2014.

AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland. [s.l.: s.n.].

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23. ed. [s.l.: s.n.].

BAŚCIK-REMISIEWICZ, A. et al. The Effect of Zn and Mn on the Toxicity of Cd to the Green Microalga *Desmodesmus armatus* Cultured at Ambient and Elevated (2%) CO<sub>2</sub> Concentrations | Request PDF. Polish Journal of Environmental Studies, v. 18, n. 5, p. 775–780, 2009.

BEZERRA, P. S. S.; TAKIYAMA, L. R.; BEZERRA, C. W. B. Complexation of metal ions by dissolved organic matter: modeling and application to real systems. Acta Amazonica, v. 39, n. 3, p. 639–648, 2009.

BHATIA, S. K. et al. Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges Science of the Total Environment Elsevier B.V., , 10 jan. 2021.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Genines of continental water seaweed in Brazil - key for identification and descriptions [in Portuguese]. [s.l.: s.n.].

BURAKOV, A. E. et al. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes: A review Ecotoxicology and Environmental Safety Academic Press, , 1 fev. 2018.

CESTONARO DO AMARAL, A. et al. Zinc and copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. Journal of Environmental Management, v. 141, p. 132–137, 1 ago. 2014.

CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. Applied Energy, v. 137, p. 282–291, 2015.

CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy Bioresource Technology Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.

COUTO, E. DE A. DO et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. Ecological Engineering, v. 81, p. 140–145, 1 ago. 2015.

CRAGGS, R. et al. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. New Zealand Journal of Botany, v. 52, n. 1, p. 60–73, 2 jan. 2014.

- DE GODOS, I. et al. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 19, p. 4332–4339, 2009.
- DINIZ, G. S. et al. The potential of microalgal biomass production for biotechnological purposes using wastewater resources. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 821–832, 1 abr. 2017.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- ERMIS, H. et al. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020.
- FALLAHI, A. et al. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere*, v. 272, p. 129878, 1 jun. 2021.
- FERREIRA, A. et al. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, v. 164, p. 32–38, 1 jul. 2018.
- GARFÍ, M.; FLORES, L.; FERRER, I. Life Cycle Assessment of wastewater treatment systems for small communities: Activated sludge, constructed wetlands and high rate algal ponds. *Journal of Cleaner Production*, v. 161, p. 211–219, 10 set. 2017.
- GEDDIE, A. W.; HALL, S. G. An introduction to copper and zinc pollution in macroalgae: for use in remediation and nutritional applications. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 1, p. 691–708, 1 fev. 2019.
- HEJNA, M. et al. Heavy-metal phytoremediation from livestock wastewater and exploitation of exhausted biomass. *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI AG, , 1 mar. 2021. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7956449/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3496449/)>. Acesso em: 6 abr. 2021
- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. *Biomass and Bioenergy*, v. 123, p. 149–158, 1 abr. 2019.
- 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.

- KAPOOR, V. et al. Impact of Heavy Metals on Transcriptional and Physiological Activity of Nitrifying Bacteria. *Environ. Sci. Technol*, v. 49, p. 41, 2015.
- KIRAN, B.; THANASEKARAN, K. Metal tolerance of an indigenous cyanobacterial strain, *Lyngbya putealis*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n. 8, p. 1128–1132, 1 dez. 2011.
- KREŻEL, A.; MARET, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 611, p. 3–19, 1 dez. 2016.
- KUMAR, K. S. et al. Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 113, p. 329–352, 2015.
- KWON, G. et al. Growth and nutrient removal of *Chlorella vulgaris* in ammonia-reduced raw and anaerobically-digested piggery wastewaters. *Environmental Engineering Research*, v. 25, n. 2, p. 135–146, 1 abr. 2020.
- LANGMUIR, D. et al. Ussue paper on the environmental chemistry of metals. [s.l: s.n.].
- LAPORTE, D. et al. Copper-induced concomitant increases in photosynthesis, respiration, and C, N and S assimilation revealed by transcriptomic analyses in *Ulva compressa* (Chlorophyta). *BMC Plant Biology*, v. 20, n. 1, p. 25, 15 jan. 2020.
- LEE, Y. W. et al. Inhibitory Effects of Copper on Nitrifying Bacteria in Suspended and Attached Growth Reactors. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 203, n. 1–4, p. 17–27, 7 fev. 2009.
- LI, X. et al. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource Technology*, v. 251, n. December 2017, p. 274–279, 2018.
- LI, X. et al. Nutrient removal from swine wastewater with growing microalgae at various zinc concentrations. *Algal Research*, v. 46, p. 101804, 1 mar. 2020.
- LIN, Y. M.; YANG, X. F.; LIU, Y. Kinetic responses of activated sludge microorganisms to individual and joint copper and zinc. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 38, n. 2, p. 353–360, 2003.
- MENEGOL, T. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of *Heterochlorella luteoviridis*. *Food Science and Technology*, v. 37, n. Special Issue, p. 28–37, 1 dez. 2017.
- MIAZEK, K. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 9 out. 2015.

- MOHEIMANI, N. R. et al. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. *Algal Research*, v. 35, p. 362–369, 1 nov. 2018.
- MONTERO, E. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorococcum* sp. under non-controlled conditions using a digestate from pig manure within a biorefinery. *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 5, p. 2847–2857, 1 out. 2018.
- NEDERLANDS NORM. NEN 6520. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-a Content. Nederlands Normalisatie-Instituut, Delft, The Netherlands., 1981.
- NOVÁK, Z. et al. Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (Chlorophyceae) species. *Phycological Research*, 23 mar. 2020.
- NUSH, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 4, p. 14–36, 1980.
- OUYANG, H. L. et al. Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. *Chinese Science Bulletin*, v. 57, n. 25, p. 3363–3370, 2012.
- PASKULIAKOVA, A. et al. Microalgal bioremediation of nitrogenous compounds in landfill leachate – The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. *Algal Research*, v. 32, p. 162–171, 1 jun. 2018.
- POSADAS, E. et al. Microalgae cultivation in wastewater. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products*, p. 67–91, 2017.
- RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; LEE, K. Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 22, n. 1, p. 68–75, 1 fev. 2017.
- RUGNINI, L. et al. Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. *Science of the Total Environment*, v. 601–602, p. 959–967, 1 dez. 2017.
- RUGNINI, L. et al. Phosphorus and metal removal combined with lipid production by the green microalga *Desmodesmus* sp.: An integrated approach. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 125, p. 45–51, 1 abr. 2018.
- SAAVEDRA, R. et al. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology*, v. 263, p. 49–57, 1 set. 2018.

SAFI, C. et al. Response of a phytoplanktonic assemblage to copper and zinc enrichment in microcosm *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2014.

SALAMA, E. S. et al. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.

SAMANOVIC, M. I. et al. Copper in microbial pathogenesis: Meddling with the metal *Cell Host and Microbe* NIH Public Access, , 16 fev. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2285254/>. Acesso em: 21 out. 2020

SHAABAN, M. M. et al. Green Microalgae Water Extract and Micronutrients Foliar Application as Promoters to Nutrient Balance and Growth of Wheat Plants. *Journal of American Science*, v. 6, n. 9, p. 631–636, 2010.

SILVA, J. C.; ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 57–63, 15 out. 2018.

SINGH, D. V. et al. Microalgae in aquatic environs: A sustainable approach for remediation of heavy metals and emerging contaminants *Environmental Technology and Innovation* Elsevier B.V., , 1 fev. 2021.

SINGH, P. et al. Combined metals and EDTA control: An integrated and scalable lipid enhancement strategy to alleviate biomass constraints in microalgae under nitrogen limited conditions. *Energy Conversion and Management*, v. 114, p. 100–109, 15 abr. 2016.

SONG, L. et al. Micronutrient requirements for growth and hydrocarbon production in the oil producing green Alga *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). *PLoS ONE*, v. 7, n. 7, p. 41459, 25 jul. 2012.

SUN, X. et al. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. *Bioresource Technology*, v. 155, p. 204–212, 1 mar. 2014.

TANGO, M. D. et al. Microalgae cultivation in agro-industrial effluents for biodiesel application: Effects of the availability of nutrients. *Water Science and Technology*, v. 78, n. 1, p. 57–68, 13 ago. 2018.

- TORO, C. et al. Characterization and Application in Biocomposites of Residual Microalgal Biomass Generated in Third Generation Biodiesel. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 21, n. 4, p. 944–951, 12 dez. 2013.
- TOUMI, A.; NEJMEDDINE, A.; BELKOURA, M. The fate of heavy metals (zn, cu, pb, cd and cr) in an integrated wastewater treatment plant: Two phase anaerobic reactor (rap) - high rate algal pond (hrap). *Environmental Technology (United Kingdom)*, v. 24, n. 2, p. 153–159, 1 fev. 2003.
- TOUMI, A.; NEJMEDDINE, A.; EL HAMOURI, B. Heavy metal removal in waste stabilisation ponds and high rate ponds. *Water Science and Technology*, v. 42, n. 10–11, p. 17–21, 1 nov. 2000.
- UGGETTI, E. et al. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 437–443, 2014.
- URRUTIA, C.; YAÑEZ-MANSILLA, E.; JEISON, D. Bioremoval of heavy metals from metal mine tailings water using microalgae biomass. *Algal Research*, v. 43, p. 101659, 1 nov. 2019.
- WILDE, K. L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, n. 2, p. 174–185, 30 ago. 2006.
- YANG, J. S. et al. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 537–544, 1 jan. 2015.
- YONG, W. K. et al. Interactive effects of warming and copper toxicity on a tropical freshwater green microalga *Chloromonas augustae* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, p. 1–11, 10 mar. 2020.
- 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, 1 jun. 2012.
- ZHOU, G. J. et al. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 19, n. 7, p. 2918–2929, 2012.
- ZHOU, Q. et al. Effects of copper ions on removal of nutrients from swine wastewater and on release of dissolved organic matter in duckweed systems. *Water Research*, v. 158, p. 171–181, 1 jul. 2019.

## 5. ARTIGO II. Efeitos do cobre na constituição da biomassa microalgal e na remoção de nutrientes durante o tratamento de água residuária da suinocultura em lagoas de alta taxa

**Resumo:** A água residuária da suinocultura (ARS) é reconhecida por sua contaminação com Cu o que pode limitar a aplicação das microalgas para a recuperação os recursos presentes nesse efluente. Assim, as interferências do Cu na produção e constituição da biomassa e na remoção de nutrientes da ARS foi investigada. Para tanto, doze lagoas de alta taxa (LATs) foram operadas com 800 L de ARS com diferentes concentrações de Cu (0,1 a 4,0 mg/L), simulando as condições reais de cultivo. Os resultados mostraram que a concentração de 1,0 mg Cu/L estimula o crescimento algal, enquanto acima de 3,0 mg Cu/L causa inibição. A remoção de nutrientes da ARS foi alterada devido a presença de Cu sendo que um acréscimo nos teores desse elemento reduziu a taxa de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  (determinada por meio do modelo cinético logístico modificado) de 0,440 para 0,066  $\text{dia}^{-1}$  com a aplicação de 0,5 e 4,0 mg Cu/L, respectivamente. Um comportamento inverso foi observado para a taxa de remoção de P solúvel sendo que o valor igual a 0,002  $\text{dia}^{-1}$  foi obtido para a LAT com 0,5 mg Cu/L o qual aumentou para 0,038  $\text{dia}^{-1}$  no tratamento com 2,0 mg Cu/L. A remoção de Cu solúvel na ARS tratada alcançou 91%, a extração química sequencial demonstrou que esse desempenho estava associado com a precipitação de Cu com óxidos de Fe e Mn favorecidos pelos acréscimos de pH. Ao avaliar a composição bioquímica das biomassas verificou-se que os carboidratos (49,0 – 58,8%) e proteínas (34,9 – 38,6%) foram os compostos em maior concentração. Contudo, o Cu afetou a produção de lipídeos e carotenoides e o maior conteúdo foi observado no controle (15,5%) e 0,5 mg Cu/L (4,6 mg/g) respectivamente. Em conclusão, ajustes no teor de Cu pode ser utilizado para promover o crescimento das microalgas, contudo mudanças significativas foram observadas no desempenho das LATs quanto a remoção de nutrientes e constituição da biomassa.

**Palavras-chave:** *Chlorella* sp.; efluente agroindustrial; remoção de nutrientes; remoção de cobre; recuperação de recursos.

### 5.1. Introdução

A carne suína é uma das mais consumidas em todo o mundo o que coloca a suinocultura entre os setores mais importantes na produção de alimentos. Em 2019, cerca de 109,5 milhões de toneladas de carne suína foram consumidas (OECD, 2020) e o plantel mundial alcançou 769,05 milhões de animais (NAGARAJAN et al., 2019). Apesar da importância social e econômica da suinocultura, essa atividade é também considerada de grande potencial poluidor devido volume de resíduos gerados, estimados entre 3,07 a  $6,15 \times 10^6$  m<sup>3</sup>/dia (NAGARAJAN et al., 2019). Associado com esse volume expressivo, a água residuária da suinocultura (ARS) é um efluente reconhecido por apresentar diversos poluentes que incluem nutrientes (nitrogênio total de 200 a 2055 mg/L; fósforo total de 100 a 260 mg/L), matéria orgânica (demanda bioquímica de oxigênio de 2000 a 30000 mg/L) e metais como o cobre (CHENG et al., 2019).

A presença de Cu na ARS tem sua origem na ração fornecida aos suínos, sendo reportados valores entre 0,8 e 14,2 mg/L (CHENG et al., 2019). Essa característica se tornou uma preocupação pois, embora o Cu seja um micronutriente essencial para humanos, animais e plantas, pode oferecer riscos para a saúde humana e o meio ambiente. Diante disso, é necessário o tratamento adequado da ARS de forma a promover a remoção dos múltiplos poluentes encontrados nesse efluente, incluindo o Cu. O tratamento escolhido deve considerar as transformações em direção a economia circular, com abordagem que visa reciclar e economizar água, energia e nutrientes. Nesse cenário, o cultivo de microalgas na ARS ganhou notoriedade devido à capacidade desses microrganismos em promover o tratamento da ARS ao mesmo tempo em que produz biomassa com potencial para uso como ração animal e conversão em energia (SILVEIRA et al., 2021).

Apesar de todas as oportunidades envolvendo o cultivo de microalgas na ARS, a presença de Cu nesse efluente pode comprometer o tratamento pois, concentrações elevadas de Cu, como aquelas observadas na ARS, podem inibir o crescimento das microalgas e conferir maior toxicidade quando comparado com outros metais, como o zinco e o cádmio (BABU et al., 2014; CAO et al., 2015; NOVÁK et al., 2020). A presença de Cu também interfere nas reações bioquímicas e na remoção de nutrientes da ARS. Por exemplo, o Cu compromete a remoção de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), sendo este um importante parâmetro de avaliação do tratamento de águas residuárias. Li et al. (2018) observaram que quando a

concentração de Cu na ARS aumentou de 0,10 para 3,0 mg/L a redução de NH<sub>3</sub>-N obtida durante o cultivo de *Coelastrrella* sp. decresceu de 61,6% para 38,6%.

A composição bioquímica da biomassa também sofre interferências do Cu. Li et al. (2020) verificaram que a biomassa de *Scenedesmus dimorphus* apresentou um decréscimo na concentração média de carboidratos de 504 mg/g para 326 mg/g quando a concentração de Cu aumentou de 1,0 para 2,0 mg/L. Li et al. (2018) observaram que o conteúdo de proteínas na microalga *Coelastrrella* sp. decresceu de um proporção de 0,297 de proteína/massa de células secas em 0,10 mg Cu/L para 0,194 em 3,0 mg Cu/L. Por outro lado, Li et al. (2022) reportaram um acréscimo no conteúdo de lipídeos de cerca de 43 para 49% quando a concentração de Cu no meio de cultivo de *Monoraphidium* sp. QLY-1 aumentou de aproximadamente 0,5 mg Cu/L para 1,0 mg Cu/L.

Fica evidente que o Cu altera o desempenho do tratamento da ARS via microalgas. Contudo, esses efeitos devem ser melhor compreendidos afim de não inviabilizar a utilização dessa biotecnologia, mas apresentar as condições mais adequadas de tratamento que permita explorar todas as vantagens associadas com o cultivo de microalgas. Nessa avaliação podem ser aplicados balanços de massas e modelos matemáticos. Zhou et al. (2019) determinaram a máxima concentração de Cu na ARS que favorece a remoção de nutrientes utilizando lemnas por meio da aplicação do modelo cinético logístico modificado e com a identificação do stress ambiental externo.

Outro parâmetro a ser avaliado é a própria remoção de Cu. O cultivo de microalgas foi sugerido para a remoção de metais de águas residuárias devido a adsorção pela biomassa e precipitação em pH elevado que frequentemente ocorre durante o cultivo algal. Contudo, os estudos conduzidos para avaliar a capacidade de remoção de metais pelas microalgas foram conduzidos utilizando meio de cultura sintético enriquecido com um metal específico (HAMED et al., 2017a, 2017b; NOVÁK et al., 2020; PEÑA-CASTRO et al., 2004; RUGNINI et al., 2017b). Essas condições não consideram a composição heterogênea das águas residuárias que apresentam diversos compostos inorgânicos, matéria orgânica, sólidos em suspensão e uma comunidade microbiana diversificada que pode atuar na remoção dos metais.

Zeraatkar et al. (2016) enfatizam a necessidade de testes em escala piloto para verificar a real aplicabilidade das microalgas na remoção de metais. Oliveira et al. (2021) conduziram testes nessa configuração, utilizando LAT em escala piloto

alimentada com ARS com diferentes concentrações de Cu e Zn. Os autores obtiveram uma remoção média de Cu igual a 75,4% sendo atribuído uma contribuição modesta das microalgas nesse desempenho e outros fatores predominaram na remoção de Cu com a precipitação. A investigação das principais formas desse elemento deve ser investigada por meio da especiação química para assim sugerir as condições otimizadas de operação dos sistemas de cultivo algal de forma a maximizar a remoção.

Dessa forma o objetivo desse estudo foi avançar nas pesquisas com aplicações em escala piloto e por meio de uma análise mais abrangente. Para isso, buscou-se identificar os efeitos de diferentes concentrações de Cu no cultivo de microalgas considerando as interferências no crescimento algal e as alterações na remoção de nutrientes. Com a aplicação de modelos matemáticos que descreveram a variação desses resultados foi possível uma nova interpretação dos efeitos do Cu durante o tratamento da ARS em LATs. Além disso, buscou-se estabelecer os mecanismos que atuam na remoção de Cu durante o tratamento da ARS em LATs e avaliar as alterações na composição bioquímica da biomassa cultivada em diferentes concentrações desse elemento.

## **5.2. Materiais e Métodos**

### **5.2.1. Água residuária da suinocultura (ARS)**

A ARS utilizada nessa pesquisa foi obtida na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Suinocultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) (20°46'17"S 42°51'35"O). Nesse local é adotado o sistema de confinamento intensivo onde estão abrigadas 60 matrizes distribuídas em diferentes estágios de desenvolvimento (ciclo completo de produção). A limpeza e desinfecção das baias ocorre uma vez ao dia por meio de raspagem seguindo de lavagem com água. A água residuária gerada nesse processo é direcionada para a estação de tratamento que possui as seguintes unidades: desarenador, digestor anaeróbico do tipo canadense (250m<sup>3</sup>) seguindo de lagoa aerada (86m<sup>3</sup>) e decantador secundário. A ARS foi coletada na lagoa aerada e caracterizada (APHA, 2017) (Tabela 5.1).

**Tabela 5.1.** Caracterização da água residuária da suinocultura coletada na lagoa aerada e utilizada como meio de cultivo de microalgas.

Variável	Valor	Variável	Valor
pH	8,3	Fósforo solúvel (mg/L)	34,9
DQO* solúvel (mg/L)	161,0	Cond. elétrica (mS/cm)	3,6
Nitrogênio orgânico (mg/L)	60,0	Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	1337,9
Nitrato (mg/L)	46,6	Sól. suspensos voláteis (mg/L)	78,8
Nitrogênio amoniacal (mg/L)	293,6	Sól. suspensos totais (mg/L)	109,8
Fósforo total (mg/L)	66,5	Cobre total (mg/L)	0,1

\* demanda química de oxigênio

### 5.2.2. Operação das lagoas de alta taxa

Como unidades experimentais foram utilizadas doze LATs que estão instaladas na área externa do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental, na UFV (20°46'09"S e 42°51'29"O). As LATs são unidades de cultivo de microalgas e tratamento de efluentes com formato de pista construídas em fibra de vidro com volume útil de 1,00 m<sup>3</sup>, largura de 1,28 m, comprimento igual a 2,86 m, profundidade útil de 0,30 m e área útil de 3,30 m<sup>2</sup>. As LATs possuem pás de aço inoxidável acionados por um motor elétrico de 1 hp que por meio de um redutor e o inversor de frequência mantem a velocidade do efluente entre 0,10 m/s e 0,15 m/s. Em todas as doze LATs foram adicionados 800 L de ARS e 100 L de inoculo. O inoculo consiste em uma biomassa previamente cultivada na ARS o qual apresentou um teor de sólidos suspensos totais igual a 190,0 mg/L e concentração de clorofila *a* igual a 1138,3 µg/L. Em análise no microscópio, apenas o gênero *Chlorella* sp. foi identificado no inoculo.

Para avaliar as interferências do Cu no desempenho das LATs foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado no qual um tratamento controle e outras cinco diferentes concentrações de Cu foram testadas em duplicata, totalizando doze unidades experimentais. As LATs utilizadas como controle contaram apenas com a concentração de Cu que já estava presente na ARS (0,1 mg Cu/L). Nas demais LATs foram testadas as concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg Cu/L. Para a adição destas doses, a concentração de Cu que já estava presente na ARS foi considerada e por diferença determinou-se o volume de solução estoque a ser aplicado para alcançar os teores testados. Uma solução estoque de cloreto de cobre (200 g/L, marca Vetec Química) foi previamente preparada e transferida para as LATs conforme a concentração estabelecida. É importante destacar que a utilização de cloreto do cobre para promover um ajuste nas concentrações de Cu não conferiu alterações

expressivas na condutividade elétrica da ARS a qual variou de 3,40 a 3,95 mS/cm para todos os tratamentos.

As LATs foram operadas entre os meses de maio e junho de 2021 em regime de batelada até o decaimento da concentração de clorofila *a* (chl *a*) que foram quantificadas diariamente por meio da extração com etanol 80% a quente descrito em norma holandesa (NEDERLANDS NORM, 1981), com base em Nush (1980). Para os dias em que foram observadas as maiores concentrações de chl *a* amostras de cada LAT foram analisadas para a identificação dos gêneros de microalgas (BICUDO; MENEZES, 2006) utilizando câmara de Neubauer e microscópio (CX40 RF 100, Olympus Corporation). Durante esse período os valores médios de temperatura do ar variaram entre 14,2 e 21,1°C; a precipitação acumulada foi igual a 9,0 mm e a radiação solar total média foi de 1085,3 kJ/m<sup>2</sup> (INMET, 2021).

### 5.2.3. Avaliação da remoção de nutrientes

Para avaliar as interferências do Cu na remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e fósforo solúvel (Ps) foram adotadas duas metodologias, a primeira (i) consiste em realizar um balanço de massa com a identificação das diferentes formas de N e P no início e final do experimento. Para o N foram quantificados o N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; amônia livre (NH<sub>3</sub>); nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrogênio orgânico (Norg). A fração de NH<sub>3</sub> foi calculada conforme apresentado por Uggetti et al. (2014) utilizando valores de pH e temperatura medidos diariamente nas LATs utilizando sonda multiparâmetro (Hach modelo HQ30D). O mesmo equipamento foi utilizado para monitorar a saturação de oxigênio. As concentrações de NH<sub>3</sub> obtidas no decorrer do monitoramento (ou seja, determinadas durante todos os dias de condução do experimento) foram somadas. O resultado desse somatório foi reportado como concentração de NH<sub>3</sub> no final do experimento. Essa abordagem foi necessária devido a possibilidade de perdas de NH<sub>3</sub> por volatilização. As demais formas de N foram determinadas segundo APHA (2017). O nitrito não foi considerado por ser rapidamente oxidado. Para o P foram identificados as formas totais estabelecidas em APHA (2017) sendo elas o fósforo reativo (Pr); fósforo hidrolisável (Phidro) e fósforo orgânico (Porg).

A segunda metodologia (ii) consiste em identificar o stress ambiental externo (Q) induzido pelo Cu igualmente realizado por Zhou et al. (2019). Para isso foi aplicado o modelo cinético logístico modificado (Equação 5.1) para descrever a remoção de N-

$\text{NH}_4^+$  e Ps. A partir da identificação dos parâmetros do modelo foi possível calcular o valor de Q (Equação 5.2) para cada concentração de Cu e identificar a condição que fornece o menor valor.

$$C = \frac{C_0}{a+(1-a)e^{kt}} \quad \text{Equação 5.1}$$

$$Q = 1 - \frac{aC}{C_0} \quad \text{Equação 5.2}$$

Onde C é a concentração do nutriente (mg/L),  $C_0$  é a concentração inicial de nutriente (mg/L), t é o tempo (d), k é a constante de remoção ( $\text{d}^{-1}$ ), a é o parâmetro a ser estimado ( $a < 1$ ) e Q é o stress ambiental externo (ZHOU et al., 2019).

#### 5.2.4. Avaliação da remoção de cobre

A fração dissolvida do Cu (filtradas em membrana de  $0,45\mu\text{m}$ ) foi monitorada e definida nesse estudo como o parâmetro para avaliar as variações desse elemento durante o tratamento da ARS em LATs. Além disso, o método de extração química sequencial foi utilizado para verificar as diferentes formas químicas do Cu no início e final do experimento. Para isso, extratores químicos de força crescente foram utilizados conforme descrito em Tessier et al. (1979) e Veeken (1998). Em resumo, foram identificadas as frações de Cu precipitado com carbonatos por meio do ajuste do pH com ácido acético; ligado a óxidos de ferro e manganês extraído com solução de ditionito de sódio, citrato de sódio e ácido cítrico e por fim adsorvido na matéria orgânica extraído com solução de EDTA. Em todas as etapas, as concentrações de Cu foram submetidas a uma etapa de digestão seguida de leitura em espectrofotômetro de absorção atômica Varian SpectrAA 1000.

#### 5.2.5. Caracterização bioquímica da biomassa produzida

Ao final de cada teste, as pás das LATs foram desligadas por 12 horas para possibilitar a separação, por sedimentação gravitacional, da biomassa produzida. O sobrenadante foi descartado e a biomassa colhida foi seca em estufa a  $70^\circ\text{C}$  e posteriormente macerada e utilizada para a quantificação dos teores de proteínas,

carboidratos, lipídeos, carotenoides e cinzas. O teor de proteína foi definido pelo fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25 (ZHONG et al., 2012). O nitrogênio, por sua vez foi quantificado segundo APHA (2017). A concentração de carboidratos foi determinada a partir da hidrólise ácida quantitativa da biomassa (HOEBLER et al., 1989) seguida do método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

O teor de lipídios foi determinado pelo método de extração soxhlet (AOAC, 2000). A extração dos lipídeos neutros foi realizada no determinador de gordura (Tecnal TE-044-8/50) durante 6h, com o solvente hexano a 99%. Posteriormente, no mesmo equipamento, foi realizada a extração de lipídeos de membrana com etanol a 96% durante 3h e a quantificação foi realizada por gravimetria. A quantificação dos carotenoides totais na biomassa seca foi realizada conforme apresentado por Pancha et al. (2014) e com modificações descritas em Pozzobon et al. (2021). A determinação do teor de cinzas ocorreu por gravimetria no qual 1g de biomassa foi inserida em forno mufla a 550°C por 1h.

#### **5.2.6. Análises estatísticas**

Para comparar o desenvolvimento da biomassa, a remoção de nutriente e a caracterização bioquímica da biomassa entre as diferentes aplicações de Cu foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida do teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software Minitab 17. Os valores de Q foram avaliados usando regressão com identificação da curva que descreve as variações dos dados e do coeficiente de determinação.

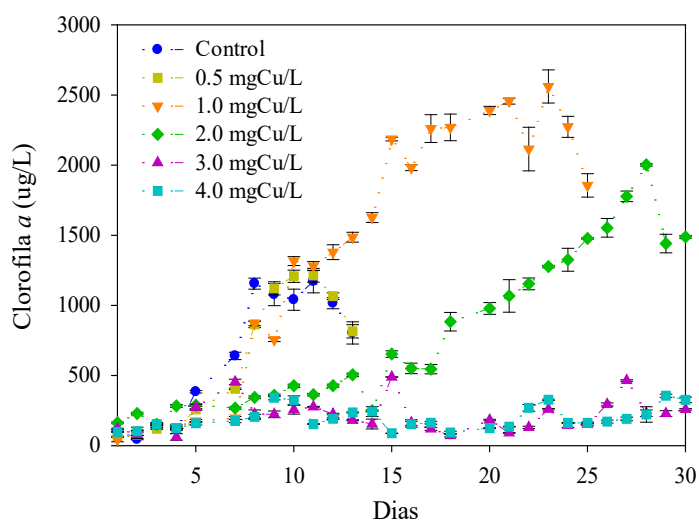
### **5.3. Resultados e Discussão**

#### **5.3.1. Produção de biomassa**

A identificação dos gêneros de microalgas presentes nas LATs não foi possível com a adição de 3,0 e 4,0 mg Cu/L devido ao pouco número de células. Para os demais tratamentos, apenas a *Chlorella* sp. foi observada. Entre as microalgas cultivadas na ARS, a *Chlorella* está entre as mais empregadas, principalmente as espécies *C. vulgaris* (CHENG et al., 2019) que são reconhecidas por sobreviver em

ambientes aquáticos poluídos e apresentar menor inibição na presença de Cu (PANDEY; HAN; GAUR, 2015).

O período de monitoramento de cada LAT variou conforme o decaimento dos teores de chl *a* (Figura 5.1). O controle e as LATs com a adição de 0,5 mg Cu/L foram acompanhadas por 13 dias, com a aplicação de 1,0 mg Cu/L foram monitoradas por 25 dias e os demais tratamentos foram acompanhados por 30 dias. Essas diferenças podem ser explicadas pela interação entre as microalgas e o Cu. Esse elemento é um micronutriente essencial para o crescimento algal pois está envolvido em diferentes funções incluído a atuação na cadeia de transporte de elétrons, a absorção de ferro e compõem diversas enzimas (PEERS; QUESNEL; PRICE, 2005; RAVEN; EVANS; KORB, 1999). É possível sugerir que as doses inferiores a 0,5 mg Cu/L não foram suficientes para atender essas demandas e suportar o crescimento algal, de forma que o Cu se tornou limitante, conferindo concentrações de chl *a* inferiores a 1215,0 µg/L.



**Figura 5.1.** Concentração de clorofila *a* obtidas durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2).

Por outro lado, a adição de 1,0 mg Cu/L possibilitou um crescimento contínuo das microalgas e proporcionou as maiores concentrações de chl *a* entre todos os tratamentos, alcançando até 2561,2 µg/L, a qual foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) se comparada com as demais LATs. A microalga *Scenedesmus dimorphus* também apresentou um crescimento otimizado com a adição de 1,0 mg Cu/L (LI et al., 2020). Na presente pesquisa, quando o Cu aumentou para 2,0 mg Cu/L, a concentração

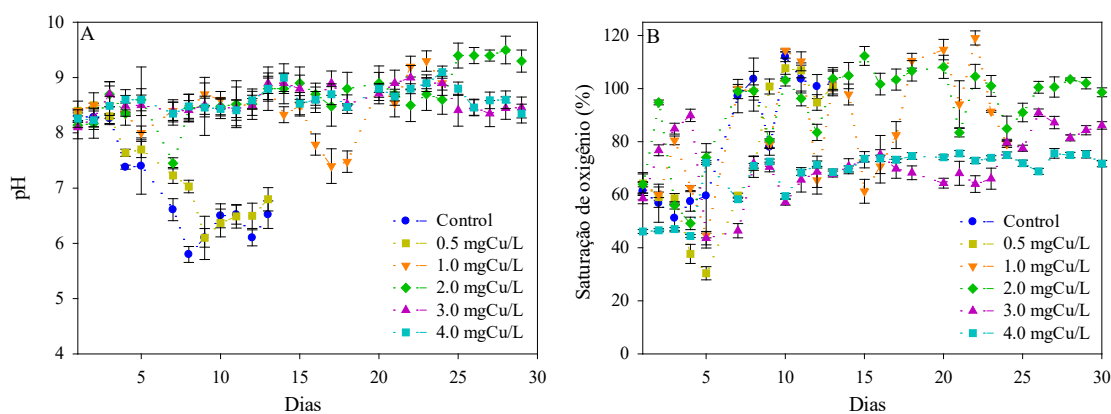
máxima de chl *a* foi igual a 2002,6 µg/L enquanto as LATs com 3,0 e 4,0 mg Cu/L inibiram o crescimento algal e conferiram um teor de chl *a* de 60-70% e 82-86% menor se comparado com o controle e com a adição de 1,0 mg Cu/L respectivamente. Esses resultados são semelhantes aos reportados para a espécie *Scenedesmus almeriensis* (SAAVEDRA et al., 2018), *Desmodesmus* sp., *Chlorella vulgaris* (RUGNINI et al., 2017) e a *Monoraphidium pusillum* (NOVÁK et al., 2020) que também apresentaram um crescimento inibido nas concentrações acima de 2,0 mg Cu/L. O Cu tem a capacidade de substituir o íon Mg<sup>2+</sup> na molécula de chl *a* e torná-la inativa, pode inativar enzimas e promover o estresse oxidativo (KÜPPER et al., 2003; LAPORTE et al., 2020).

### 5.3.2. Variações do pH e saturação de oxigênio

As variações do pH apresentaram dois comportamentos distintos conforme a concentração de Cu aplicada (Figura 5.2). Para as LATs controle e com a adição de 0,5 mg Cu/L foi observado um decréscimo do pH de 8,3 quantificado no início no monitoramento até 6,1. Para as demais LATs foi observado um comportamento inverso no qual o pH aumentou alcançando valores entre 9,0 e 9,5. Nas LATs é possível elencar alguns fatores que interferem nos valores de pH, entre eles tem-se a nitrificação que promove uma acidificação do meio enquanto a fotossíntese contribui com o aumento. Conforme o processo dominante, ocorre redução ou acréscimo do pH.

Essas alterações podem ter reflexos no desenvolvimento dos microrganismos e resultar em reações químicas que podem modificar a constituição da ARS, por exemplo o pH elevado observado nas LATs com adição acima de 1,0 mg Cu/L pode propiciar a precipitação do P que é favorecida em pH entre 9,0 e 10,5 (ARBIB et al., 2014; WHITTON et al., 2015) e do Cu que frequentemente ocorre em pH superior a 8,0 (SCHOCK; LYTLE, 1995). O pH acima de 9,2 possibilita a conversão do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em NH<sub>3</sub> (EZE et al., 2018) sendo esta última forma de N passível de volatilização. De forma oposta, as LATs controle e com aplicação de 0,5 mg Cu/L não apresentaram as condições mais adequadas para essas reações. Esse comportamento ficou evidente no balanço de massa realizado para o P e N conforme será discutido em detalhes no item 5.3.3.

As microalgas são reconhecidas por sua notória capacidade de produzir oxigênio, essa habilidade ficou evidenciada nas LATs com concentrações de Cu inferiores a 2,0 mg Cu/L onde a saturação de oxigênio alcançou 108%. A manutenção de condições aeróbias nas LATs devido a atuação das microalgas torna esse sistema de tratamento atrativo pois potencializa a oxidação da matéria orgânica e propicia a nitrificação. Por outro lado, as LATs com 3,0 e 4,0 mg Cu/L apresentaram as menores porcentagens com valores que não ultrapassaram 90,8 e 75,5% respectivamente, o que sugere uma atividade fotossintética reduzida em relação aos demais tratamentos. Esse comportamento condiz com os resultados apresentados no item 5.3.1.

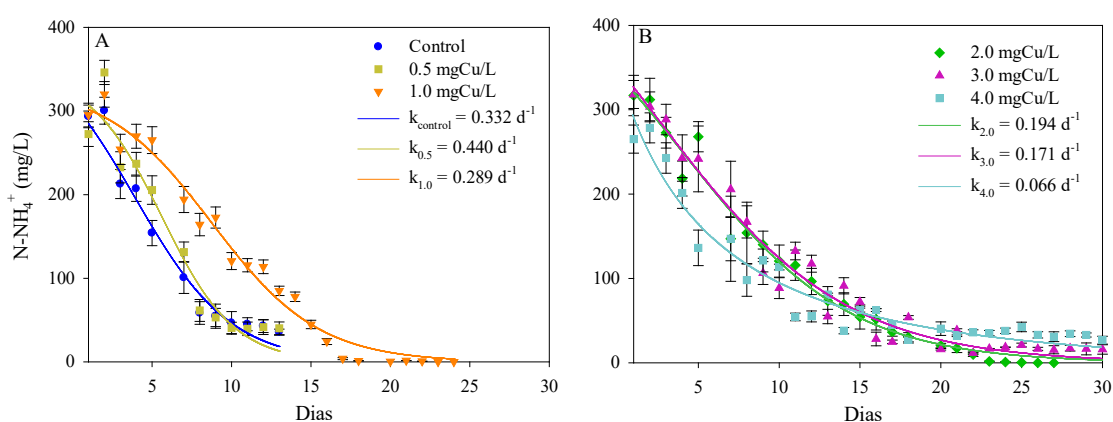


**Figura 5.2.** Variações do pH (A) e saturação de oxigênio (B) durante a operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.

A relação entre o desenvolvimento das microalgas e as variações de pH e saturação de oxigênio observados no presente estudo são semelhantes aos resultados reportados por Santiago et al. (2013) durante a operação de LAT alimentada com esgoto doméstico sem e com pré-desinfecção ultravioleta. Utilizando esgoto sem desinfecção foi obtido uma menor produção de biomassa, o pH médio do meio foi igual a 7,7 e a saturação de oxigênio foi igual a  $87 \pm 26\%$ . Quando o cultivo aconteceu em esgoto com desinfecção, uma maior produção de biomassa algal foi observada o que conferiu valores mais elevados de pH (até 9,1) e saturação de oxigênio ( $112 \pm 31\%$ ).

### 5.3.3. Remoção de nitrogênio e fósforo

Em todos os tratamentos as remoções de  $\text{N-NH}_4^+$  foram superiores a 80%, com destaque para as LATs que receberam 1,0 e 2,0 mg Cu/L que conferiram uma redução próxima de 100%, sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) se comparado com o tratamento controle (87,9%), com a adição de 0,5 mg Cu/L (85,4%) e 4,0 mg Cu/L (87,6%) (Figura 5.3). Contudo, a avaliação da velocidade com que essas remoções ocorreram demonstra que conforme a concentração de Cu aumentou, menor foram as taxas de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ , que decresceram de  $0,440 \text{ d}^{-1}$  em 0,5 mg Cu/L para  $0,066 \text{ d}^{-1}$  com a adição de 4,0 mg Cu/L.

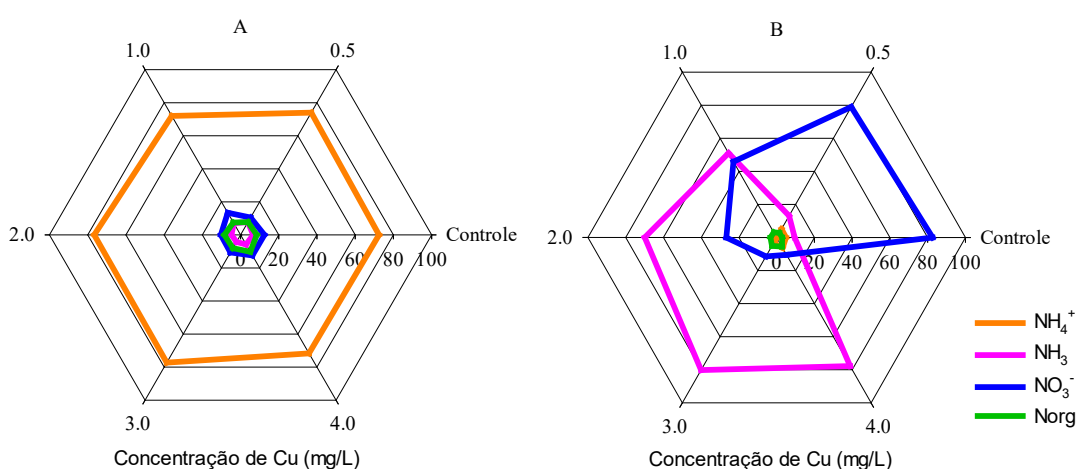


**Figura 5.3.** Variação das concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  e taxa de remoção durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu ( $n=2$ ).

A aplicação de Cu pode afetar negativamente as velocidades de conversão do  $\text{N-NH}_4^+$  em  $\text{NO}_3^-$  durante o tratamento da ARS em LATs (OLIVEIRA et al., 2021) uma vez que os microrganismos que atuam nesse processo, como as bactérias nitrificantes parecem ser sensíveis a presença de Cu. Esse comportamento foi observado ao realizar o balanço de massa de N (Figura 5.4). No final do experimento o  $\text{NO}_3^-$  foi a forma de N predominante no controle, com porcentagem igual a 82,6%. Essa fração decresceu conforme as concentrações de Cu aumentaram até valor mínimo de 10,5% quantificado na LAT com 4,0 mg Cu/L, sendo este teor semelhante ao observado no início do monitoramento.

Portanto, outros processos de conversão do  $\text{N-NH}_4^+$  permitiram alcançar as remoções superiores a 85% observadas em todos os tratamentos com aplicação de Cu (Figura 5.3). A assimilação e conversão em Norg apresentou a menor contribuição para esses resultados pois foi a forma de N com menor porcentagem observada ao

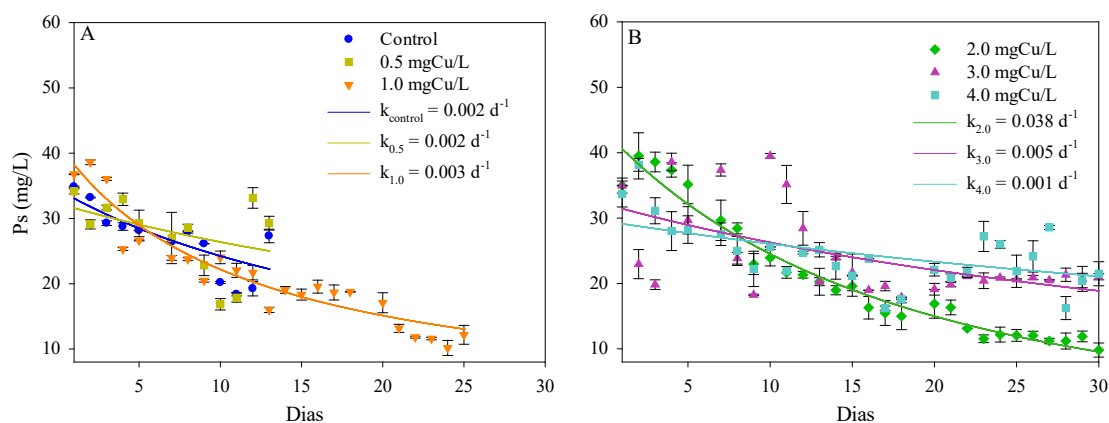
final do experimento (2,8 a 5,5%) e não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Por outro lado, a formação de  $\text{NH}_3$  acumulada durante o monitoramento foi mais expressiva, com porcentagens que alcançaram até 80%. A nitrificação pode acidificar o meio, como esse processo ficou comprometido nas LATs com aplicações de Cu, o aumento do pH em decorrência da fotossíntese foi predominante, sendo este um dos fatores determinantes para a formação  $\text{NH}_3$ . Esse comportamento é desfavorável para a recuperação de N na forma de biomassa uma vez que predominou as perdas de N com a formação de  $\text{NH}_3$ .



**Figura 5.4.** Balanço de massa para as diferentes formas de N quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.

Quanto às concentrações de Ps, foi observado uma remoção significativamente maior ( $p < 0,05$ ) com a aplicação de 1,0 mg Cu/L (68,5%) e 2,0 mg Cu/L (71,7%) se comparado com as demais LATs, onde as reduções foram de 57,6 a 21,6% (Figura 5.5). Diferente da taxa de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ , a taxa de remoção de Ps aumentou de  $0,002\text{d}^{-1}$  na LAT com 0,5 mg Cu/L até  $0,038\text{d}^{-1}$  com a aplicação de 2,0 mg Cu/L. O melhor desempenho observado nesta última LAT está possivelmente associado com o pH alcalino que promove a precipitação do P e o crescimento algal que favorece a assimilação. Além disso parece existir uma intrínseca relação entre P e metais. Laporte et al. (2020) verificaram que a espécie *Ulva compressa* apresentou maior requisito de energia para se adaptar ao meio com Cu. Su (2021) mencionam que o acúmulo de polifosfato facilita a incorporação de metais nas células de microalgas. Esses aspectos, ou seja, a produção de ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) juntamente com o acúmulo de polifosfato podem ter favorecido a

remoção de Ps nos tratamentos com doses mais elevadas de Cu. Esse fato é reiterado ao observar a segunda maior taxa de remoção de P, o qual ocorreu com a aplicação de 3,0 mg Cu/L ( $0,005 \text{ d}^{-1}$ ).

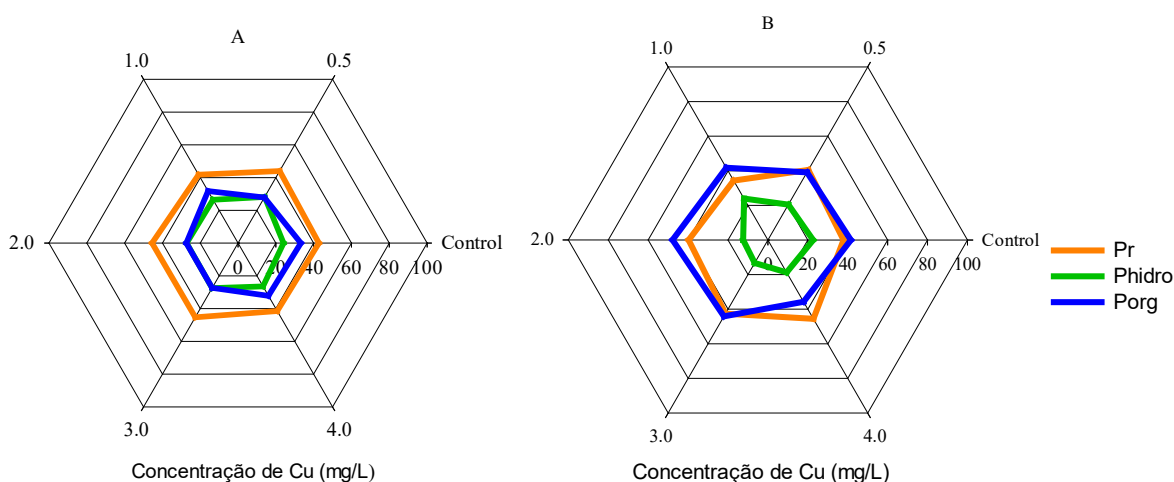


**Figura 5.5.** Variação das concentrações de Ps e taxa de remoção durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu ( $n=2$ ).

Entre as diferentes formas de P quantificadas no início do experimento, a concentração de Pr representou a maior fração (41,4 a 45,5%) seguido do Porg (27,3 a 33,2%) e Phidro (24,0 a 28,2%) (Figura 5.6). Após o tratamento, foi observado uma redução de Pr nas LATs onde o crescimento algal foi favorecido. A LAT com 1,0 mg Cu/L conferiu a menor fração (34,3%), já a LAT com 4,0 mg Cu/L apresentou a maior porcentagem, com valor igual a 45,6%. O Pr é amplamente mensurado como ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (APHA, 2017), sendo essa a principal forma na qual as microalgas assimilam P (KHANZADA, 2020). Portanto, uma redução nessa fração é esperada conforme as microalgas se desenvolvem o que pode justificar a menor porcentagem obtida com a adição de 1,0 mg Cu/L pois esse tratamento apresentou as condições mais adequadas para o crescimento das microalgas.

O decréscimo nas concentrações de Pr foi acompanhado de um aumento nos teores de Porg, a maior concentração foi verificada na LAT com 2,0 mg Cu/L (47,7%) seguido da LAT com 3,0 mg Cu/L (44,1%) enquanto a LAT com 4,0 mg Cu/L conferiu a menor porcentagem (35,7%). Esses resultados reiteram a hipótese de maior assimilação de P com a adição de Cu e possivelmente contribui para que a LAT com 2,0 mg Cu/L apresentasse a maior remoção de Ps (71,7%) entre todos os tratamentos. Esses resultados são inovadores considerando a dificuldade de remoção de P nos sistemas de tratamento de efluentes. Estudos anteriores mostraram uma redução de

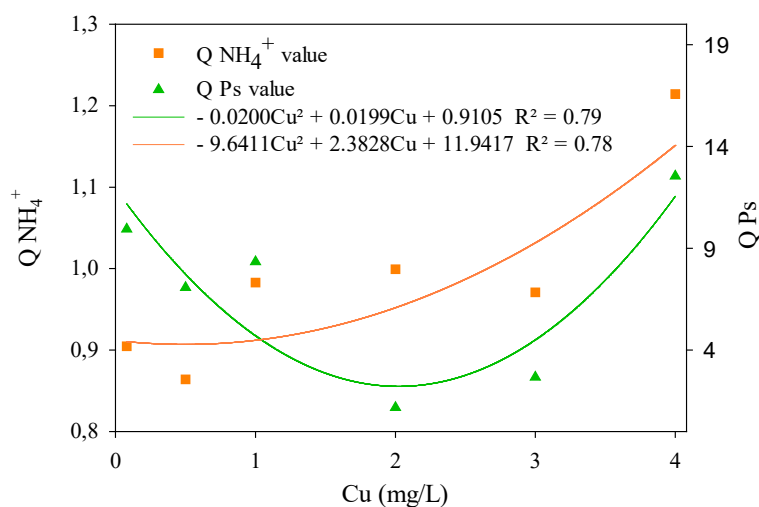
P inferior ao verificado nesta pesquisa. Sutherland et al. (2014) obtiveram eficiência máxima de 60% na remoção do Ps do esgoto doméstico tratado em LAT. Cheng et al. (2017) reportaram uma redução máxima de 50% alcançada por meio de ajustes na relação N:P do meio de cultivo.



**Figura 5.6.** Balanço de massa para as diferentes formas de P quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu.

Diante do fato da aplicação de Cu afetar as remoções de  $\text{N-NH}_4^+$  e Ps e visando a proposição de doses de Cu de forma a não comprometer a remoção de nutrientes, foi identificado o estresse ambiental externo (Q) induzido pelo Cu (Figura 5.7). A curva quadrática que descreve a dispersão dos valores de Q evidencia que o efeito inibidor do Cu foi maior na remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  se comparado com a remoção de Ps. A resolução das equações conferiu os valores mínimos de Q nas doses de 0,5 mg Cu/L e 2,0 mg Cu/L para a remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e Ps respectivamente.

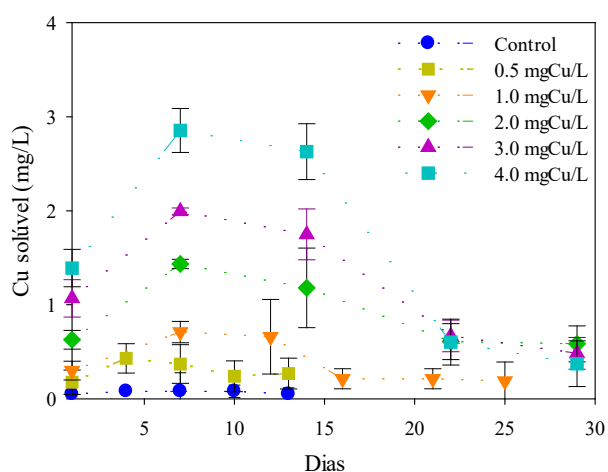
Com essa abordagem foi possível identificar três diferentes doses de Cu, aquela que estimula a produção de microalgas (1,0 mg Cu/L), que melhora a taxa de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  (0,5 mg Cu/L) e a concentração que potencializa a remoção de Ps (2,0 mg Cu/L). Chen et al. (2015) cultivaram *C. vulgaris* FACHB-6 em diferentes concentrações de Cd e observaram que a coexistência de metais pesados na água residuária pode afetar a remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . Contudo, essa característica tem recebido pouca atenção. Por esse motivo os resultados obtidos na presente pesquisa apresentam uma contribuição importante ao identificar as concentrações de Cu que afetam a dinâmica de tratamento e produção de biomassa em LATs.



**Figura 5.7.** Efeitos do estresse ambiental externo induzido pelo Cu na remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e Ps.

### 5.3.4. Remoção de cobre

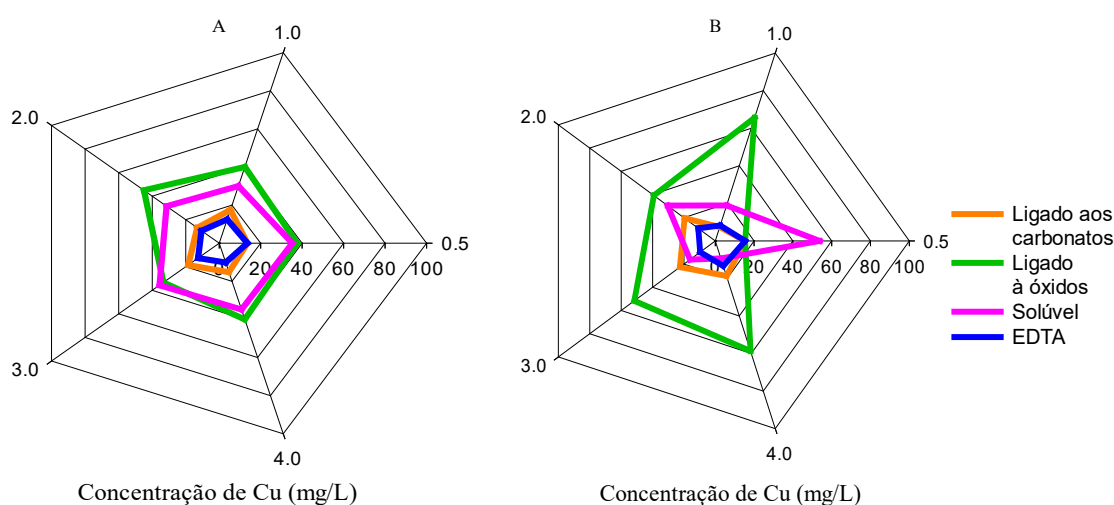
É possível observar que o Cu reagiu com os compostos presentes na ARS o que conferiu uma redução da fração dissolvida em relação à dose aplicada, com remoções entre 64 e 70% observadas no primeiro dia de monitoramento. Essa ocorrência pode ser atribuída às reações entre o Cu e os constituintes da ARS. Nicolau et al. (2005) observaram o mesmo comportamento após a adição de Cu no esgoto doméstico para avaliar a toxicidade no sistema de lodos ativados.



**Figura 5.8.** Variações de Cu dissolvido durante o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2).

No decorrer do tratamento o controle apresentou a menor variação de Cu dissolvido com concentrações que permaneceram próximo de 0,08 mg/L. Entre as LATs com aplicação de Cu, a adição de 0,5 mg Cu/L proporcionou a menor redução de Cu dissolvido ao final do monitoramento (46%) em relação a dose aplicada (0,5 mg Cu/L). Para as demais LATs foi observado uma remoção expressiva, que alcançou 71 a 91% em relação a dose aplicada. Contudo, esse desempenho não apresentou correlação com o crescimento da biomassa estimada pelos teores de chl a ( $R^2 < 0,38$ ). O pH elevado observado nessas LATs (9,0 a 9,5) provavelmente contribuiu para a precipitação e o melhor desempenho se comparado ao tratamento com 0,5 mg Cu/L onde o pH foi inferior a 8,5.

Para identificar os principais fatores que afetam a dinâmica de variação do Cu em LAT foi aplicada a extração sequencial. Os resultados obtidos permitiram identificar a porcentagem de Cu que estava na forma dissolvida, ligada a carbonatos, a óxidos de ferro e manganês e compostos orgânicos (Figura 5.9). O balanço de massa obtido com a aplicação dessa metodologia permitiu uma recuperação de Cu que variou entre 102 e 122% o que demonstra que as frações identificadas nesse estudo são as mais representativas. Os resultados obtidos na presente pesquisa corroboram com as porcentagens reportadas em estudos semelhantes no qual a uma recuperação de metal após sucessivas extrações variou entre 71,1 e 146,1% (TYTŁA, 2020) e entre 90 e 120% para o Cu (WILDE et al., 2006).



**Figura 5.9.** Balanço de massa para as diferentes formas de Cu quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuária da suinocultura.

No início do experimento o Cu ligado aos óxidos de Fe e Mn representava a maior fração, entre 33,3 e 40,9%, seguido do Cu dissolvido (30,0 a 35,6%), enquanto a fração ligada aos compostos orgânicos apresentou a menor contribuição (10,1 a 13,6%). Ao final do tratamento, as porcentagens relacionadas aos carbonatos e compostos orgânicos apresentaram as menores variações comparada com o início do tratamento. A alteração mais expressiva ocorreu na LAT com 1,0 mg Cu/L com redução de 17,5% para 7,4% relacionado aos carbonatos e de 12,5% para 8,2% associado com os compostos orgânicos.

Com o desenvolvimento da biomassa esperava-se uma contribuição mais expressiva dos compostos orgânicos na formação de complexos com o Cu. Esse elemento é reconhecido pela a formação de moléculas estáveis com a matéria orgânica (SILVEIRA; ALLEONI; GUILHERME, 2003). A extração sequencial de Cu em lodo de esgoto demonstrou que a fração ligada organicamente correspondia a porcentagens acima de 80% (TYTŁA, 2019, 2020), resultado não observado na presente pesquisa. Esse comportamento pode estar associado com o pH, pois reportou-se que a sorção ótima de cátions metálicos por microalgas ocorre no pH entre 4 e 6 pois grupos funcionais liberam seus prótons e se tornam disponíveis para a ligação dos metais (KUMAR; PANDEY; GAUR, 2016).

Por outro lado, as frações dissolvidas e relacionada com os óxidos de Fe e Mn apresentaram uma variação mais expressiva. A LAT com aplicação de 0,5 mg Cu/L proporcionou um acréscimo de Cu dissolvido que passou de 35,2% no início do experimento para 53,9% no final do monitoramento. Esse comportamento foi acompanhado de uma redução nas frações de Cu ligado aos óxidos que decresceu de 37,6% para 15,4%. Nos demais tratamentos foi observado uma variação inversa, sendo que a fração ligada aos óxidos aumentou em relação ao início do experimento, alcançando uma porcentagem de até 65,6%. Essa divergência nos resultados pode ser atribuído as variações do pH, pois o aumento do pH diminui a solubilidade dos óxidos (KRUGER GONÇALVES et al., 2011).

Diante desses resultados é possível sugerir que as microalgas têm um importante papel na remoção de Cu em LAT, contudo a atuação predominante não parece estar associada com a assimilação, mas com os acréscimos do pH resultado da atividade fotossintética.

### 5.3.5. Composição bioquímica da biomassa

É essencial a caracterização da biomassa desenvolvida nas diferentes concentrações de Cu a fim de se estabelecer as rotas de valorização adequadas. A adição de Cu contribuiu para os teores de cinzas que aumentaram de 35,5% no controle até 51,2% com a adição de 4,0 mg Cu/L, por esse motivo a composição bioquímica da biomassa foi realizada considerando a biomassa seca livre de cinzas (Tabela 5.2). Em todos os tratamentos o composto em maior concentração foram os carboidratos, com porcentagens acima de 49%. Destaque para as adições de 1,0 e 2,0 mg Cu/L que apresentaram um teor igual a 58,1 e 58,8% respectivamente, sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) se comparado com o controle (49,4%). Wang et al. (2015) reportaram concentrações de carboidratos semelhantes, entre 46,0 e 58,3%, na biomassa de *Chlorella vulgaris* JSC-6 cultivada em ARS com diferentes diluições.

Uma possível rota de valorização energética para a biomassa com maior concentração de carboidratos é a produção de bioenergia como bioetanol e biogás. Os carboidratos de microalgas são representados principalmente por glicose, amido e celulose que podem ser fermentados (CHEN et al., 2015; HO et al., 2013; WANG et al., 2015). Essa rota é particularmente atraente pois os carboidratos à base de microalgas são considerados sem lignina. Além disso, a produção de carboidratos de microalgas não compete por terras agrícolas e produção de alimentos o que constitui uma vantagem em relação as matérias primas tradicionais utilizadas na produção de bioetanol, como a cana-de-açúcar (KOUTRA et al., 2018; YEN et al., 2013).

**Tabela 5.2.** Concentração de proteínas, carboidratos, lipídeos e carotenoides quantificados na biomassa seca livre de cinzas cultivada na água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Cu (n=2).

Tratamento (mg Cu/L)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)		Carotenoides (mg/g)
			Neutros	Membrana	
Controle	49,4 b	34,9 a	5,4 a	10,1 a	2,0 b
0,5	49,8 b	39,1 a	3,5 a	7,2 ab	4,6 a
1,0	58,1 a	34,2 a	2,8 a	4,8 bc	0,7 e
2,0	58,8 a	37,4 a	2,3 a	6,6 abc	1,2 c
3,0	53,5 ab	35,5 a	2,9 a	2,7 c	0,7 d
4,0	55,0 ab	38,6 a	2,9 a	3,3 c	0,4 f

Na mesma coluna, letras diferentes indica diferença significativa ao nível de 5%.

A produção de biogás é outra alternativa potencial devido à baixa assimilação de N (Norg < 5,5%, Figura 5.4) associado com o conteúdo elevado de carboidratos o

que pode conferir uma relação C:N adequada para a digestão anaeróbia. Uma terceira opção para a obtenção de biocombústível a partir de biomassa rica em carboidratos é a produção de hidrochar por meio da carbonização hidrotérmica (CHT). Esse processo é amplamente utilizado para a conversão de biomassas lignocelulósicas em biochar enquanto especificamente para a biomassa de microalgas as pesquisas estão em andamento. Contudo, os resultados são promissores pois com a aplicação da CHT é possível obter hidrochar derivado de microalgas com características que se assemelham a alguns carvões, como lignita (MARIN-BATISTA et al., 2019).

Outras aplicações foram citadas na literatura. Silveira et al. (2021) também verificaram que a biomassa cultivada em ARS apresentou maior concentração de carboidratos (20,8 a 31,3% considerando a biomassa com cinzas) se comparado com as proteínas e lipídeos. Os autores sugerem a aplicação dessa biomassa para a produção de ração animal pois os carboidratos constituem a maior proporção na dieta animal e as porcentagens obtidas foram próximas aos da soja, importante matéria-prima utilizada na alimentação animal.

A aplicação de Cu não interferiu nos teores de proteínas pois as porcentagens obtidas não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), com valores que permaneceram entre 34,9 a 38,6%. Esse comportamento está associado com a assimilação de N (Norg) que também não apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 5.4). O conteúdo obtido no presente estudo foi similar ao valor médio de 39,2% observado por Moheimani et al. (2018) para a biomassa de microalgas cultivada em ARS. Os autores consideraram a biomassa um substituto para o farelo de soja, comumente utilizado na alimentação animal. O perfil de aminoácidos da *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* foi semelhante aos grãos tradicionalmente utilizados na composição da ração animal (BECKER, 2007). A utilização da biomassa de microalgas na alimentação dos suínos desperta grande interesse pois a ração é um insumo que pode representar mais de 50% do custo total de produção de suínos (VELAYUDHAN; KIM; NYACHOTI, 2015).

Outra característica atrativa na utilização da biomassa na suplementação animal diz respeito a presença de carotenoides que são reconhecidos por atuarem no fortalecimento do sistema imunológico e como antioxidantes naturais além de serem precursores da vitamina A (CHRISTAKI et al., 2013). Os teores de carotenoides totais obtidos para a biomassa cultivada na LAT com 0,5 mg Cu/L apresentou o maior conteúdo (4,6 mg/g) seguido do tratamento controle (2,0 mg/g) enquanto os demais

tratamentos apresentaram uma concentração até 12x menor. É interessante observar que os maiores conteúdos de carotenoides totais não foram observados nos tratamentos que favoreceram o crescimento algal (1,0 e 2,0 mg Cu/L).

Conforme discutido no item 5.3.1 é possível sugerir que concentrações menores que 0,5 mg Cu/L foram insuficientes para suportar o crescimento algal, essa condição de limitação de micronutrientes pode aumentar a produção de carotenoides pois, além de atuar na absorção de luz, os carotenoides são antioxidantes que pode ter a produção estimulada em condições de estresse (MINHAS et al., 2016). O pH de 6,1 a 8,5 observado no controle e com a aplicação de 0,5 mg Cu/L também pode ter contribuído para esse resultado em relação ao demais tratamentos, onde o pH alcançou 9,5. O pH igual a 7,5 foi sugerido como a condição ideal para a cultura de *Dunaliella salina* atingir a maior taxa de produção de beta caroteno (POURKARIMI et al., 2020).

A concentração de carotenoides observada na LAT com 0,5 mg Cu/L foi maior que os teores de 183,03 µg/g reportados por Rodrigues et al. (2014) para a biomassa da microalga *Phormidium autumnale* cultivada em água residuárias de matadouro e também superou o conteúdo de 1 – 2 g/kg de matéria seca mencionados por Christaki et al. (2013) como o conteúdo esperado de carotenoides para as microalgas. Por outro lado, os resultados obtidos na presente pesquisa foram semelhantes aos teores reportados por Sukumaran et al. (2014) de 0,175 a 0,573% para a biomassa de *Arthrospira platens* cultivada em meio sintético com diferentes proporções de efluente da indústria de óleo de palma. Dessa forma, a ARS com ajuste adequado na concentração de Cu demonstrou elevado potencial para cultivo de microalgas para a produção de carotenoides.

Quanto aos teores de lipídeos, o maior conteúdo de lipídeo total foi observado no controle (15,5%) seguido da adição de 0,5 mg Cu/L (10,7%) enquanto os valores mínimos de 5,6 e 6,3% foram observados nas biomassas cultivadas nas LATs com 3,0 e 4,0 mg Cu/L respectivamente. Esse decréscimo são reflexos da redução de lipídeos de membrana enquanto os lipídeos neutros não foram significativamente diferentes entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Os lipídios neutros são de interesse para a produção de biocombustíveis, contudo os teores observados no presente estudo foram inferiores a 5,4% e podem não ser atrativos para a conversão em biodiesel.

Os lipídios de membrana são compostos de ácidos graxos e são importantes componentes estruturais das membranas celulares e organelas (SOLOVCHENKO,

2012). Na presente pesquisa foi observado que a adição de Cu alterou esses compostos conferindo uma redução de até 73,0% nos tratamentos com as maiores aplicações de Cu se comparado ao controle. A limitação de Cu no tratamento controle e com a aplicação de 0,5 mg Cu/L pode ter induzido maior produção de lipídeos, semelhante ao observado para os carotenoides. O Cu induz a produção de espécies reativas de oxigênio que podem causar a peroxidação dos lipídios da membrana (FERNANDES; HENRIQUES, 1991). Esse comportamento foi sugerido em estudo anterior que identificou que os teores de lipídios na biomassa cultivada em ARS foram comprometidos em condições de excesso de Cu e Zn e o tratamento controle apresentou a máxima concentração (OLIVEIRA et al., 2021).

#### **5.4. Conclusão**

Foi possível concluir que a aplicação de 1,0 mg Cu/L promoveu o desenvolvimento das microalgas enquanto concentrações inferiores não foram suficientes para suportar o crescimento algal. Essas condições divergiram daquelas mais propícias para a remoção de nutrientes, sendo que a taxa de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  ficou comprometida nas doses acima de 0,5 mg Cu/L. Por outro lado, o Cu favoreceu a remoção de Ps na concentração de 2,0 mg Cu/L. O principal mecanismo de remoção de Cu foi a precipitação com óxidos de Fe e Mn em decorrência dos acréscimos do pH observados nos tratamentos com concentrações acima de 1,0 mg Cu/L. A rota mais atrativa para a aplicação da biomassa cultivada em 0,5 mg Cu/L é a utilização como ração animal enquanto a biomassa com 1,0 mg Cu/L possui características atrativas para a conversão em bioetanol, biogás e hidrochar.

#### **Referências**

- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23. ed. 1504p.
- ARBIB, Z. et al. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, v. 49, p. 465–474, 1 fev. 2014.

- BABU, M. Y. et al. Cadmium and copper toxicity in three marine macroalgae: Evaluation of the biochemical responses and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 16, p. 9604–9616, 27 maio 2014.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein *Biotechnology Advances* Elsevier, , 1 mar. 2007.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Genines of continental water seaweed in Brazil - key for identification and descriptions [in Portuguese]. [s.l: s.n.].
- CAO, D. JU et al. Effects of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on growth and physiological characteristics of green algae, *Cladophora*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 21, p. 16535–16541, 17 jun. 2015.
- CHEN, B. et al. Role of extracellular polymeric substances from *Chlorella vulgaris* in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium. *Bioresource Technology*, v. 190, p. 299–306, 1 ago. 2015.
- CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.
- CHENG, T.; WEI, C. H.; LEIKNES, T. O. Polishing of anaerobic secondary effluent by *Chlorella vulgaris* under low light intensity. *Bioresource Technology*, v. 241, p. 360–368, 1 out. 2017.
- CHRISTAKI, E. et al. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, n. 1, p. 5–11, 15 jan. 2013.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- EZE, V. C. et al. Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, v. 32, p. 131–141, 1 jun. 2018.
- FERNANDES, J. .; HENRIQUES, F. . Biochemical, Physiological, and Structural Effects of Excess Copper in Plants on JSTOR. In: *Botanical Review*. [s.l: s.n.]. p. 246–273.
- HAMED, S. M. et al. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 140, p. 256–263, 1 jun. 2017a.
- HAMED, S. M. et al. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 144, p. 19–25, 1 out. 2017b.

- HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 191–198, 1 maio 2013.
- 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.
- INMET, N. I. OF M. INMET Meteorological Database. [s.l: s.n.]. Disponível em: <Banco de Dados Meteorológicos do%0AINMET>.
- KHANZADA, Z. T. Phosphorus removal from landfill leachate by microalgae. *Biotechnology Reports*, v. 25, p. e00419, 1 mar. 2020.
- KOUTRA, E. et al. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779918300830>>. Acesso em: 2 ago. 2020
- KRUGER GONÇALVES, G. et al. RELAÇÃO ENTRE ÓXIDOS DE FERRO E DE MANGANÊS E A SORÇÃO DE FÓSFORO EM SOLOS NO RIO GRANDE DO SUL (1). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, p. 1633–1639, 2011.
- KUMAR, D.; PANDEY, L. K.; GAUR, J. P. Metal sorption by algal biomass: From batch to continuous system. *Algal Research*, v. 18, p. 95–109, 2016.
- KÜPPER, H. et al. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Functional Plant Biology*, v. 30, n. 12, p. 1187, 2003.
- LAPORTE, D. et al. Copper-induced concomitant increases in photosynthesis, respiration, and C, N and S assimilation revealed by transcriptomic analyses in *Ulva compressa* (Chlorophyta). *BMC Plant Biology*, v. 20, n. 1, p. 25, 15 jan. 2020.
- LI, S. et al. Combined effects of 17 $\beta$ -estradiol and copper on growth, biochemical characteristics and pollutant removals of freshwater microalgae *Scenedesmus dimorphus*. *Science of the Total Environment*, v. 730, p. 138597, 15 ago. 2020.
- LI, X. et al. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource Technology*, v. 251, n. December 2017, p. 274–279, 2018.
- LI, X. et al. Gamma-aminobutyric acid coupled with copper ion stress stimulates lipid production of green microalga *Monoraphidium* sp. QLY-1 through multiple mechanisms. *Bioresource Technology*, v. 352, p. 127091, 1 maio 2022.

- MARIN-BATISTA, J. D. et al. Valorization of microalgal biomass by hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 274, p. 395–402, 1 fev. 2019.
- MINHAS, A. K. et al. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Frontiers in Microbiology* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org), v. 1, p. 546, 2016.
- MOHEIMANI, N. R. et al. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. *Algal Research*, v. 35, p. 362–369, 1 nov. 2018.
- NAGARAJAN, D. et al. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 out. 2019.
- NEDERLANDS NORM. NEN 6520. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-a Content. *Nederlands Normalisatie-Instituut, Delft, The Netherlands.*, 1981.
- NOVÁK, Z. et al. Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (Chlorophyceae) species. *Phycological Research*, 23 mar. 2020.
- NUSH, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 4, p. 14–36, 1980.
- OECD. OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. Disponível em: [https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH\\_AGLINK\\_2020&lang=en](https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2020&lang=en). Acesso em: 11 nov. 2021.
- 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.
- 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, 1 mar. 2014.
- PANDEY, L. K.; HAN, T.; GAUR, J. P. Response of a phytoplanktonic assemblage to copper and zinc enrichment in microcosm. *Ecotoxicology*, v. 24, n. 3, p. 573–582, 6 jan. 2015.
- PEERS, G.; QUESNEL, S. A.; PRICE, N. M. Copper requirements for iron acquisition and growth of coastal and oceanic diatoms. *Limnology and Oceanography*, v. 50, n. 4, p. 1149–1158, 1 jul. 2005.

- PEÑA-CASTRO, J. M. et al. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource Technology*, v. 94, n. 2, p. 219–222, 1 set. 2004.
- POURKARIMI, S. et al. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, p. 101771, 1 out. 2020.
- POZZOBON, V. et al. Nitrate and nitrite as mixed source of nitrogen for *Chlorella vulgaris*: Growth, nitrogen uptake and pigment contents. *Bioresource Technology*, v. 330, p. 124995, 1 jun. 2021.
- RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, v. 60, p. 111–149, 1999.
- RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, v. 65, n. PB, p. 144–148, 1 nov. 2014.
- RUGNINI, L. et al. Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. *Science of the Total Environment*, v. 601–602, p. 959–967, 1 dez. 2017.
- SANTIAGO, A. F. et al. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environmental Technology*, v. 34, n. 13–14, p. 1877–1885, 1 jul. 2013.
- SCHOCK, M. R.; LYTLE, D. A. Effect of pH, DIC, orthophosphate and sulfate on drinking water cuprosolvency. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30003CGQ.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=>>>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- SILVEIRA, C. F. et al. Valorization of swine wastewater in a circular economy approach: Effects of hydraulic retention time on microalgae cultivation. *Science of The Total Environment*, v. 789, p. 147861, 1 out. 2021.
- SILVEIRA, M. L. A.; ALLEONI, L. R. F.; GUILHERME, L. R. G. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*, v. 60, n. 4, p. 793–806, 1 out. 2003.

- SOLOVCHENKO, A. E. Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. *Russian Journal of Plant Physiology* 2012 59:2, v. 59, n. 2, p. 167–176, 26 fev. 2012.
- SUKUMARAN, P. et al. Potential of fresh POME as a growth medium in mass production of *Arthrospira platensis*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, v. 3, n. 4, p. 235–250, 2014.
- SUTHERLAND, D. L.; TURNBULL, M. H.; CRAGGS, R. J. Increased pond depth improves algal productivity and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Research*, v. 53, p. 271–281, 15 abr. 2014.
- TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. v. 51, n. 7, p. 844–851, 1979.
- TYTŁA, M. Assessment of heavy metal pollution and potential ecological risk in sewage sludge from municipal wastewater treatment plant located in the most industrialized region in poland—case study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 13, p. 1–16, 2019.
- TYTŁA, M. Identification of the chemical forms of heavy metals in municipal sewage sludge as a critical element of ecological risk assessment in terms of its agricultural or natural use. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 13, p. 1–22, 2020.
- UGGETTI, E. et al. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 437–443, 2014.
- VEEKEN, A. Modelling of heavy metal behaviour and development of removal. [s.l.: s.n.].
- VELAYUDHAN, D. E.; KIM, I. H.; NYACHOTI, C. M. Characterization of dietary energy in swine feed and feed ingredients: A review of recent research results *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* Asian-Australasian Association of Animal Production Societies, , 1 jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/2015.23>. Acesso em: 16 ago. 2020
- WANG, Y. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, v. 198, p. 619–625, 1 dez. 2015.
- WHITTON, R. et al. Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment *Environmental Technology*

Reviews Taylor and Francis Ltd., , 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21622515.2015.1105308>>. Acesso em: 9 ago. 2020

WILDE, K. L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 51, n. 2, p. 174–185, 30 ago. 2006.

YEN, H. W. et al. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 166–174, 1 maio 2013.

ZERAATKAR, A. K. et al. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, v. 181, p. 817–831, 2016.

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, 1 jun. 2012.

ZHOU, Q. et al. Effects of copper ions on removal of nutrients from swine wastewater and on release of dissolved organic matter in duckweed systems. *Water Research*, v. 158, p. 171–181, 1 jul. 2019.

## 6. ARTIGO III. Tratamento da água residuária da suinocultura à base de microalgas para remoção de micropoluentes: desempenho de lagoas de algas de alta taxa operadas com diferentes concentrações de zinco

**Resumo:** O objetivo desse estudo foi identificar as interferências de diferentes concentrações de Zn presentes na água residuárias da suinocultura no desempenho das lagoas de alta taxa. Para essa avaliação foram determinados o crescimento das microalgas, resposta bioquímica dos microrganismos, remoção de nutrientes, produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), mecanismos envolvidos na remoção de Zn e composição bioquímica da biomassa. Os resultados demonstraram que a aplicação de 40 mg Zn/L favoreceu o crescimento das microalgas enquanto a dose de 70 mg Zn/L causou estresse oxidativo conforme determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e conteúdo de malondialdeído. A remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi comprometida com o aumento na concentração de Zn devido a inibição no processo de nitrificação. Por outro lado, a remoção de P solúvel por meio da assimilação foi potencializada nas condições que propiciaram o crescimento algal. A produção de EPS na forma de carboidratos aumentou no decorrer do monitoramento, o que foi refletido em acréscimos de demanda química de oxigênio. Quanto aos mecanismos envolvidos na remoção de Zn, o crescimento da biomassa apresentou uma contribuição importante, mas não superou a fração relacionada aos carbonatos (28 – 44%). O Zn não interferiu nos teores de proteínas e carboidratos, contudo a adição de 55 mg Zn/L proporcionou as maiores concentrações de lipídeos totais. Os efeitos do Zn na remoção de nutrientes e composição bioquímica da biomassa devem ser ponderados a fim de consorciar a remoção de metais, a remoção de nutrientes e a produção de biomassa com valor agregado.

**Palavras-chave:** biorremediação; efluente agroindustrial; remoção de metal; recuperação de recursos.

### 6.1. Introdução

Uma importante mudança no paradigma do tratamento das águas residuárias está acontecendo, objetivando a recuperação dos recursos presente nesses efluentes com foco em uma bioeconomia circular. Nesse cenário, o cultivo de microalgas em

águas residuárias é uma alternativa atrativa devido à capacidade desses microrganismos de produzir diversos compostos metabólicos de valor comercial como carboidratos, proteínas e lipídeos. Ao mesmo tempo em que há a produção de uma biomassa valorada, ocorre a bioremediação do efluente, como a remoção dos nutrientes e oxidação da matéria orgânica (MOBIN; CHOWDHURY; ALAM, 2019).

A aplicação da biotecnologia das microalgas no tratamento das águas residuárias juntamente com a obtenção de biomassa foi extensamente investigada. Gouveia et al. (2016) utilizaram esgoto doméstico no cultivo das microalgas e reportaram uma remoção acima de 63% de demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (N) e fósforo (P) e uma produtividade de biomassa de até 0,44 g/L.dia contendo 32,7% de proteína. Hena et al. (2015) obtiveram remoções acima de 99% de DQO, N e P após tratamento água residuária da bovinocultura utilizando microalgas. A produtividade de biomassa de 0,27 g/L.dia com um conteúdo lipídico de 23,6% foi reportada pelos autores. Zhu et al. (2013) verificaram uma remoção acima de 65% de DQO, N e P da água residuária da suinocultura e uma produtividade de biomassa entre 0,1 e 0,3 g/L.dia.

No entanto, esse desempenho pode ser comprometido devido a presença de metais nas águas residuárias. O zinco (Zn) é um elemento frequentemente observado nos efluentes (DAVEREY et al., 2014) e pode ser encontrado no esgoto doméstico e na água residuária da suinocultura (ARS) em concentrações superiores a outros metais (HARGREAVES et al., 2018; SUZUKI et al., 2010). Na ARS foram reportados até 94 mg Zn/L com origem na ração fornecida aos suínos (CESTONARO DO AMARAL et al., 2014). As concentrações elevadas de nitrogênio amoniacal (2,8 g/L) e sólidos em suspensão (13,3 g/L) (SZÖGI; VANOTTI, 2016; ZHOU et al., 2012b) foram consideradas as principais limitantes do cultivo de microalgas na ARS. Diante disso, algumas abordagens bem-sucedidas como a conversão do  $N-NH_4^+$  em nitrato foram aplicadas (PRAVEEN et al., 2018). No entanto, a investigação sobre os efeitos da presença do Zn nesse efluente não recebeu a mesma atenção.

O Zn em baixas concentrações é considerado um micronutriente que estimula o crescimento algal, enquanto concentrações elevadas causam toxicidade o que pode comprometer a remoção de N e P da ARS (LI et al., 2020). Dessa forma, é preciso identificar as concentrações de Zn que favorecem e comprometem o crescimento das microalgas e estabelecer como esse elemento pode afetar a remoção de nutrientes e

matéria orgânica considerando aplicações em escala real, como aquelas que ocorrem nas lagoas de alta taxa (LATs).

A remoção do Zn em LAT é outro aspecto que deve ser investigado. Enquanto crescem, as microalgas podem remover esse elemento por bioacumulação no interior das células e a biossorção na parede celular (KUMAR et al., 2015; ZERAATKAR et al., 2016). Além disso, o Zn pode reagir com os diversos compostos inorgânicos presentes na ARS o que contribui para a precipitação. Devido às diferentes formas de remoção de metais, Hargreaves et al. (2018) mencionam que no tratamento de águas residuárias, a abordagem simplista considerando apenas as formas solúveis e particuladas pode restringir a compreensão dos mecanismos atuantes. A especiação química pode ser utilizada para identificar as principais formas dos metais, consistindo em um avanço importante para estabelecer estratégias de operação das LATs de forma a potencializar a remoção desses elementos.

Dessa forma os objetivos desse estudo foram (i) avaliar as interferências do Zn na produção de microalgas cultivada em LATs (ii) identificar os efeitos da presença do Zn na remoção de nutrientes e matéria orgânica da ARS; (iii) avaliar as remoções de Zn nas LATs e (iv) determinar as alterações na composição bioquímica da biomassa.

## **6.2. Materiais e Métodos**

### **6.2.1. Água residuária da suinocultura**

A ARS utilizada nessa pesquisa foi obtida na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEPE) em Suinocultura, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Nesse local é adotado o sistema de confinamento intensivo de ciclo completo de produção. A água residuária gerada é resultado da limpeza e desinfecção das baias, sendo direcionada para a estação de tratamento de efluentes composta das unidades de desarenador, digestor anaeróbio do tipo canadense seguido de lagoa aerada e decantador secundário. A ARS utilizada nesse estudo foi coletada na lagoa aerada e apresentou uma concentração de nitrogênio amoniacal total ( $\text{N-NH}_4^+$ ) de 276,6 mg/L; nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de 14,3mg/L; fósforo solúvel (Ps) igual a 35,8 mg/L; DQO solúvel (DQOs) de 184,4 mg/L, sólidos suspensos voláteis (SSV) igual a 113,3 mg/L e concentração de Zn total de 0,5 mg/ L, quantificados segundo APHA (2017).

### 6.2.2. Lagoas de alta taxa

O experimento foi conduzido utilizando doze LATs idênticas instaladas na área externa do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental, na UFV (20°46'09"S 42°51'29"O). As LATs foram construídas em fibra de vidro com volume útil de 1,00 m<sup>3</sup>, largura de 1,28 m, comprimento igual a 2,86 m, profundidade útil de 0,30 m e área útil de 3,30 m<sup>2</sup>. Possuem pás de aço inoxidável composta de 6 lâminas acionadas por um motor elétrico de 1 hp que por meio de um redutor e um inversor de frequência mantêm a velocidade do efluente entre 0,10 m/s e 0,15 m/s.

Em cada LAT foram adicionados 800L de ARS e solução de cloreto de zinco (300 g/L, marca Neon) necessária para ajustar as concentrações de Zn para valores iguais a 10, 25, 40, 55 e 70 mg Zn/L, sendo estes os valores comumente observados na ARS (CESTONARO DO AMARAL et al., 2014; CHENG et al., 2019). Cada concentração de Zn foi testada em duplicada totalizando 10 LATs. Duas LATs adicionais foram utilizadas como controle, as quais não receberam adição de Zn, operando com a concentração que já estava originalmente presente na ARS (item 6.2.1).

Após a adição de ARS e ajuste na concentração de Zn, cada LAT recebeu 100L de inóculo que consiste em uma biomassa previamente cultivada em LAT alimentada com ARS e operada em batelada durante 15 dias. O inóculo foi caracterizado e apresentou uma concentração de sólidos suspensos totais igual a 205 mg/L e teor de clorofila *a* igual a 1794 µg/L. Em análise no microscópio óptico, apenas *Scenedesmus* sp. foi identificado em concentração igual a  $2,74 \times 10^6$  células/mL.

As pás de cada LAT foram acionadas para dar início à operação das LATs que ocorreu em regime de batelada até o decaimento da concentração de clorofila *a* (chl *a*) (NEDERLANDS NORM, 1981; NUSH, 1980). Essa variável foi monitorada diariamente e utilizada como indicador do crescimento algal, igualmente adotado em pesquisas anteriores (ERMIS et al., 2020; SILVEIRA et al., 2021). A condução do experimento ocorreu entre os meses de julho e agosto de 2021, a variação da temperatura média do ar nesse período variou de 12,2 a 19,8°C, a precipitação acumulada foi igual a 1,8 mm e radiação solar total média foi igual a 1276 kJ/m<sup>2</sup> (INMET, 2021).

### 6.2.3. Monitoramento das lagoas de alta taxa

Os efeitos das diferentes concentrações de Zn no desempenho das LATS foram avaliados considerando a produção de biomassa; determinação de indicadores bioquímicos de resposta à toxicidade do Zn; variação nas concentrações de nutrientes e matéria orgânica; remoção de Zn com a identificação dos mecanismos envolvidos e alterações na composição bioquímica da biomassa.

Além do monitoramento dos teores de chl *a* (utilizado como indicador da produção algal), também foram realizadas a quantificação e identificação das células de microalgas para os dias no qual a concentração de chl *a* alcançou o valor máximo. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz (modelo CX40 RF 100, Olympus Corporation). A identificação fenotípica ocorreu segundo Bicudo and Menezes (2006).

A produção de carotenoides pela espécie *Scenedesmus obliquus* se mostrou sensível à presença de Zn (OMAR, 2002). Por esse motivo foram quantificadas diariamente as concentrações de carotenoides totais conforme descrito em Pancha et al. (2014), com modificações segundo Pozzobon et al. (2021). Os resultados foram analisados em conjunto com os indicadores bioquímicos de resposta a toxicidade do Zn determinados no final do experimento. Nessa avaliação foram quantificadas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, entre as espécies reativas de oxigênio, é aquela que apresenta a maior concentração e maior tempo de vida (DIAZ; PLUMMER, 2018). Para a medição do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as células de microalgas foram colhidas por centrifugação e a reação e leitura das absorbâncias ocorreram conforme descrito em Chokshi et al. (2017). Os resultados foram expressos com base nos teores de SSV (μmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/gSSV).

A peroxidação lipídica foi determinada no final do experimento em termos do conteúdo de malondialdeído (MDA) segundo Chokshi et al. (2017) com absorbâncias (A) lidas em 450, 532 e 600 nm. A concentração de MDA foi calculada conforme a Equação 6.1 (CHOKSHI et al., 2017) e expressa com base nos teores de SSV:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/gSSV}) = \frac{[6,45*(A_{532}-A_{600})]-[0,56*A_{450}]}{\text{SSV}} \quad \text{Equação 6.1}$$

Para avaliar as alterações da presença de Zn na remoção de nutrientes foram quantificadas diariamente as concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  e P solúvel (Ps) (APHA, 2017). Como a presença de metais pode favorecer a assimilação de P (OLIVEIRA et al., 2021), a concentração de P orgânico (Porg) foi quantificada no início e final do experimento (APHA, 2017). Ademais, para auxiliar na avaliação das interferências da adição de Zn nas variações de  $\text{N-NH}_4^+$  e Ps, os coeficientes do modelo cinético de primeira ordem (Equação 6.2) foram determinados, igualmente adotado em estudo prévio (LI et al., 2020):

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad \text{Equação 6.2}$$

Em que: C é a concentração do nutriente (mg/L),  $C_0$  é a concentração inicial do nutriente (mg/L), t é o tempo (d) e k é a taxa de reação ( $\text{d}^{-1}$ ).

A remoção de matéria orgânica foi inferida considerando as concentrações de DQOs monitoradas diariamente (APHA, 2017). Os metais podem contribuir para a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) por bactérias e microalgas (CHEN et al., 2014; NAVEED et al., 2019; OZTURK; ASLIM, 2008), esse comportamento foi sugerido para explicar os acréscimos de DQO durante o tratamento da ARS em LATs (OLIVEIRA et al., 2021). Para identificar a relação entre as concentrações de EPS e DQO, os teores de EPS solúvel na forma de proteínas e carboidratos foram determinados em amostras coletadas diariamente a partir do segundo dia de monitoramento. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  seguido da aplicação dos métodos fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) para a quantificação da EPS na forma de carboidratos e de Bradford (BRADFORD, 1976) para determinação de EPS constituída por proteínas.

Para verificar as diferentes formas químicas do Zn após o tratamento da ARS em LATs, adotou-se a extração química sequencial. Para isso, extratores químicos de força crescente foram utilizados baseado na metodologia descrita por Tessier et al. (1979) e Veeken (1998). O método discrimina os metais associados com carbonatos, ligados a óxidos de ferro e manganês, adsorvido na matéria orgânica e a fração residual que são as formas de Zn não quantificadas nas etapas anteriores. A determinação do Zn nessas diferentes frações foi realizada no início e final do monitoramento utilizando espectrofotômetro de absorção atômica Varian SpectrAA 1000.

As variações nas concentrações de nutrientes (N e P) e Zn foram discutidas considerando as alterações de pH observadas em cada tratamento. Para isso, o pH foi monitorado utilizando sonda multiparâmetro (Hach modelo HQ30D).

A composição bioquímica da biomassa produzida nas LATs com diferentes concentrações de Zn também foi avaliada. Ao final das bateladas as pás das LATs foram desligadas por 12 horas para a colheita da biomassa via sedimentação gravitacional. O sobrenadante foi descartado e a biomassa colhida foi seca em estufa a 70°C e utilizada na quantificação dos teores de proteínas, carboidratos, lipídeos e cinzas conforme descrito em Oliveira et al. (2021).

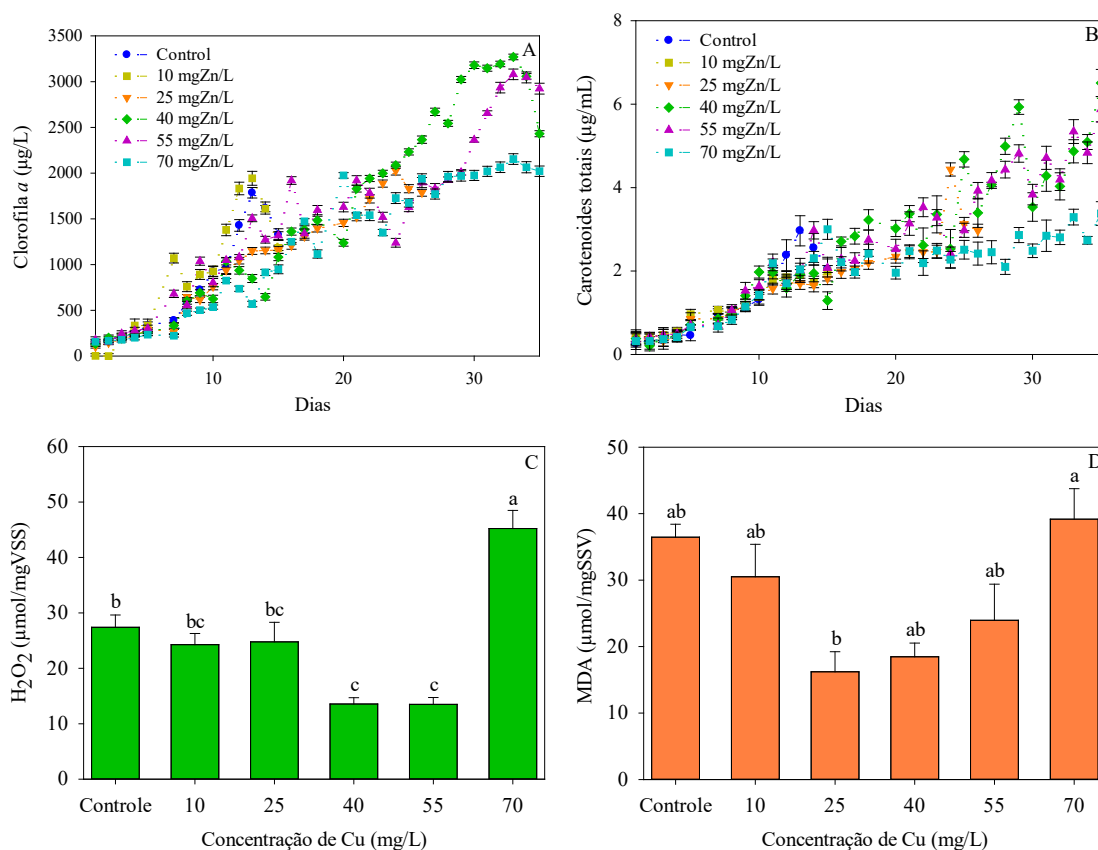
#### **6.2.4. Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As variações nas concentrações de EPS foram correlacionadas com as variações de DQOs utilizando o coeficiente de Pearson. Todas as análises foram realizadas no software Minitab 17.

### **6.3. Resultados e Discussão**

#### **6.3.1. Crescimento algal e indicadores de dano oxidativo**

Cada LAT foi acompanhada conforme o decréscimo nos teores de chl *a*. As LATs controle e com a aplicação de 10 mg Zn/L foram monitoradas por 15 dias, o tratamento com 25 mg Zn/L foi monitorado por 26 dias e as demais LATs foram acompanhadas por 35 dias (Figura 6.1A). Além de afetar o período de crescimento das microalgas, a adição de Zn conferiu um teor máximo de chl *a* significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas LATs com 40 e 55 mg Zn/L (3267 e 3080  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente) se comparado com os demais tratamentos, nos quais a concentração de chl *a* não ultrapassou 2154  $\mu\text{g/L}$ . Um comportamento semelhante foi observado para os carotenoides sendo que a adição de 40 e 55 mg Zn/L conferiram os maiores conteúdos (6,5 e 5,9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em relação aos tratamentos que possivelmente apresentaram uma limitação de Zn, como o controle (3,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e a LAT com 10 mg Zn/L (2,0  $\mu\text{g/mL}$ ) ou excesso desse elemento, como o tratamento com 70 mg Zn/L (3,4  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figura 6.1B).



**Figura 6.1.** Clorofila *a* (A) e carotenoides totais (B) quantificados durante o cultivo de microalgas em diferentes concentrações de Zn. Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C) e MDA (D) quantificados na biomassa que se desenvolveu em lagoas de alta taxa alimentada com água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de Zn (n=2).

Os resultados obtidos indicam que as concentrações de 40 e 55 mg Zn/L podem ter proporcionado um efeito estimulador na produção de chl *a* e carotenoides. Outra informação que reforça esses resultados é o número de células de *Scenedesmus* sp. quantificado nos dias de máxima concentração de chl *a*. Com a aplicação de 40 mg Zn/L foram contabilizados  $4,70 \times 10^6$  células/mL sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle e com a aplicação de 10, 25 e 55 mg Zn/L que apresentaram valores médios iguais a  $2,15$ ;  $1,63$ ;  $3,06$  e  $2,82 \times 10^6$  células/mL, respectivamente. A LAT com 70 mg Zn/L não apresentou células viáveis.

O Zn compõe diversas enzimas importantes para o desenvolvimento das microalgas, como a fosfatase alcalina, superóxido dismutase, RNA polimerase e anidrase carbônica (BAŚCIK-REMISIEWICZ et al., 2009). Portanto, a adequação nas concentrações desse elemento estimula o crescimento algal. Por outro lado, a concentração de 1 mM de Zn (65,38 mg Zn/L) apresentou um efeito severo no crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (HAMED et al., 2017a). Esse metal

também foi capaz de inibir a síntese de pigmentos em *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus quadricauda* o que foi atribuído a dano oxidativo (OMAR, 2002).

Para fornecer mais informações sobre o estresse oxidativo, as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA foram quantificadas ao final do experimento. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 70 mg Zn/L. O controle apresentou a segunda maior concentração, enquanto as aplicações de 40 e 50 mg Zn/L apresentaram um valor cerca de 2x menor se comparado com o controle (Figura 6.1C). As microalgas produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições normais de cultivo, contudo a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células de *Scenedesmus* pode aumentar em condições de estresse resultado do excesso de metais e também em casos de limitação de nutrientes (DANOUCHE et al., 2020; SULOCHANA; ARUMUGAM, 2020). Portanto, pode-se justificar as maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observadas com a aplicação de 70 mg Zn/L onde o Zn estava em excesso e no controle no qual o Zn se tornou, possivelmente, um micronutriente limitante. Choudhary et al. (2007) mencionam que o Zn aumenta o estresse oxidativo ao inativar a produção de antioxidantes o que resulta em desequilíbrio metabólico.

A concentração de MDA foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) com a aplicação de 70 mg Zn/L se comparada com a aplicação de 25 mg Zn/L o qual apresentou o menor conteúdo, enquanto os demais tratamentos apresentaram concentrações estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Os acréscimos no conteúdo de MDA conforme o aumento nas concentrações de metal no meio de cultura de microalgas foram observados anteriormente (BABU et al., 2014; CHOUDHARY et al., 2007; HAMED et al., 2017a, 2017b). No entanto, informações reportadas para a biomassa cultivada em LAT não foram encontradas. Assim, os resultados obtidos na presente pesquisa podem contribuir para preencher essa lacuna, ajudando na compreensão dos processos envolvidos na dinâmica do crescimento das microalgas em um efluente complexo e rico em Zn. Além disso, elucidada os fatores que afetam a composição bioquímica da biomassa (detalhes no item 6.3.4) pois, a peroxidação lipídica pode afetar negativamente os componentes celulares como as proteínas, carboidratos e lipídeos (KARATAS; ÖBEK; KAMIŞLI, 2009).

### **6.3.2. Variação nas concentrações de nutrientes e matéria orgânica**

Ao final do tratamento foi obtida uma remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  que variou entre 88 e 100% (Figura 6.2A). O melhor desempenho foi observado no tratamento com 40 mg Zn/L o que pode estar associado com a assimilação de  $\text{N-NH}_4^+$  uma vez que esse tratamento conferiu as condições mais propícias para o crescimento algal. A formação e volatilização de  $\text{NH}_3$  também podem contribuir para a remoção de  $\text{N-NH}_4^+$ . Contudo, esse processo ocorre em pH acima de 9,2 (EZE et al., 2018), a depender da temperatura, e o pH monitorado nas LATs apresentou valores entre 6,5 e 8,5 o que não favorece essa ocorrência.

A fim de fornecer mais informações sobre os efeitos do Zn na remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  foi determinada a taxa de remoção desse nutriente que apresentou valores que diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) entre todos os tratamentos. No controle e nas LATs com aplicação de 10, 25, 40, 50 e 75 mg Zn/L foram obtidas taxas iguais a 0,152; 0,135; 0,107; 0,085; 0,073 e 0,068  $\text{d}^{-1}$ , respectivamente. É possível observar que as taxas de remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  decresceram conforme o aumento da aplicação de Zn, sendo que o valor observado no controle foi 2,2x maior se comparado com a adição de 70 mg Zn/L.

Esses resultados estão relacionados com a diminuição da conversão de  $\text{N-NH}_4^+$  em  $\text{NO}_3^-$  e podem ser melhores observados ao analisar as variações nas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  durante o cultivo (Figura 6.2B). A concentração de  $\text{NO}_3^-$  obtida no controle alcançou 861,1 mg/L, decrescendo progressivamente para 848,3; 615,8; 597,5; 391,9 e 269,4 mg/L nas LATs com 10, 25, 40, 55 e 70 mg Zn/L, respectivamente. Wu et al. (2018) observaram que as bactérias oxidantes de amônia foram significativamente inibidas pelo Zn. Em 10 mg Zn/L, a remoção de  $\text{N-NH}_4^+$  observada pelos autores foi de 65 - 80% e em 50 mg Zn/L reduziu para 15 - 40%.

A adição de Zn reduziu a concentração inicial de Ps (Figura 6.2C). No controle foi quantificada a concentração de 35,8 mg/L que decresceu continuamente até 19,2 mg/L na LAT com adição de 70 mg Zn/L, efeito atribuído possivelmente à formação do fosfato de zinco, igualmente observado por Li et al. (2020). Esse comportamento é vantajoso devido a possibilidade de recuperação de P, que é um recurso mineral limitado e um importante insumo para o desenvolvimento agrícola e industrial. No entanto, a precipitação durante o cultivo das microalgas reduz a concentração de P prontamente disponível e pode interferir negativamente no crescimento da biomassa.

Dessa forma, o Zn pode apresentar um efeito duplamente desafiador para o crescimento das microalgas: se adaptar aos efeitos oxidativos induzidos por esse

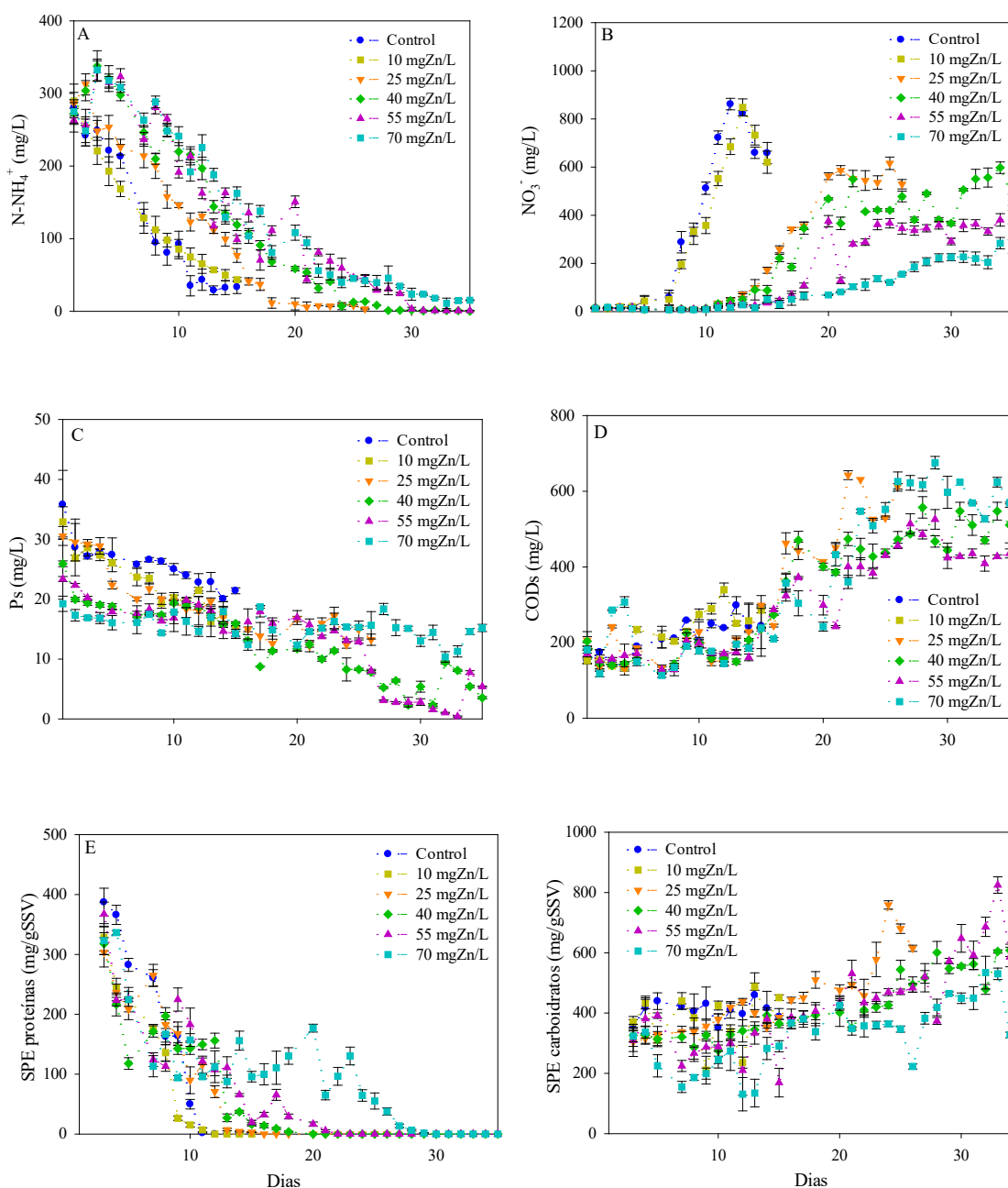
metal e à limitação de Ps. Na presente pesquisa, a limitação de Ps não foi observada devido às elevadas concentrações observadas na ARS. Considerando o N como a soma de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  e o P como a concentração de Ps, a razão N:P foi igual a 8; 9; 10; 11; 12; 15 para as LATs controle e com a adição de 10, 25, 40, 55 e 70 mg Zn/L, respectivamente. A razão N:P igual a 16 foi identificada para o fitoplâncton marinho (REDFIELD, 1934). Contudo, as microalgas apresentam uma flexibilidade e a razão N:P para o cultivo em águas residuárias pode variar de 5 a 30 (CHOI; LEE, 2015).

Ao final do tratamento, a remoção mais expressiva de Ps ocorreu nas condições mais adequadas para o crescimento algal. O desempenho significativamente maior ( $p < 0,05$ ) foi de 86,3% de remoção obtido com a aplicação de 40 mg Zn/L seguido de 76,9% observado com a adição de 55 mg Zn/L. Para as demais LATs, as remoções variaram entre 56% e 20%, sendo o menor valor observado na LAT com adição de 70 mg Zn/L. Um comportamento semelhante foi observado ao determinar a taxa de remoção de Ps, que apresentou valores iguais a 0,029; 0,046; 0,037; 0,042; 0,039  $\text{d}^{-1}$  para as LATs controle e com a adição de 10, 25, 40 e 55 mg Zn/L, respectivamente. Para a LAT com 70 mg Zn/L não foi obtido ajuste no modelo cinético de primeira ordem ( $R^2 = 0,228$ ) pois nesse tratamento as concentrações de Ps foram aproximadamente constantes.

As condições mais favoráveis para o crescimento das microalgas promoveram as maiores remoções de Ps, sugerindo que a assimilação foi um importante mecanismo de remoção. Por outro lado, a precipitação na forma de fosfato de cálcio, sendo este o precipitado de P que pode ser observado durante o tratamento de efluentes com microalgas (LARSDOTTER et al., 2010) não parece ter contribuído para as reduções de Ps no decorrer do monitoramento pois a formação desse composto ocorre geralmente em pH maior que 9,0 (PRATT et al., 2012) e o pH observado nas LATs permaneceu entre 6,5 e 8,5.

Para fornecer mais informações a esse respeito, as concentrações de Porg foram quantificadas. Em relação à concentração de P total, o Porg correspondeu no início do tratamento às porcentagens entre 35,5 e 41,2% e no final do experimento os valores foram de 46,9; 79,5; 78,4; 75,6; 62,4 e 45,6% observados no controle e LATs com a aplicação de 10, 25, 40, 55 e 70 mg Zn/L, respectivamente. Esses resultados evidenciam que a adequação nas concentrações de Zn favorece a assimilação de P, o que pode ser atribuído ao fato do Zn compor a enzima fosfatase alcalina que atua na absorção desse nutriente (GEDDIE; HALL, 2019; MALASARN et al., 2013). Foi

reportado que 76 a 96% do P foi removido por sedimentação e apenas 3 a 23% foi assimilado pela biomassa durante o cultivo das microalgas na ARS (ABOU-SHANAB et al., 2013). Por outro lado, quando o cultivo aconteceu em ARS sintética com diferentes concentrações de Zn, a contribuição da assimilação de P pelas microalgas variou entre 61 e 96% (LI et al., 2020).



**Figura 6.2.** Concentração de nitrogênio amoniacal (A), nitrato (B), fósforo dissolvido (C), demanda química de oxigênio dissolvida (D) e substâncias poliméricas extracelulares na forma de proteínas (E) e carboidratos (F) quantificadas durante o cultivo de microalgas em diferentes concentrações de Zn (n=2).

As concentrações de DQOs monitoradas durante o cultivo de microalgas na ARS aumentaram em todas as LATs (Figura 6.2D), e os acréscimos foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nas doses acima de 25 mg Zn/L. Nesses tratamentos as concentrações de DQOs no início do cultivo foram próximas de 190 mg/L e os acréscimos alcançaram até 624 mg/L, enquanto nos demais (controle e 10 mg Zn/L) os valores permaneceram inferiores a 300 mg/L. Resultados semelhantes foram observados anteriormente durante o cultivo de microalgas em ARS com diferentes concentrações de Cu e Zn no qual os acréscimos de DQOs foram atribuídos à produção de EPS (OLIVEIRA et al., 2021).

Na presente pesquisa essa hipótese foi testada. A partir da determinação dos principais constituintes da EPS (na forma de proteínas e carboidratos) verificou-se que as variações de EPS na forma de proteínas decresceram com o tempo em todos os tratamentos (Figura 6.2E). Portanto, esse constituinte não contribuiu para os acréscimos de DQOs. De forma oposta, os teores de EPS constituídos de carboidratos aumentaram nos tratamentos com aplicação acima de 25 mg Zn/L e passaram de concentrações iniciais entre 315 e 418 mg/gSSV até valores cerca de 2x maiores no final do monitoramento (Figura 6.2F). As variações de DQOs e EPS na forma de carboidratos apresentaram o coeficiente de Pearson igual a 0,78; 0,84; 0,70 e 0,64 para as LATs com 25, 40, 55 e 70 mgZn/L, respectivamente. Segundo Schober and Schwarte (2018), valores entre 0,70 e 0,89 são classificados como correlação forte entre as variáveis. Portanto, é possível confirmar que a produção de EPS na forma de carboidratos está relacionada com as variações de DQOs.

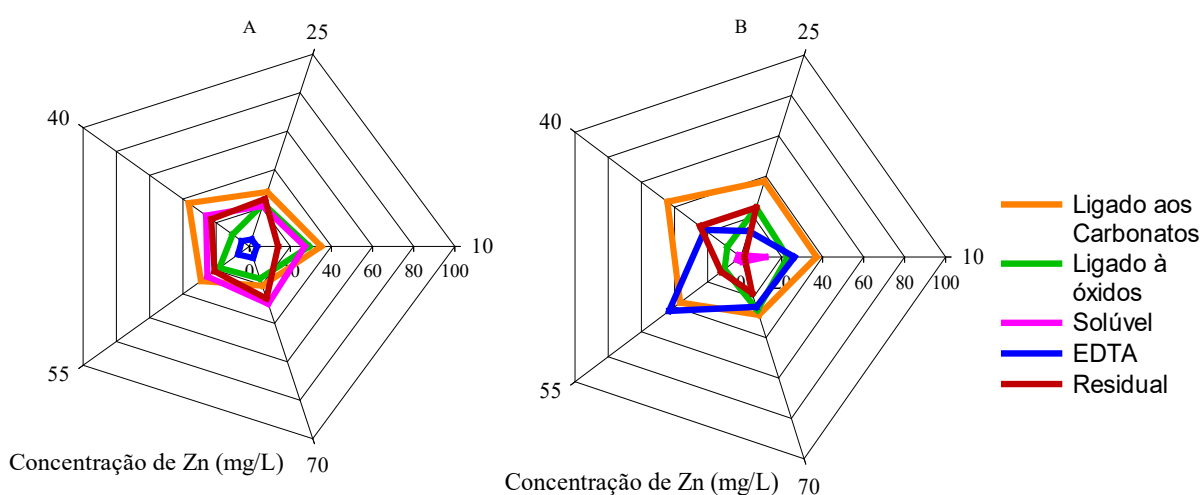
A presença de metal é reconhecida por induzir a produção de EPS pelo consórcio alga-batéria e essa estratégia ameniza os efeitos negativos da toxicidade (Yu et al., 2021). Em volta da microalga *Chlorella* sp. cultivada em 125 mg Zn/L foi verificada a presença de uma mucilagem. A secreção desse polímero foi sugerida como estratégia para reduzir a toxicidade do Zn (FERRARO et al., 2018). Os resultados obtidos na presente pesquisa complementam essas informações ao demonstrarem que a produção de EPS durante o tratamento da ARS em LAT pode resultar em um acréscimo de DQOs. É importante destacar que o EPS possui valor comercial devido às diferentes aplicações, dentre as quais é utilizado na engenharia mecânica como redutores de arrasto e no saneamento devido à sua capacidade de remoção de poluentes (XIAO; ZHENG, 2016). Portanto, o ajuste das concentrações

de Zn pode ser utilizado como estratégia para potencializar a produção deste bioproduto.

### 6.3.3. Remoção de zinco

No final do experimento uma remoção expressiva de Zn solúvel foi observada com porcentagens entre 78 e 99%. As LATs com 25 e 40 mg Zn/L conferiram as maiores reduções (99%), sendo significativamente maior ( $p > 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. Heidarpour et al. (2019) obtiveram remoções acima de 90% após 20 dias de cultivo da *Chlorella beijerinck* em meio com 10 e 100 mg Zn/L. Ledda et al. (2015) observaram que 63 a 91% do Zn presente na ARS foi removido após o cultivo de *Chlorella* sp.

Diversos fatores foram atribuídos para explicar a remoção de metais durante o tratamento da ARS em LATs, como a complexação, precipitação e assimilação (OLIVEIRA et al., 2021), mas a contribuição de cada rota não foi reportada. A fim de estabelecer o mecanismo responsável pela remoção de Zn nas LATs, foram determinadas as concentrações desse elemento que estavam associadas com os carbonatos, ligados aos óxidos de Fe e Mn, à compostos orgânicos e a fração residual (Figura 6.3).



**Figura 6.3.** Balanço de massa com distribuição percentual das diferentes formas de Zn quantificadas no início (A) e final (B) da operação das lagoas de alta taxa alimentadas com água residuárias da suinocultura.

No início do experimento, o Zn estava em menor porcentagem relacionado com os compostos orgânicos (3,7 a 6,7%) o que era esperado devido à baixa

concentração de compostos orgânicos observado na ARS no início do experimento (SSV = 113,3 mg/L). De modo oposto, a maior proporção estava ligada aos carbonatos (19,1 a 36,5%) e na forma solúvel (21,0 a 29,9%), ou seja, as formas trocáveis e móveis do Zn foram dominantes. O Zn é reconhecido pela elevada mobilidade e solubilidade devido às propriedades de baixa constante de formação, taxa de reação lenta e dinâmica de coordenação flexível (HARGREAVES et al., 2018; KREŽEL; MARET, 2016). Foi reportado que mesmo após a compostagem do esterco de suínos, 95% da concentração de Zn estava biodisponível, sendo esta a forma que oferece maior risco ambiental e potencial toxicidade (LU et al., 2014).

No final do experimento as porcentagens atribuídas aos carbonatos ainda eram elevadas (28,7 a 44,2%), a fração ligada aos óxidos de Fe e Mn permaneceu praticamente inalterada, enquanto a fração solúvel decresceu e alcançou a porcentagem mínima de 0,8% na LAT com 25 mg Z/L. Esse comportamento foi acompanhado de um aumento na porcentagem relacionada com os compostos orgânicos a qual alcançou até 43,3% na LAT com 55 mg Zn/L. Esses resultados podem estar associados com o crescimento algal. A parede celular das microalgas apresenta grupos funcionais como  $-\text{COOH}$ ;  $-\text{OH}$ ;  $-\text{PO}_3$ ;  $-\text{NH}_2$  e  $-\text{SH}$  que conferem uma carga negativa à superfície celular e proporcionam locais de ligação para cátions metálicos (KUMAR et al., 2015). Além disso, as microalgas podem armazenar os metais de forma intracelular. O acúmulo intracelular foi principal mecanismo de remoção de metais pesados pela microalga *Chlorella minutissima* UTEX2341 (YANG et al., 2015). Essa característica das microalgas é particularmente atrativa para a remoção de Zn devido a capacidade de imobilizar esse metal.

#### **6.3.4. Composição bioquímica da biomassa**

A adição de Zn alterou a composição bioquímica da biomassa cultivada nas LATs conferindo um acréscimo nos teores de cinzas conforme o aumento da aplicação de Zn, com porcentagens que variaram entre 34,8% no controle até 54,9% na LAT com 70 mg Zn/L. Assim, a avaliação dos teores proteínas, carboidratos e lipídeos foram determinados considerando a biomassa seca livre de cinzas (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1.** Composição bioquímica da biomassa após o cultivo em diferentes concentrações de Zn (n=2).

Tratamento (mg Zn/L)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídeos (%)		
			Neutros	Membrana	Totais
Controle	49,0 a	43,0 a	0,5	7,5	8,0 c
10	51,3 a	35,7 a	1,5	11,5	13,0 b
25	53,5 a	34,0 a	2,7	9,8	12,5 b
40	45,1 a	43,5 a	2	9,4	11,4 b
55	41,2 a	40,8 a	5,8	12,4	18,2 a
70	48,6 a	39,9 a	4,5	7,0	11,5 b

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

Em todos os tratamentos os teores de proteínas superaram os demais constituintes e apresentaram concentrações estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) entre as diferentes aplicações de Zn. Esses resultados condizem com a assimilação de N sugerida para explicar as remoções expressivas de  $N-NH_4^+$  (Figura 6.2A). A concentração de carboidratos foi o segundo metabólito em maior concentração observada em todas as biomassas, com teores estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. De acordo com Omar (2002), o Zn demonstrou ser essencial para a atuação de enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos e proteínas.

Ao relacionar esses resultados com as variações de EPS é possível sugerir que as microalgas priorizaram a produção intracelular de proteínas uma vez que as concentrações na forma de EPS solúvel decresceram no decorrer do experimento. Li et al. (2020) observaram um acréscimo nos teores de proteínas na biomassa de *Coelastrella* sp. conforme o aumento da concentração de Zn no meio de cultura. Os autores atribuíram esses resultados à síntese de proteínas antioxidantes.

Moheimani et al. (2018) utilizaram ARS no cultivo de microalgas e obtiveram biomassa com 39,1% de proteínas e 35,3% de carboidratos, semelhante ao observado na presente pesquisa. Os autores sugerem que a biomassa pode ser utilizada como alimento para os suínos pois apresentou os aminoácidos essenciais. Outra possível rota de aproveitamento para essa biomassa é a conversão em biocombustíveis. Ferreira et al. (2018) utilizaram a biomassa de microalgas, com predominância de *S. obliquus*, cultivada em diferentes águas residuárias para a obtenção de biohidrogênio. Os autores verificaram que a biomassa cultivada na ARS apresentou maior rendimento em biohidrogênio o que foi atribuído à presença de 36,2% de açúcares totais.

Quanto aos lipídeos totais, foi observado a menor concentração no controle enquanto um valor cerca de 2,3x maior ( $p < 0,05$ ) foi obtido com a aplicação de 55 mg

Zn/L, representando um teor igual a 18,2%. Contudo, os lipídeos neutros que são de interesse para a produção de biocombustível estavam em uma concentração de apenas 5,8% enquanto os lipídeos de membrana correspondiam a maior fração (12,4%), sendo este comportamento observado em todas as biomassas (os lipídeos de membrana superaram os neutros). Um teor de lipídeos semelhante ao observado no presente estudo foi obtido por Montero et al. (2018) para a biomassa de microalgas cultivada na ARS digerida anaerobiamente. Os autores verificaram que a biomassa com a maior concentração de lipídeos apresentou um perfil de éster metílico de ácido graxo inadequado para a produção de biodiesel. Por outro lado, na constituição dessa biomassa foram observados ácidos  $\gamma$ -linolênico, palmítico e linoléico, que podem ser utilizados na aquicultura.

No presente estudo não foi observada relação entre os indicadores de estresse oxidativo ( $H_2O_2$  e MDA) e os teores proteínas, carboidratos e lipídeos. Os microrganismos que se desenvolvem nas LATs são diversificados (bactérias, fungos, protozoários e microalgas) e podem apresentar respostas bioquímicas diferentes na presença do Zn. Além disso, esse estudo foi realizado em sistema complexo (LAT), composto por muitas variáveis que podem interagir entre si, o que aumenta a dificuldade de correlacionar os dados. No entanto, ressalta-se que essa é a realidade do cultivo de microalgas em águas residuárias e, portanto, melhor representa a dinâmica das aplicações reais.

#### **6.4. Conclusão**

A presença de Zn na ARS apresentou múltiplos efeitos durante o tratamento em LAT. Esse metal afetou o crescimento algal sendo que as concentrações de 40 e 55 mg Zn/L conferiram as condições mais propícias para a produção de biomassa. Quanto maior foi a concentração de Zn, menor foi a taxa de remoção de  $N-NH_4^+$ , enquanto a taxa de remoção de Ps apresentou maior valor nas condições que favoreceram o crescimento das microalgas. A presença de Zn estimulou a produção de EPS na forma de carboidratos o que refletiu em acréscimos na DQOs. As microalgas atuaram na remoção de Zn e podem apresentar uma contribuição importante na imobilização desse metal. Quanto à constituição de biomassa, a adição de Zn não afetou a produção de proteínas e carboidratos e a LAT com a adição de 55 mg Zn/L proporcionou as maiores concentrações de lipídeos totais.

A presente pesquisa apresentou uma contribuição importante no entendimento dos efeitos do Zn no desempenho das LATs. Esses resultados são inovadores pois demonstraram que as LATs apresentam potencial para a remoção de Zn da ARS. No entanto, os efeitos desse metal na remoção de nutrientes e constituição da biomassa devem ser ponderados a fim de consorciar a remoção de metais, a remoção de nutrientes e a produção de biomassa com valor agregado.

## Referencias

ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of Environmental Management*, v. 115, p. 257–264, 30 jan. 2013.

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23. ed. 1504p.

BABU, M. Y. et al. Cadmium and copper toxicity in three marine macroalgae: Evaluation of the biochemical responses and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 16, p. 9604–9616, 27 maio 2014.

BAŚCIK-REMISIEWICZ, A. et al. The Effect of Zn and Mn on the Toxicity of Cd to the Green Microalga *Desmodesmus armatus* Cultured at Ambient and Elevated (2%) CO<sub>2</sub> Concentrations | Request PDF. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 18, n. 5, p. 775–780, 2009.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Genines of continental water seaweed in Brazil - key for identification and descriptions [in Portuguese].

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

CESTONARO DO AMARAL, A. et al. Zinc and copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, v. 141, p. 132–137, 1 ago. 2014a.

CESTONARO DO AMARAL, A. et al. Zinc and copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, v. 141, p. 132–137, 1 ago. 2014b.

CHEN, H. et al. Influence of copper nanoparticles on the physical-chemical properties of activated sludge. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, p. e92871, 24 mar. 2014.

- CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.
- CHOI, H. J.; LEE, S. M. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, n. 4, p. 761–766, 20 mar. 2015.
- CHOKSHI, K. et al. Nitrogen starvation-induced cellular crosstalk of ROS-scavenging antioxidants and phytohormone enhanced the biofuel potential of green microalga *Acutodesmus dimorphus*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHOUDHARY, M. et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, n. 2, p. 204–209, 1 fev. 2007.
- DANOUCHE, M. et al. Heavy metals phycoremediation using tolerant green microalgae: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems for the management of oxidative stress. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 104460, 1 out. 2020.
- DAVEREY, A. et al. Effect of zinc on anammox activity and performance of simultaneous partial nitrification, anammox and denitrification (SNAD) process. *Bioresource Technology*, v. 165, n. C, p. 105–110, 1 ago. 2014.
- DIAZ, J. M.; PLUMMER, S. REVIEW Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions. *J. Plankton Res*, v. 40, n. 6, p. 655–666, 2018.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- ERMIS, H. et al. Effect of iron and magnesium addition on population dynamics and high value product of microalgae grown in anaerobic liquid digestate. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2020.
- EZE, V. C. et al. Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, v. 32, p. 131–141, 1 jun. 2018.
- FERRARO, G. et al. Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low cost magnetic particles. *Algal Research*, v. 33, p. 266–276, 1 jul. 2018.
- FERREIRA, A. et al. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, v. 164, p. 32–38, 1 jul. 2018.

- GEDDIE, A. W.; HALL, S. G. An introduction to copper and zinc pollution in macroalgae: for use in remediation and nutritional applications. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 1, p. 691–708, 1 fev. 2019.
- GOUVEIA, L. et al. Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. Scale-up considerations. *Algal Research*, v. 16, p. 167–176, 1 jun. 2016.
- HAMED, S. M. et al. Zinc-induced differential oxidative stress and antioxidant responses in *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus acuminatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 140, p. 256–263, 1 jun. 2017a.
- HAMED, S. M. et al. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 144, p. 19–25, 1 out. 2017b.
- HARGREAVES, A. J. et al. Fate and removal of metals in municipal wastewater treatment: a review *Environmental Technology Reviews* Taylor and Francis Ltd., , 1 jan. 2018.
- HEIDARPOUR, A. et al. Bio-removal of Zn from contaminated water by using green algae isolates. *Environmental Technology and Innovation*, v. 16, p. 100464, 1 nov. 2019.
- HENA, S.; FATIMAH, S.; TABASSUM, S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, v. 10, p. 1–14, 1 jun. 2015.
- INMET, N. I. OF M. INMET Meteorological Database. [s.l: s.n.]. Disponível em: <Banco de Dados Meteorológicos do%0AINMET>.
- KARATAS, F.; ÖBEK, E.; KAMIŞLI, F. Antioxidant capacity of *Lemna gibba* L. exposed to wastewater treatment. *Ecological Engineering*, v. 35, n. 8, p. 1225–1230, 1 ago. 2009.
- KREŽEL, A.; MARET, W. The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 611, p. 3–19, 1 dez. 2016.
- KUMAR, K. S. et al. Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 113, p. 329–352, 2015.
- LARSDOTTER, K. et al. Biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae. *Environmental Technology*, v. 28, p. 953–960, 2010.

- LEDDA, C. et al. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Research*, v. 12, p. 68–73, 1 nov. 2015.
- LI, X. et al. Nutrient removal from swine wastewater with growing microalgae at various zinc concentrations. *Algal Research*, v. 46, p. 101804, 1 mar. 2020.
- LU, D. et al. Speciation of Cu and Zn during composting of pig manure amended with rock phosphate. *Waste Management*, v. 34, n. 8, p. 1529–1536, 1 ago. 2014.
- MALASARN, D. et al. Zinc deficiency impacts CO<sub>2</sub> Assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 15, p. 10672–10683, 12 abr. 2013.
- MOBIN, S. M. A.; CHOWDHURY, H.; ALAM, F. Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review. *Energy Procedia. Anais...Elsevier Ltd*, 1 fev. 2019.
- MOHEIMANI, N. R. et al. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent. *Algal Research*, v. 35, p. 362–369, 1 nov. 2018.
- MONTERO, E. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorococcum* sp. under non-controlled conditions using a digestate from pig manure within a biorefinery. *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 5, p. 2847–2857, 1 out. 2018.
- NAVEED, S. et al. Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 49, n. 19, p. 1769–1802, 2 out. 2019.
- NEDERLANDS NORM. NEN 6520. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-a Content. *Nederlands Normalisatie-Instituut, Delft, The Netherlands.*, 1981.
- NUSH, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 4, p. 14–36, 1980.
- 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.
- OMAR, H. H. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 50, n. 2, p. 95–100, 1 set. 2002.
- OZTURK, S.; ASLIM, B. Relationship between chromium(VI) resistance and extracellular polymeric substances (EPS) concentration by some cyanobacterial

isolates. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, n. 6, p. 478–480, 8 set. 2008.

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, 1 mar. 2014.

POZZOBON, V. et al. Nitrate and nitrite as mixed source of nitrogen for *Chlorella vulgaris*: Growth, nitrogen uptake and pigment contents. *Bioresource Technology*, v. 330, p. 124995, 1 jun. 2021.

PRATT, C. et al. Biologically and chemically mediated adsorption and precipitation of phosphorus from wastewater. *Current Opinion in Biotechnology/Elsevier Current Trends*, , 1 dez. 2012.

PRAVEEN, P. et al. Enhancing microalgae cultivation in anaerobic digestate through nitrification. *Chemical Engineering Journal*, v. 354, n. August, p. 905–912, 2018.

REDFIELD, A. . On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In: LIVERPOOL UNIVERSITY PRESS (Ed.). . James Johnstone Memorial Volume. Liverpool: [s.n.]. p. 176–192.

SCHÖBER, P.; SCHWARTE, L. A. Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, v. 126, n. 5, p. 1763–1768, 1 maio 2018.

SILVEIRA, C. F. et al. Valorization of swine wastewater in a circular economy approach: Effects of hydraulic retention time on microalgae cultivation. *Science of The Total Environment*, v. 789, p. 147861, 1 out. 2021.

SULOCHANA, S. B.; ARUMUGAM, M. Targeted Metabolomic and Biochemical Changes During Nitrogen Stress Mediated Lipid Accumulation in *Scenedesmus quadricauda* CASA CC202. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 1223, 19 out. 2020.

SUZUKI, K. et al. Distribution of phosphorus, copper and zinc in activated sludge treatment process of swine wastewater. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 23, p. 9399–9404, 1 dez. 2010.

SZÖGI, A. A.; VANOTTI, M. B. Decline of phosphorus, copper, and zinc in anaerobic swine lagoon columns receiving pretreated influent. *Scientia Agricola*, v. 73, n. 5, p. 417–423, 1 set. 2016.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances/Elsevier Inc.*, , 15 nov. 2016.

YANG, J. S. et al. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 537–544, 1 jan. 2015.

ZERAATKAR, A. K. et al. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, v. 181, p. 817–831, 2016.

ZHOU, W. et al. Mass cultivation of microalgae on animal wastewater: A sequential two-stage cultivation process for energy crop and omega-3-rich animal feed production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, n. 2, p. 348–363, 14 set. 2012.

ZHU, L. et al. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water Research*, v. 47, n. 13, p. 4294–4302, 2013.

## 7. ARTIGO IV. Carbonização hidrotérmica de microalga cultivada em água residuária: uma abordagem sobre os efeitos das cinzas

**Resumo:** As interferências das cinzas nos processos de conversão da biomassa de microalgas em biocombustível é um tema pouco explorado o que limita a compreensão dos seus efeitos. Para uma avaliação dessas interferências, quatro biomassas cultivadas na água residuária da suinocultura foram lavadas com solução ácida para redução nos teores de cinzas. As biomassas com e sem esse pré-tratamento foram submetidas ao processo de carbonização hidrotérmica (CHT) para a produção de hidrochar. Os resultados demonstraram que a solução ácida removeu entre 73 e 99% de P, K, Ca, Mg, Zn, Mn e Na, indicando que esses são os principais constituintes das cinzas presentes na biomassa. Por outro lado, o pré-tratamento promoveu um acréscimo nos teores de N e S. Após a CHT, os hidrochars derivados das biomassas pré-tratadas para remoção de cinzas (H-DBs) apresentaram um poder calorífico 1.8x superior em relação aos hidrochars sem o pré-tratamento (H-Bs). Além disso, para H-DBs a recuperação de energia alcançou até 73,5%, enquanto em H-Bs variou entre 49,3 - 62,0%. No entanto, a avaliação das razões atômica O/C e H/C demonstraram que na constituição das cinzas podem estar presentes elementos que atuam na hidrólise da biomassa ou como catalisadores das reações envolvidas na CHT. Diante disso, os efeitos benéficos ou indesejáveis da presença das cinzas podem competir durante a CHT e determinar os rendimentos e as propriedades dos hidrochars. Foi possível sugerir a utilização de H-Bs na recuperação e áreas degradadas. Por outro lado, devido ao baixo teor de cinzas e maior poder calorífico, os H-DBs podem ser utilizados em aplicações energéticas seja como matéria prima para produção de eletrodos para supercapacitores ou como material combustível.

**Palavras-chaves:** hidrochar; recuperação de energia; efluente agroindustrial.

### 7.1. Introdução

As microalgas são reconhecidas pela sua capacidade de atuar no tratamento de efluentes, além disso, a biomassa produzida pode ser convertida em biocombustível (BHATIA et al., 2021). Contudo, esforços significativos são necessários para otimizar essa biotecnologia e estabelecer um processo eficiente de

produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Entre os desafios tem-se a composição da biomassa cultivada em efluentes, pois, além dos produtos com valor agregado como proteínas, lipídeos e carboidratos, essa biomassa também é caracterizada pelo alto conteúdo de cinzas (15 - 62%) e elevado teor de umidade (92 - 99%) observado mesmo após a etapa de colheita (ASSIS et al., 2017; FERREIRA et al., 2020; URRUTIA; YAÑEZ-MANSILLA; JEISON, 2019). Com essas características é necessário processar grandes quantidades de material inerte e de água para a obtenção dos bioprodutos de microalgas o que pode refletir em um aumento nos custos de produção do biocombustível.

Visando contornar o obstáculo referente a umidade, processos térmicos que utilizam biomassa úmida foram investigados em estudos anteriores como a gaseificação, liquefação e carbonização hidrotérmicas. Entre essas, a aplicação da carbonização hidrotérmica (CHT) se mostrou promissora pois uma matéria-prima com teor de umidade entre 75 e 90% é adequada para o processo (KUMAR; ANKARAM, 2019), o que reduz a necessidade de desidratação da biomassa algal. Além disso, o menor requisito de pressão e temperatura ( $> 2$  MPa e  $180 - 220$  °C) quando comparada como a liquefação (5 - 20 MPa,  $280 - 370$  °C) e gaseificação (22 - 36 MPa e  $400 - 500$  °C) e os tempos reacionais geralmente inferior a 90 min potencializam a utilização da CHT, devido ao menor consumo energético (HUPFAUF et al., 2016; MATHIMANI; MALLICK, 2019).

Diante dessas vantagens, a CHT foi utilizada em diversas pesquisas o que possibilitou a conversão da biomassa algal em hidrochar, um material rico em carbono que pode ser utilizado como combustível sólido, fertilizante do solo e como material adsorvente (CASTRO et al., 2021; CHU et al., 2020; HEILMANN et al., 2010; KHOO et al., 2020; LIU et al., 2019; MARIN-BATISTA et al., 2019; TSARPALI; KUHN; PHILIPPIDIS, 2022; ZHANG; ZHAO; WANG, 2020). Outro produto da CHT é a fração aquosa constituída de compostos solubilizados e que pode ser utilizada como meio de cultivo das microalgas (TARHAN et al., 2021), permitindo uma abordagem em termos de biorrefinaria e de economia circular.

Quanto ao desafio referente as cinzas, atualmente este constituinte é considerado indesejável por reduzir o rendimento do processo de conversão da biomassa em biocombustível, comprometer a qualidade dos produtos obtidos, oferecer risco de danificar os equipamentos e contribuir para a produção de escória e incrustação (HESS et al., 2019; ROBIN et al., 2018). Diante disso, alguns estudos

avaliaram a inserção de um tratamento para reduzir o conteúdo de cinzas. Por exemplo, Liu et al. (2019) pré-trataram a biomassa de microalgas cultivada em esgoto doméstico com solução ácida (HCl 4 M) o que permitiu uma redução no conteúdo de cinzas de 44,7% para 14,5%. Os hidrochars produzido com essas biomassas apresentaram poder calorífico superior (PCS) de 7,1 - 8,9 MJ/Kg e 20,9 – 26,6 MJ/Kg respectivamente (LIU et al., 2019). Marin-Batista et al. (2019) produziram hidrochar a partir da biomassa de microalgas cultivada na água residuária da suinocultura e obtiveram material com PCS igual 18,6 MJ/Kg. Esse valor aumentou 1,37x após o hidrochar ser lavado com solução ácida (HCl 1 M) para redução das cinzas e outros subprodutos (MARIN-BATISTA et al., 2019).

Apesar da redução do conteúdo de cinzas ter aumentado a energia contida no hidrochar, essa abordagem deve ser melhor investigada pois outros processos de conversão das microalgas em biocombustível, como a liquefação e a gaseificação hidrotérmica, foram potencializados por constituintes que integram as cinzas devido a ação catalisadora (CHEN et al., 2017; HOGNON et al., 2014). Além disso, foi observado que a redução de cinzas nem sempre é acompanhada de uma diminuição na energia necessária para a decomposição térmica da biomassa (CARPIO et al., 2019). As cinzas são inerentes na biomassa e a identificação das interferências na CHT é necessária para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias e equipamentos destinados a produção de biocombustível a partir de microalgas. No entanto, a composição das cinzas é um tema pouco explorado, o que limita uma maior compreensão dos seus efeitos.

Diante disso, os objetivos desse estudo foram analisar a composição das cinzas presentes na biomassa de microalgas cultivada em efluente, aplicar solução ácida para redução no conteúdo de cinzas como pré-tratamento da CHT e avaliar as interferências da inclusão dessa etapa no rendimento e nas características dos produtos da CHT. Para essa avaliação quatro biomassas de microalgas com composição distintas foram avaliadas. Essas biomassas e os hidrochars derivados foram caracterizados quanto a estrutura e perfis químicos. A fase aquosa também foi caracterizada a fim de identificar os efeitos das cinzas na solubilização de nutrientes. Com esse estudo foi possível identificar algumas implicações que as cinzas podem apresentar durante a CHT e estabelecer uma nova perspectiva quanto aos efeitos desse constituinte, destacando as principais inovações deste trabalho.

## 7.2. Materiais e Métodos

### 7.2.1. Biomassas

Foi utilizada biomassa produzida em lagoa de alta taxa (LAT) em escala piloto (volume útil de 1m<sup>3</sup>) instaladas no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Quatro LATs foram operadas em batelada com água residuária da suinocultura (ARS) proveniente da Unidade de Pesquisa Extensão e Ensino em Suinocultura da UFV. A ARS apresentou demanda química de oxigênio igual 436.8 mg/L; nitrogênio total Kjeldahl de 595.9 mg/L; fósforo total de 25.8 mg/L, cobre total igual a 0, 1 mg/L e zinco total de 0,5 mgZn/L. Cada uma das quatro LATs recebeu ARS com a mesma constituição em termos de macronutrientes. Contudo, em cada LAT foram ajustadas diferentes concentrações de Cu e Zn, pois estudo preliminar demonstrou que a ARS com ajuste nas concentrações desses elementos favorece a produtividade (APÊNDICE B).

Diante disso, as três LATs foram operadas com a ARS com adequação de Cu e Zn nas concentrações de 1,0 mg Cu/L, 10 mg Zn/L e 1,75 mg Cu/L + 15,0 mg Zn/L. A quarta LAT foi utilizada como controle, ou seja, não foi corrigido os teores de Cu e Zn, mas contou apenas com as concentrações observadas inicialmente na ARS (0, 1 mg Cu/L e 0,5 mg Zn/L). Todas as quatro LATs foram operadas em batelada por um período de tempo que variou de 20 a 25 dias conforme o decréscimo de clorofila *a* utilizado como parâmetro de monitoramento. No final do cultivo as biomassas foram colhidas por meio do ajuste de pH obtido com a aplicação de NaOH, congeladas e liofilizadas.

Foram atribuídas as denominações biomassa 1 (B1) referente ao tratamento controle, biomassa 2 (B2) cultivada na ARS com concentração de Cu ajustada para 1,0 mg Cu/L, biomassa 3 (B3) cultivada com 10 mg Zn/L e a biomassa 4 (B4) que cresceu na ARS com 1,75 mg Cu/L + 15,0 mg Zn/L. Todas as biomassas apresentaram uma composição mista que incluiu microalgas do gênero *Chlorella* sp., bactérias e outros microrganismos, além de matéria orgânica e inorgânica.

### 7.2.2. Remoção de cinzas

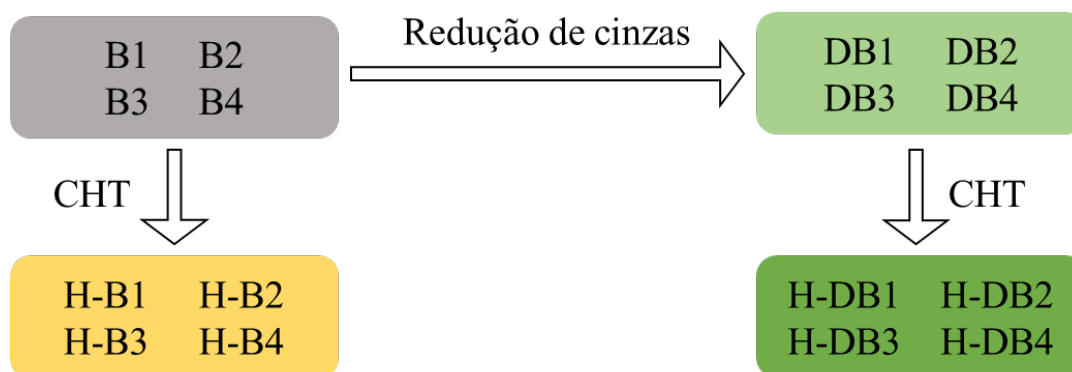
Como pré-tratamento da CHT foi adotada a lavagem da biomassa com solução de HCl a 0,25M. Esse método foi escolhido, pois em estudo preliminar demonstrou o melhor desempenho na remoção de cinzas ao mesmo tempo em que manteve os maiores teores de carbono na biomassa (APÊNDICE C). Para a remoção de cinzas, foi utilizada a biomassa com partículas entre 1 - 1,4 mm (obtidas com a utilização de moinho tipo Wiley), a qual foi transferida para frascos contendo a solução de HCl numa proporção de 1:80 (m/v) (BANDARA; GAMAGE; GUNARATHNE, 2020). Os frascos foram inseridos em incubadora com agitação orbital a 120 rpm (ASTON et al., 2018) por 1 hora. Após essa etapa, as biomassas foram lavadas com água destilada até o sobrenadante apresentar pH próximo de 7,0 (LIU et al., 2019). Em seguida as biomassas foram secas em estufa a 40°C até peso constante. As biomassas antes e após o pré-tratamento para a redução no conteúdo de cinzas (deashing biomass - DB) foram caracterizadas e utilizadas nos testes de CHT.

### 7.2.3. Carbonização hidrotérmica

A CHT foi conduzida em reator compacto Parr 5500 Series com capacidade de 300 mL e com controlador de temperatura e velocidade de rotação. As biomassas com e sem o pré-tratamento para remoção de cinzas foram transferidas para o reator e juntamente com água destilada em uma proporção de 1:15 igualmente adotado por (LIU et al., 2019). O reator foi purgado com nitrogênio gasoso durante 5 min e mantido sob agitação de 500 rpm na temperatura de 170°C por 10 minutos. Essas as condições foram identificadas anteriormente como as mais adequadas para a obtenção de hidrochar a partir da biomassa algal cultivada em efluente (CASTRO et al., 2021) e são semelhante as condições adotadas na torrefação úmida da biomassa de *Chlorella vulgaris* (160°C por 10 minutos) (GAN et al., 2020, 2021). Decorrido o tempo de reação iniciou-se o resfriamento do reator utilizando um sistema interno que permite recircular água gelada. Em seguida, a amostra foi retirada do reator e centrifugada para a separação das fases sólida e aquosa. A fase sólida (hidrochar) foi seca em estufa a 40°C até peso constante enquanto a fase aquosa foi mantida a temperatura de 4°C até a caracterização.

Na Figura 7.1 é apresentado o fluxograma da metodologia adotada, as biomassas B são referentes as biomassas sem a redução de cinzas, ou seja, são as biomassas brutas cultivadas na ARS com diferentes concentrações de Cu e Zn

conforme descrito na seção 2.1. As biomassas DB1, DB2, DB3 e DB4 referem-se ao material obtido após a lavagem com solução ácida das respectivas biomassas B1, B2, B3 e B4. Os hidrochars obtidos a partir de cada biomassa foi referenciado com a inclusão do prefixo H (H-B e H-DB). Todos os testes de CHT foram realizados em triplicata.



**Figura 7.1:** Fluxograma da metodologia adotada.

#### 7.2.4. Caracterização das biomassas, hidrochars e fase aquosa

Para inferir sobre os principais elementos relacionados com as cinzas foram quantificados nas biomassas e hidrochars as concentrações de macro e micronutrientes conforme procedimentos descritos em EMBRAPA (2009). O fósforo (P) foi quantificado por colorimetria; potássio (K) por fotometria de chama; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) por absorção atômica; enxofre (S) por turbidimetria; os metais manganês (Mn), cobre (Cu), cádmio (Cd), ferro (Fe) e zinco (Zn) foram determinados em amostras submetidas a uma etapa de digestão seguida de quantificação por absorção atômica (Optima 8300). Também foram determinadas as concentrações de nitrogênio (N) pelo método Kjeldahl. Além disso, para avaliar os efeitos da etapa de remoção de cinzas na composição bioquímica das biomassas, foram quantificadas, antes e após o pré-tratamento, as concentrações de carboidratos, proteínas e lipídeos totais conforme descrito em Oliveira et al. (2021).

O desempenho da CHT foi avaliado considerando a caracterização das biomassas e hidrochars com a quantificação dos teores de cinzas determinados por meio da diferença de massas antes e após a combustão da amostra em forno mufla a 550°C por 1h. O poder calorífico superior (PCS) também foi utilizado nessa avaliação

sendo obtido experimentalmente utilizando o método da bomba calorimétrica adiabática. O PCS foi utilizado para verificar a recuperação de energia considerando a recuperação de sólidos, este por sua vez, foi determinado de acordo com a Equação 7.1:

$$\text{Recuperação de sólidos (\%)} = \frac{m_{\text{char}}}{m_{\text{biomassa}}} * 100 \quad \text{Equação 7.1}$$

Em que:  $m_{\text{char}}$  é a massa de hidrochar produzida após a CHT e  $m_{\text{biomassa}}$  é a quantidade de biomassa bruta submetida à CHT, em base seca.

O percentual de recuperação de energia foi determinado conforme a Equação 7.2:

$$\text{Recuperação de energia (\%)} = \text{Recuperação de sólidos} * \frac{\text{PCS}_{\text{char}}}{\text{PCS}_{\text{biomassa}}} \quad \text{Equação 7.2}$$

Em que:  $Re$  é a porcentagem de recuperação de energia e  $\text{PCS}_{\text{char}}$  e  $\text{PCS}_{\text{biomassa}}$  representam o poder calorífico superior do hidrochar e da biomassa respectivamente.

Outros parâmetros adotados para avaliar o desempenho da CHT incluíram a análise elementar das biomassas e hidrochars com a determinação do conteúdo de carbono (C), hidrogênio (H) e N utilizando analisador elementar Perkin Elmer, PE-2400, série II. O teor de enxofre (S) foi obtido por turbidimetria, com leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 440 nm. O teor de O foi determinado a partir da diferença entre 100 e o somatório dos teores de cinzas, C, H, N e S. Os resultados obtidos para o C, H e O foram analisados por meio do diagrama de Van Krevelen que apresenta as variações das razões atômicas O/C e H/C.

Biomassas e hidrochars foram caracterizados ainda por meio da difração de raio-X (DRX) para a caracterização estrutural e identificação dos principais compostos formados com a aplicação da CHT. Para tal, foi utilizado o sistema de difração D8 Discover (Bruker), Radiação Cu- $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) e com variação angular de  $10\text{--}80^\circ$  ( $2\theta$ ). Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software X'pert Highscore. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (equipamento JEOL modelo JSM-6010LA) foi utilizada para avaliar a estrutura superficial. Para identificar os perfis

químicos foi utilizada a espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) por meio do equipamento FTIR Alpha.

A caracterização da fase aquosa também foi realizada a fim de identificar transferência de nutrientes das biomassas para essa fração e os efeitos do pré-tratamento para a remoção de cinzas nesse processo. Para tanto, foram quantificados na fase aquosa os teores de P e NKT segundo APHA (2017) e carbono orgânico total determinado no equipamento Shimadzu TOC 5000.

### **7.2.5. Análises estatísticas**

Os resultados que caracterizaram os hidrochars referentes à recuperação de sólidos, recuperação de energia, PCS, cinzas, macro e micronutrientes bem como os parâmetros que caracterizaram a fase aquosa foram submetidos a análise de variância e ao teste de significância ao nível de 5% utilizando o software Minitab 17.

## **7.3. Resultados e Discussão**

### **7.3.1. Caracterização inicial das biomassas**

A Tabela 7.1 apresenta a caracterização das biomassas. A B1 apresentou a menor concentração de cinzas e o maior conteúdo de lipídeos se comparada com as demais biomassas, o que sugere que as condições de cultivo (com ajuste nos teores de Cu e Zn) comprometeram a produção de lipídeos. A biomassa B2 apresentou o maior teor de proteínas, e também foi a biomassa com as maiores concentrações de P, Ca e Cr o que pode ser atribuído a precipitação que possivelmente ocorreu durante o cultivo e a colheita. A B4 apresentou o maior conteúdo de N, possivelmente resultado da assimilação desse nutriente pela biomassa durante o cultivo na ARS (OLIVEIRA et al., 2021).

Após a aplicação do pré-tratamento foi observado um decréscimo nos teores de cinzas que passaram de 17,4 – 41,3% para 8,2 – 11,9%. Essa redução foi acompanhada de um aumento no conteúdo de carboidratos (exceto para DB3) e proteínas em até 2x o que é consistente com trabalhos anteriores (AUDU et al., 2021; CARPIO et al., 2019).

**Tabela 7.1:** Caracterização bioquímica das biomassas utilizadas nos testes de carbonização hidrotérmica.

<b>Parâmetro</b>	<b>B 1</b>	<b>B 2</b>	<b>B 3</b>	<b>B 4</b>	<b>DB 1</b>	<b>DB 2</b>	<b>DB 3</b>	<b>DB 4</b>
Carboidratos (%)	20	13,7	23,5	25,3	24,5	25,7	21,8	50,2
Proteínas (%)	35	38	25,9	18,9	48	45,8	52,6	20,7
Lipídeos totais (%)	18,7	3,4	2,8	9,8	11,9	10,4	11,5	8,2
Cinzas (%)	17,4	39,9	41,3	37,8	10,6	10,8	11	10,9
PCS (MJ/kg)	14,6	13,3	13,2	14,4	22,4	21,8	22,0	22,3
C (%)	31,4	31,0	29,2	32,5	45,0	47,2	45,9	50,1
H (%)	5,21	4,9	5,12	5,33	7,5	7,6	7,3	7,5
O (%)	18,7	19,3	19,6	18,33	29,2	26,6	27,9	22,7
N (g/kg)	37,0	40,7	44,5	50,6	74,4	74,4	68,2	68,2
P (g/kg)	43,9	55,0	46,5	46,3	4,2	3,6	3,7	4,3
K (g/kg)	17,0	15,9	13,2	18,1	0,3	0,3	0,3	0,3
Ca (g/kg)	66,6	101,3	80,3	75,1	6,0	9,0	9,0	6,0
Mg (g/kg)	9,9	7,1	8,1	5,1	0,3	0,3	0,3	0,3
S (g/kg)	5,0	6,6	4,8	4,9	6,5	6,6	6,7	6,6
Cu (g/kg)	0,3	1,6	2,3	3,1	0,3	2,0	2,1	0,3
Fe (g/kg)	4,3	3,4	3,2	2,4	4,9	4,8	4,8	4,8
Zn (g/kg)	4,2	1,1	21,9	30,2	0,4	0,3	0,3	0,4
Mn (g/kg)	0,4	0,3	0,3	0,2	0,05	0,08	0,08	0,05
Na (mg/kg)	1,2	2,7	1,2	1,6	0,02	0,09	0,1	0,01
Ni (mg/kg)	5,0	4,9	6,1	4,1	8,0	7,4	7,6	8,1
Pb (mg/kg)	36,2	7,3	18,6	27,7	2,9	7,9	8,2	2,7
Cr (mg/kg)	15,9	18,6	15,6	10,9	23,0	20,4	21,2	23,2

A redução de cinzas proporcionou ainda um acréscimo em todas as biomassas no conteúdo de C em cerca de 1,5x, o H aumentou 1,4x e o O em até 1,6x. O acréscimo de C e H possivelmente contribuiu para as variações nos valores de PCS, que passaram de 13,2 – 14,6 MJ/kg antes da remoção de cinzas para 22,1 - 22,4 MJ/kg após a aplicação do pré-tratamento. Resultado semelhante foi reportado em estudos anteriores, sendo que um redução no conteúdo de cinzas na biomassa de microalgas de 27,1 para 13,5% resultou em um aumento no PCS de 24,4 para 26,2 MJ/kg (AUDU et al., 2021). Em outra biomassa algal o decréscimo no conteúdo de cinzas 44,7 para 14,4% foi acompanhado de um aumento de PCS de 9,5 para 24,2 MJ/kg ((LIU et al., 2019)

As concentrações de N e S também apresentaram acréscimos após a etapa de redução de cinzas. Na DB1, o N alcançou o dobro do teor observado inicialmente em B1 enquanto a DB3 conferiu o maior acréscimo de S, passando de 4,8 para 6,7 g/kg. A produção de hidrochar para posterior utilização como combustível sólido a partir de biomassa rica em N e S não é atrativo devido ao risco de emissão de gases de efeito estufa (NOx e SOx) que podem ser produzidos durante a combustão.

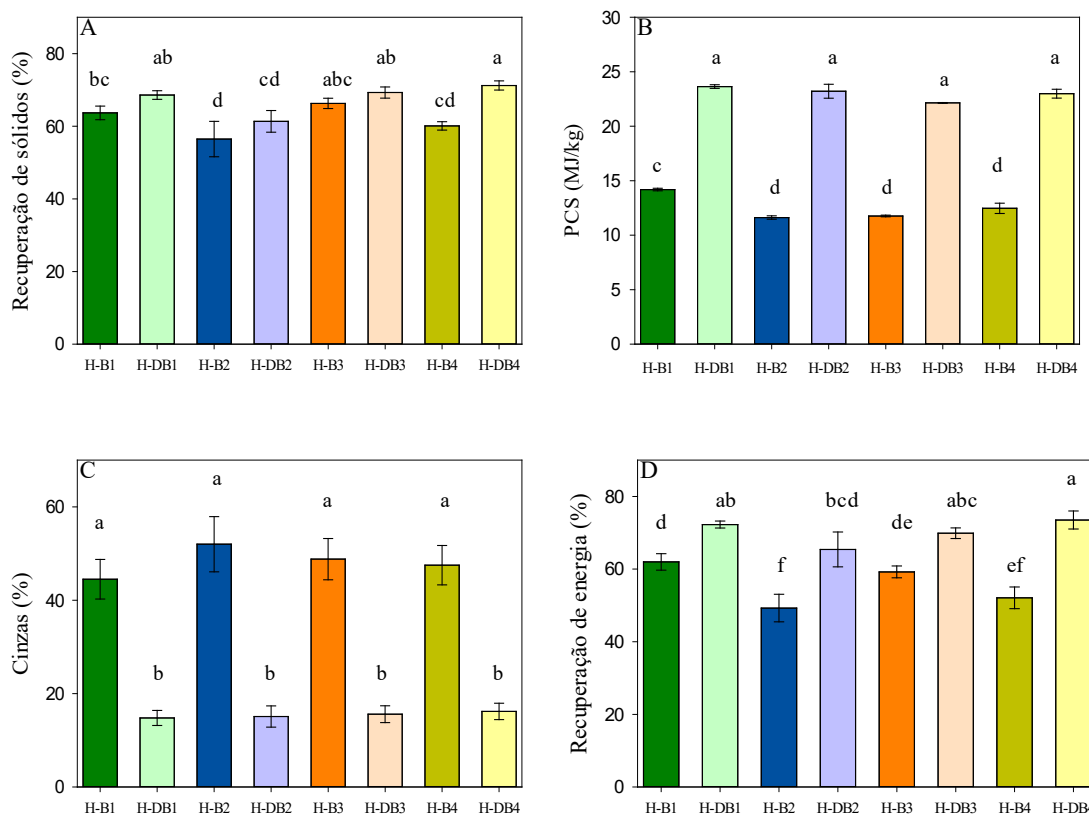
Quanto aos demais elementos analisados, foi possível observar que a redução de cinzas promoveu um acréscimo nos teores de Cr e Ni, por outro lado foi observado um decréscimo considerável nos teores de P, K, Ca, Mg, Zn, Mn e Na com remoções que variaram entre 73 e 99%. Uma redução adicional foi observada na biomassa DB1 relacionada com o Pb (92%); na DB3 referente ao Cu (9%) e Pb (56%) e na DB4 relacionada com Cu (90%) e Pb (90%). Esses resultados demonstram que dentre os elementos caracterizados, o P, K, Ca, Mg, Zn, Mn e Na são os principais constituintes das cinzas presentes na biomassa cultivada na ARS.

### **7.3.2. Carbonização hidrotérmica**

#### *7.3.2.1 Caracterização energética*

As biomassas com e sem prévia redução de cinzas foram utilizadas no processo de CHT afim de produzir hidrochars. É possível observar que o pré-tratamento proporcionou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na recuperação de sólidos apenas no hidrochar H-DB4 se comparado com H-B4, os quais apresentaram valores iguais a 71,2% e 60,1%, respectivamente (Figura 7.2A). Essa diferença entre os hidrochars H-B4 e H-DB4 pode ser explicado por dois fatores. Primeiramente, (i) a B4 apresentou a maior concentração de K sendo que os sais associados com esse elemento são reconhecidos pela solubilidade o que provavelmente contribuiu para o deslocamento para a fração aquosa reduzindo assim a massa de sólidos em H-B4.

Além disso, (ii) a DB4 apresentou o maior conteúdo de carboidratos (50,2%), possivelmente necessitando de condições mais agressivas de CHT para que as reações ocorressem. A temperatura e tempo de reação insuficientes para ativar a energia de quebra das ligações dos principais componentes das microalgas (lipídios, proteínas e carboidratos) pode resultar em maior rendimento em termos de sólidos (FENG et al., 2018). Esse comportamento também pode ser observado ao analisar as variações nas razões atômicas O/C e H/C (Figura 7.3) e os espectros de FT-IR (Figura 7.6) sendo que os resultados observados para DB4 foram semelhantes ao H-DB4.



**Figura 7.2:** Recuperação de sólidos (A), poder calorífico superior (B), teor de cinzas (%) e recuperação de energia (%) determinados para hidrochars produzidos a partir de biomassa de microalgas (n=3, barras verticais representam o desvio padrão). Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

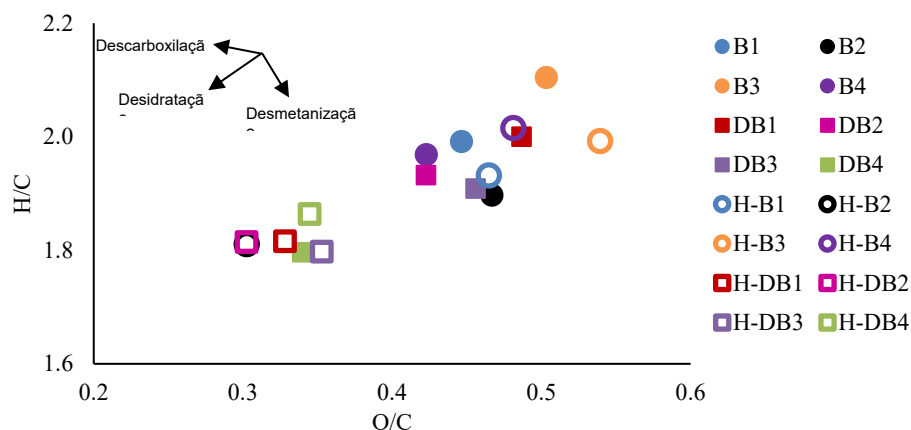
Para as demais biomassas (DB1, DB2 e DB3) foi observado que a remoção de cinzas não afetou a recuperação de sólidos após a CHT, ou seja, os H-Bs foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) aos respectivos H-DBs. No entanto, no caso de uma contribuição expressiva das cinzas na composição do hidrochar, a utilização apenas do indicador recuperação de sólidos pode ser enganosa para avaliar o desempenho do processo (SMITH; SINGH; ROSS, 2016). Este parece ser o caso de todos os materiais H-Bs, nos quais uma fração entre 44,5 – 52,0% do conteúdo de sólidos eram cinzas, sendo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) se comparados com H-DBs (14,8 – 16,2%) (Figura 7.2C).

Ao comparar o PCS (Figura 7.2B), observa-se que a redução de cinzas seguida da CHT promoveu um acréscimo de cerca de 1,8x em relação aos hidrochars derivados da biomassa sem o pré-tratamento, refletindo o efeito negativo da presença de cinzas. Os materiais H-DBs apresentaram PCS entre 21,1 e 23,6 MJ/kg. Comparando esses valores com os diferentes tipos de carvão, observa-se uma

proximidade com a lignita (28,3 MJ/kg) (FOWLER; HU, 2004). Além disso, a energia contida nos hidrochars com prévia redução de cinzas foi superior aos valores reportados na literatura a partir da biomassa algal constituída de uma mistura de diferentes espécies de algas marinhas (13,0 – 15,6 MJ/kg) (TAG et al., 2016) e derivado da biomassa algal cultivada em efluente agroindustrial (~17 MJ/kg) (CASTRO et al., 2021).

Esse resultado promissor também foi verificado para a recuperação de energia (Figura 7.2D), sendo que todos os hidrochars produzidos com a biomassa com prévia redução de cinzas apresentaram porcentagens significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) se comparado com aqueles oriundos das biomassas sem o pré-tratamento. O menor rendimento energético foi de 49,3% quantificado no H-B2, o que pode estar relacionado ao elevado conteúdo de cinzas (52,0%). Por outro lado, a maior porcentagem foi de 73,5%, verificada no H-DB4. Esse desempenho supera os valores reportados por Hupfauf et al. (2016) de 16 a 60% obtidos após ampla revisão da CHT de microalgas.

Para compreensão das reações envolvidas na CHT e inferir sobre os efeitos das cinzas foi utilizado o diagrama de Van Krevelen (Figura 7.3). Uma redução nas proporções de O/C e H/C é desejável, pois confere aos hidrochars maior potencial energético. Os resultados demonstram que a redução de cinzas contribuiu para as reações envolvidas na CHT e conferiu menor razão O/C e H/C se comparados os hidrochars H-DBs com as biomassas DBs. As reduções variaram entre 22,6 – 32,6% na razão O/C e de 5,8 - 9,2% na proporção H/C, exceto para DB4 e H-DB4, que apresentaram valores semelhantes. Para os demais hidrochars H-DBs é possível sugerir que a desidratação foi o processo dominante seguido da descarboxilação. Apesar das reduções, a razão H/C ainda foi alta em todos os hidrochars (1,8 - 2,0), quando comparada com os carvões ( $H/C < 1,0$ ), enquanto a razão O/C pode ser igualada a lignita.



**Figura 7.3:** Diagrama de van Krevelen e as razões atômicas H/C e O/C das biomassas e hidrochars. Os valores referentes aos hidrochars correspondem a média de três repetições (n=3).

A perda de O é mais evidente do que a de H durante a CHT de microalgas (ZHANG; ZHAO; WANG, 2020) e a necessidade de reduzir os valores da relação H/C no hidrochar derivado de biomassa algal foi observado anteriormente sendo que os valores reportados variaram de 1,48 a 2,06 (CASTRO et al., 2021; KHOO et al., 2020). Diante desse comportamento, estratégias devem ser adotadas para melhorar o desempenho da CHT de microalgas com foco na remoção de H o qual pode ser obtido por meio da desidrogenação. Essa adequação é importante, pois reduz a liberação de fumaça e vapor d'água e pode minimizar as perdas de energia durante o processo de combustão (CHEN et al., 2018). Considerando a aplicação no solo, também é necessária uma redução na razão H/C para valores inferiores 0,6 a fim de minimizar a reatividade e proporcionar o sequestro de C (SCHIMMELPFENNIG; GLASER, 2012).

Para os hidrochars oriundos das biomassas brutas, verificou-se um acréscimo na razão O/C e H/C em H-B4 e na proporção O/C para H-B1 e H-B3, se comparados com as biomassas de origem. Para esses tratamentos houve um aumento de O/C e H/C em direção a desmetanização (remoção de grupos metila), o que pode conferir maior hidrofobicidade aos hidrochars (SCHIMMELPFENNIG; GLASER, 2012). Resultado semelhante foi observado durante a CHT de lodo de esgoto, em que houve acréscimo no conteúdo de O atribuído à hidrólise dos polissacarídeos (WANG et al., 2019). Provavelmente a hidrólise foi favorecida nessas biomassas pois elementos que são ácido de Lewis (Fe e Zn) podem acelerar essas reações (HAMID; TEH; LIM, 2015). Essa ocorrência torna-se evidente na biomassa B4 a qual apresentou a maior

concentração de Zn o que pode ter favorecido os acréscimos em O/C e H/C ao comparar H-B4 e B4.

Dentre os hidrochars oriundos das biomassas sem pré-tratamento, uma exceção foi observada para H-B2 que, ao invés de aumento, verificou-se uma redução na proporção O/C e H/C em 28,5 e 6,1%, respectivamente. Essa ocorrência proporcionou ao H-B2 a menor razão O/C e H/C (0,3 e 1,8, respectivamente) entre todos os hidrochars obtidos nesse estudo, o que sugere um potencial para a aplicação como combustível. Esse resultado apresenta uma divergência em relação a caracterização do H-B2 apresentada na Figura 2, sendo este hidrochar aquele com maior concentração de cinzas (52,0%) e com a menor recuperação de energia (49,3%), indicando um material de baixa qualidade para aplicações energéticas.

Uma possível explicação está associada com as implicações que as cinzas podem apresentar durante a CHT. A primeira (i) refere-se ao fato das cinzas não contribuírem para o PCS, o que é refletido na recuperação de energia. A segunda (ii) é decorrente da capacidade das cinzas promoverem a hidrólise. Smith et al. (2016) verificaram que a CHT de lodo de esgoto apresentou solubilização de C proporcional às cinzas e Liu et al. (2019) sugeriram um aumento na hidrólise da biomassa de microalgas com maior teor de cinzas durante a CHT. Ácidos de Lewis podem favorecer essas reações (HAMID; TEH; LIM, 2015). Contudo, a relação entre as cinzas e hidrólise da biomassa não está clara, necessitando de pesquisas adicionais. A outra ocorrência (iii) está relacionada à possibilidade das cinzas apresentarem constituintes que atuam como catalizadores durante a CHT. A presença de Ca apresentou uma função catalisadora durante a liquefação hidrotérmica de cascas de madeira (FENG et al., 2014). Um comportamento semelhante pode ser sugerido para o hidrochar H-B2 uma vez que a biomassa B2 apresentou a maior concentração de Ca.

Todas essas implicações podem ocorrer simultaneamente o que torna complexa as vias reacionais associadas com as cinzas, sendo que a competição durante a CHT pode determinar os rendimentos e as propriedades resultantes nos hidrochars.

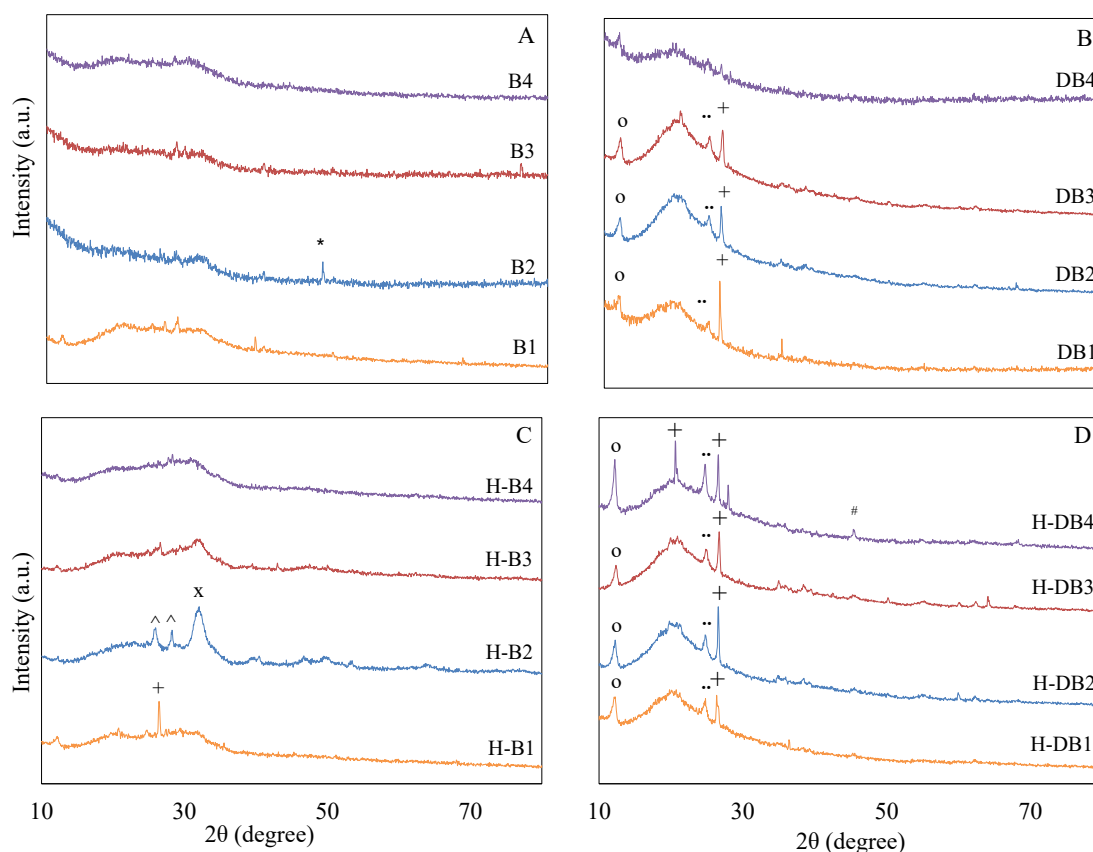
Diante dos resultados obtidos é possível sugerir que na composição das cinzas podem estar presentes elementos indesejáveis e outros que são de interesse na CHT. Nessa avaliação devem ser considerados os elementos que podem atuar na hidrólise e como catalisadores. A esse respeito é necessária uma investigação da atuação especificamente do Ca. No caso de uma contribuição positiva desse elemento

durante a CHT é possível potencializar a presença na biomassa com a substituição dos coagulantes convencionais por hidróxido de cálcio na etapa de colheita. Além disso, a escolha dos constituintes presentes nas cinzas deve considerar os riscos associados com a incrustação. É desejável que as cinzas apresentem alta temperatura de fusão para reduzir esse risco. Metais alcalinos, K e Na podem reduzir a temperatura de fusão das cinzas, enquanto o Mg e Ca tem efeito oposto (MARIN-BATISTA et al., 2020).

#### 7.3.2.2 DRX, MEV e FT-IR

Quanto as alterações estruturais observadas nas biomassas e hidrochars (Figura 7.4) foi possível observar que inicialmente as biomassas brutas apresentaram difratogramas semelhantes indicando uma característica amorfa com estrutura atômica sem ordem a longa distância. Apenas a biomassa B2 apresentou um pico em  $48,6^\circ$  referente ao  $\text{CaCO}_3$  o que condiz com a maior concentração de Ca observada nessa biomassa (Tabela 7.1). A CHT sem o pré-tratamento para a remoção de cinzas não contribuiu para a formação de estruturas semicristalinas em H-B3 e H-B4. Em H-B1 foi observada a presença de  $\text{SiO}_2$  e em H-B2 foram identificados  $\text{Fe}(\text{PO}_3)_3$  e compostos associados com o Mg, assim como Liu et al. (2019), que verificaram a presença de  $\text{Mg}_{0,064}\text{Ca}_{0,936}\text{CO}_3$  no hidrochar derivado de biomassa alga cultivada em esgoto.

A aplicação da solução ácida na etapa de remoção de cinzas conferiu padrões de difração na DB4 semelhantes aos observados em B4, enquanto nas demais foram observados  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{Na}$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  e  $\text{SiO}_2$ . Esses mesmos compostos permaneceram após a CHT, sendo que o hidrochar H-DB4 apresentou as maiores mudanças estruturais com picos adicionais próximos de  $20,6^\circ$  e  $45,5^\circ$  correspondentes ao  $\text{SiO}_2$  e  $\text{NaCl}$ , respectivamente. A presença de  $\text{SiO}_2$  após a CHT da biomassa de microalgas foi reportada anteriormente (CASTRO et al., 2021; LIU et al., 2019). A sílica ( $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) integra a parede celular das microalgas e, portanto, é esperado na composição da biomassa e está sujeita as reações da CHT, além disso, o  $\text{SiO}_2$  é insolúvel em HCl (LIU et al., 2019) o que pode justificar os acréscimos nas biomassas e hidrochars após a remoção de cinzas.



**Figura 7.4:** Difratogramas de raios-X determinados nas biomassas brutas (A), após redução de cinzas (B) e os respectivos hidrochars H-B (C) e H-DB (D). \*  $\text{CaCO}_3$ , °  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{Na}$ , °°  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ , +  $\text{SiO}_2$ , ^  $\text{Fe}(\text{PO}_3)_3$ , x relacionado ao Mg, # NaCl.

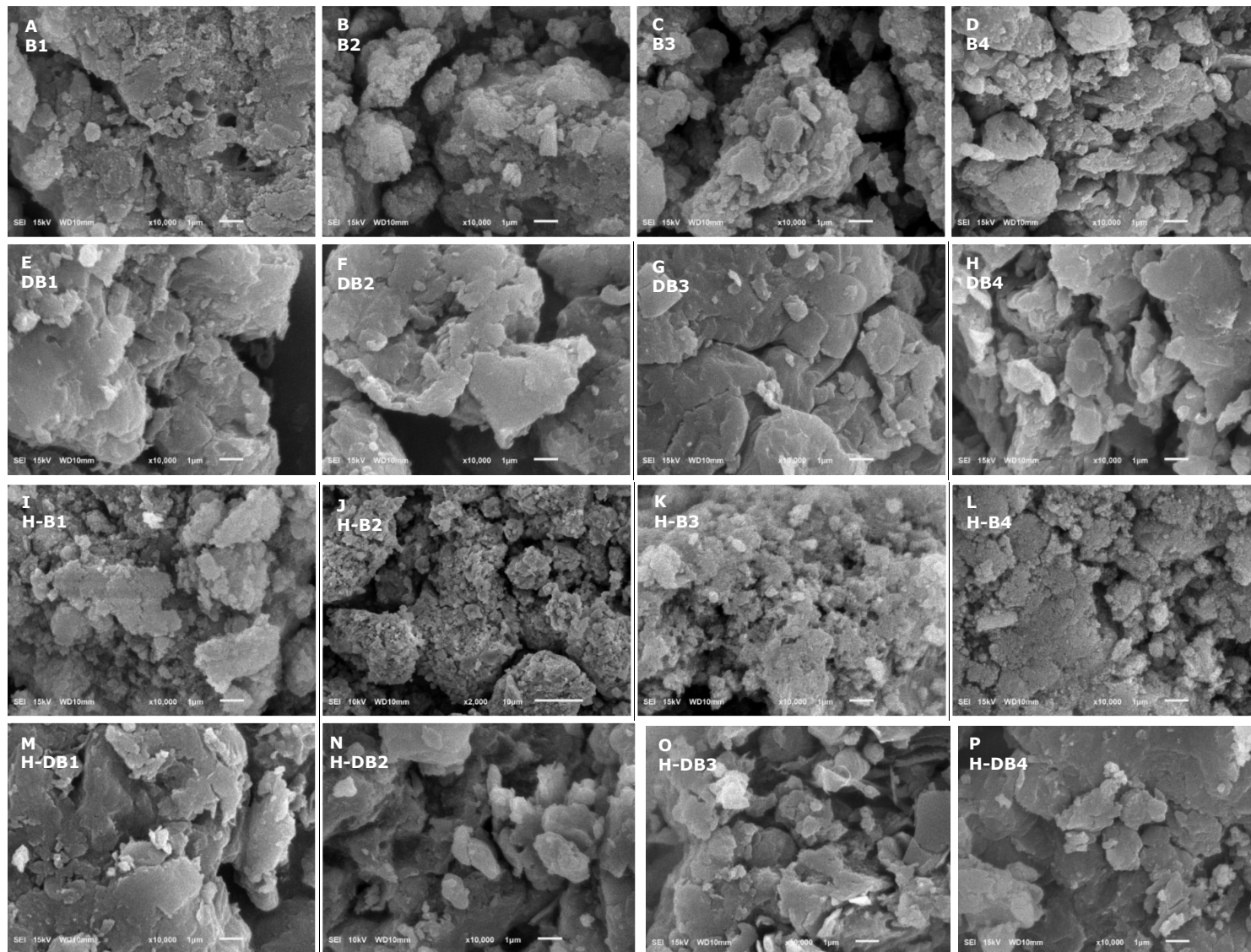
O MEV foi utilizado para comparar a morfologia das biomassas e hidrochars. As biomassas sem a prévia remoção de cinzas (Figura 7.5A-D) apresentaram uma superfície rugosa o qual permaneceu após a CHT. Para os hidrochars obtidos a partir dessas biomassas (Figura 7.5I-L), verificou-se ainda estruturas fragmentadas, devido à presença de carbono amorfo (LIU et al., 2019). Além disso, a hidrólise durante a CHT pode contribuir para a redução do tamanho das partículas presentes na biomassa. Já a rugosidade pode ser decorrente da presença das cinzas em maior concentração pois, ao analisar as imagens referentes as biomassas DB e os hidrochars H-DB (Figuras 7.5E-H e 7.5M-P) verifica-se uma superfície mais lisa com minimização da superfície tortuosa. Apesar desse resultado, a morfologia dos hidrochars H-DB foi predominantemente irregular. Zhang et al. (2020) mencionam que o alto teor de nitrogênio na biomassa de microalgas pode proporcionar essa característica.

A análise FT-IR (Figura 7.6) demonstrou que as biomassas apresentaram perfil espectral semelhantes antes da etapa de redução de cinzas, sendo que as bandas

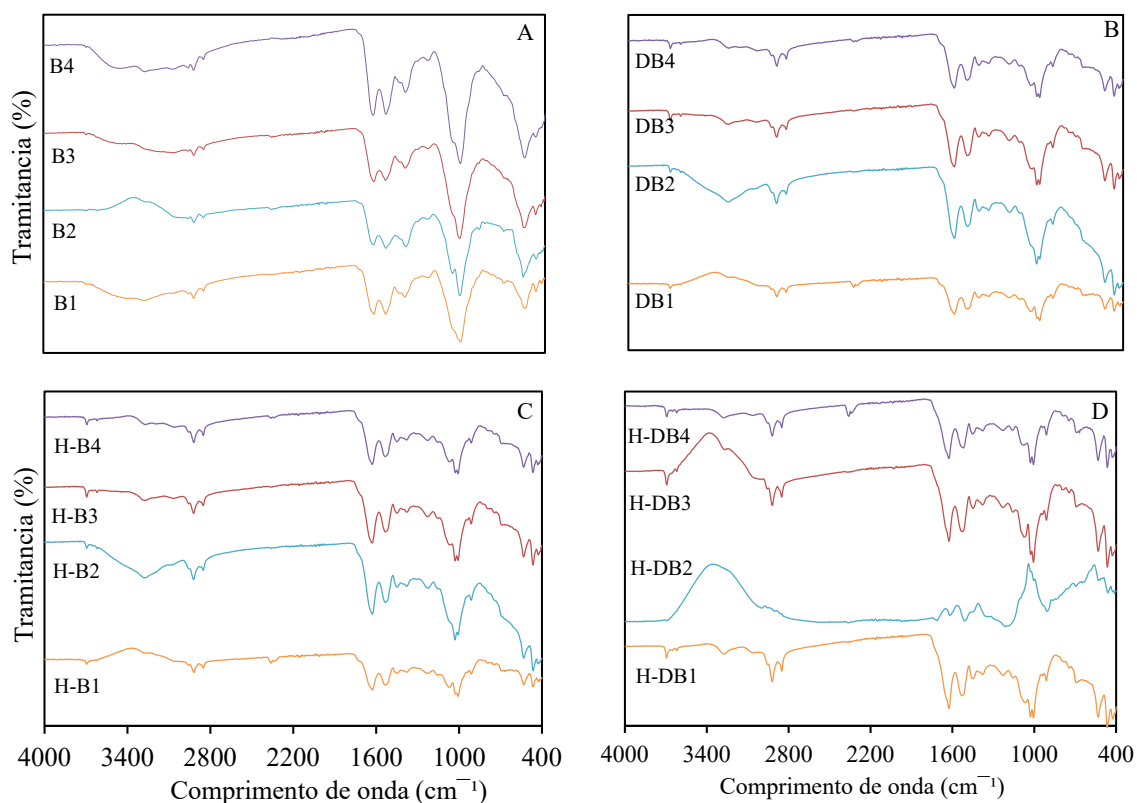
entre 606 e 560  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas à P-O (BI; PAN, 2017). Em torno de 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$  representam os carboidratos, no entanto, a banda em 1030  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser referente ao alongamento Si-O (HE; GIANNIS; WANG, 2013). A banda próxima de 1650  $\text{cm}^{-1}$  está associada ao grupo amida I e 1550  $\text{cm}^{-1}$  ao grupo amida II, que possuem ligações C=O, N-H e C-N, características das proteínas. Bandas próximas de 2900 a 2700  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionados com as vibrações simétricas e assimétricas de C-H presentes em grupamentos metil e metileno (indicação da presença de lipídios) (SILVA et al., 2012).

Ao comparar os hidrochars com (H-DBs) e sem (H-Bs) a remoção de cinzas (Figuras 7.6C e 7.6D, respectivamente), observa-se que a intensidade das bandas na região relacionada com o movimento de estiramento P-O reduziu, refletindo a composição das biomassas após o pré-tratamento, pois uma menor intensidade pode representar uma menor concentração de P. Um comportamento inverso foi observado nas bandas 1600 e 1460  $\text{cm}^{-1}$ , no qual ocorreu um acréscimo na intensidade ao comparar H-DBs e H-Bs. Esse resultado pode ser decorrente da maior concentração de N observada nas biomassas submetidas à remoção de cinzas (DBs), além de indicar a ocorrência das reações de descarboxilação durante a obtenção dos hidrochars H-DBs (HE; GIANNIS; WANG, 2013), igualmente sugerido na análise do diagrama de Van Krevelen (seção 7.3.2.1).

Para os hidrochars H-DB1 e H-DB2 foi observado um decréscimo nas intensidades relacionadas com a banda próxima de 1000  $\text{cm}^{-1}$  se comparados com as biomassas de origem, indicando a degradação dos carboidratos. Por outro lado, o H-DB4 foi semelhante à DB4, sugerindo que para essa biomassa os carboidratos foram preservados durante a CHT. Conforme discutido na seção 7.3.2.1, as condições adotadas de CHT possivelmente não foram suficientes para fornecer energia para quebra das ligações do elevado conteúdo de carboidratos observado nessa biomassa (50,2%).



**Figura 7.5:** Microscopia eletrônica de varredura obtida para as biomassas brutas (A-D), após redução de cinzas (E-G) e os respectivos hidrochars H-B (I-L) e H-DB (M-P).



**Figura 7.6:** Espectros FT-IR de biomassas brutas (A), após redução de cinzas (B) e os hidrochars correspondentes H-B (C) e H-DB (D).

Intensidades semelhantes também foram observadas nas bandas 2920 e 2850  $\text{cm}^{-1}$ . Entre os componentes bioquímicos, os lipídeos representados nessa região apresentaram a menor concentração (3,4 – 18,7%). Além disso, devido à hidrólise limitada de lipídios polares e neutros, não é esperado grandes alterações referentes a esse composto após a CHT (CASTRO et al., 2021; LI et al., 2019). De forma geral, os espectros FT-IR indicaram que proteínas e carboidratos atuaram nas reações envolvidas na CHT conforme demonstrado para a maioria dos hidrochars caracterizados, enquanto a participação dos lipídeos foi menos evidente.

### 7.3.2.3 Macro e micronutrientes

Os hidrochars foram caracterizados quanto aos teores de macro e micronutrientes a fim auxiliar na definição das aplicações mais adequadas (Tabela 7.2). De forma geral, os hidrochars apresentaram uma maior concentração dos elementos analisados se comparado com as biomassas de origem (Tabela 7.1), o que indica que a CHT foi eficiente em concentrar a maioria desses constituintes (CASTRO

et al., 2021). Essa característica pode ser explorada visando a recuperação dos metais, Abidli et al. (2022) afirmam que em termos de economia circular, a valorização e reciclagem de resíduos com metal é de grande interesse devido ao seu alto custo de extração e ao possível esgotamento das reservas. Para essa rota de aproveitamento, os hidrochars H-Bs possuem maior potencial por apresentar maiores concentrações desses elementos.

**Tabela 7.2:** Caracterização dos hidrochars obtidos após a aplicação da carbonização hidrotérmica. Os valores são referentes as médias (n=3).

Nutriente	H-B1	H-B2	H-B3	H-B4	H-DB1	H-DB2	H-DB3	H-DB4
N (g/kg)	39,5 b	30,8 c	34,5 bc	35,8 bc	68,2 a	61,9 a	61,9 a	68,2 a
P (g/kg)	56,8 c	75,6 a	71,3 b	70,2 b	2,7 d	2,22 d	3,0 d	1,9 d
K (g/kg)	9,5 b	18,3 a	9,5 b	8,2 c	0,5 d	0,5 d	0,5 d	0,6 d
Ca (g/kg)	84,1 d	142,2 a	118,4 b	113,8 c	0,9 e	1,1 e	0,8 e	0,8 e
Mg (g/kg)	13,7 a	9,7 c	11,4 b	7,4 d	0,4 e	0,4 e	0,4 e	0,3 e
S (g/kg)	4,5 b	4,6 b	4,2 b	4,0 b	7,2 a	7,2 a	7,1 a	6,8 a
Cu (g/kg)	0,5 e	2,0 c	3,1 b	4,2 a	0,6 e	3,2 b	1,5 cd	1,0 de
Fe (g/kg)	6,7 c	4,6 e	4,6 e	3,6 f	7,6 a	6,7 c	7,1 b	5,7 d
Zn (g/kg)	37,8 b	1,3 c	38,3 b	46,6 a	1,1 c	0,5 c	1,2 c	0,7 c
Mn (g/kg)	0,5 a	0,4 b	0,5 a	0,3 b	0,1 c	0,1 c	0,1 c	0,1 c
Na (mg/kg)	0,4 d	1,5 a	0,6 b	0,5 c	0,01 f	0,05 ef	0,07 e	0,10 e
Ni (mg/kg)	8,8 f	9,8 e	7,9 g	7,6 h	11,2 d	15,1 a	11,7 c	14,5 b
Pb (mg/kg)	20,8 c	8,4 g	28,6 b	37,5 a	5,7 h	12,4 e	11,2 f	14,5 d
Cr (mg/kg)	0,5	nd	0,3	0,3	nd	nd	0,3	nd

nd – não detectado. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes

O fato da CHT ter concentrado a maioria dos constituintes inicialmente observados na biomassa também é atrativo visando a obtenção de maiores teores de nutrientes para o uso como fertilizante do solo, no entanto a presença dos metais deve ser considerada pois pode restringir essa prática. Para avaliar esse risco, os hidrochars foram comparados com padrões ambientais determinados para biossólido (BRASIL, 2020a; EPA, 2018). Nessa avaliação observou-se que as concentrações de Pb e Ni extrapolam os valores limites que são de 0,30 – 0,84 e 0,42 g/kg, respectivamente. A concentração de Zn em H-Bs (exceto para H-B2) também ultrapassou o recomendado (2,8 – 7,5 g/kg).

Essas concentrações podem ser ajustadas para os valores limites (a biolixiviação pode ser aplicada), pois a utilização do hidrochar para a aplicação no solo apresenta vários aspectos positivos como o fornecimento dos macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S. Ao comparar as concentrações desses elementos com os teores mínimos recomendados para fertilizantes orgânicos, observa-se que os hidrochars

oriundos das biomassas brutas (H-Bs) são ricos em N, P e Ca, apresentando concentrações superiores aos limites estabelecidos em até 14x (BRASIL, 2020b). Para os hidrochars resultantes das biomassas com remoção de cinzas (H-DBs), apenas o N atende a concentração mínima de 1% (BRASIL, 2020b). Ressalta-se que o fornecimento de N para as culturas agrícolas reflete em maiores produtividades, além disso, o processo de produção de amônia é responsável pela emissão de cerca de 3,5 toneladas de CO<sub>2</sub> e consome 52,8 MJ de energia para cada tonelada de amônia (SANTOS; PIRES, 2018). Portanto, o potencial de utilização dos H-DBs para a aplicação no solo deve ser considerado.

No entanto, ao comparar os dois grupos de hidrochars (H-Bs e H-DBs), é possível sugerir que o primeiro é mais adequado para a aplicação no solo devido a capacidade de fornecer múltiplos nutrientes, em especial o P que é obtido a partir da mineração de rocha fosfática, sendo este um recurso com disponibilidade limitada. Os H-DBs apresentaram menores concentrações da maioria dos nutrientes em decorrência da solubilização após lavagem com solução de HCl (Tabela 7.1). É importante destacar que estudos anteriores aplicaram diretamente no solo a biomassa de microalgas cultivada em efluente sendo obtidos resultados promissores quanto ao desenvolvimento do milho e pastagem (LORENTZ et al., 2020; SILVA et al., 2021). Logo, a produção de hidrochar para essa finalidade deve ser adotada em casos nos quais os custos associados com a CHT sejam compensados. A utilização para recuperação de áreas degradadas é uma exemplo uma vez que uma das vantagens associadas ao hidrochar refere-se a sua atuação como adsorventes para remoção dos poluentes orgânicos e inorgânicos do solo (SANTOS; PIRES, 2018).

Por outro lado, como já mencionado (seção 7.3.2.1), os hidrochars H-DBs apresentaram características mais adequadas para a utilização como biocombustível devido ao maior PCS e menor conteúdo de cinzas. Assim, durante a combustão fornece mais energia ao mesmo tempo que apresenta menor risco de incrustação. No entanto, as concentrações de N e S na biomassa tornaram-se maiores após a etapa de remoção de cinzas e permaneceram elevadas nos hidrochars H-DBs. Essa característica pode ser considerada um fator que limita a utilização dos hidrochars H-DBs como biocombustível devido ao risco de emissão de gases SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>. A caracterização de diferentes carvões foram observados valores inferiores a 1,5% para o N e entre 0,2 e 2,8% de S (OZER et al., 2017). Considerando as especificações para

o uso de pellets como biocombustíveis sólidos tem-se as restrições de S inferior a 0,5% e N menor que 2,5% (ISO, 2016).

Ao comparar esses valores com aqueles obtidos para os hidrochars H-DBs é possível verificar que as concentrações de S são semelhantes aos carvões, enquanto o N supera em até 4,5x. Os limites estabelecidos para pellets não são atendidos, indicando a necessidade de redução de S e N. Os teores de N nos produtos combustíveis de microalgas como hidrochar e bio-óleo foram considerados um dos principais desafios envolvendo a obtenção de energia a partir dessa biomassa (COUTO et al., 2018; LENG et al., 2021). Leng et al. (2021) sugerem que aumentar a severidade da reação pode diminuir o teor de N no hidrochar, mas as compensações entre o rendimento e a remoção de N devem ser avaliadas. Oliveira et al. (2022) também verificaram que o conteúdo de N no hidrochar produzido com lodo de esgoto apresentou um conteúdo de N que impede a sua utilização como combustível sólido, os autores propuseram a mistura com outro combustível para adequar a concentração de N.

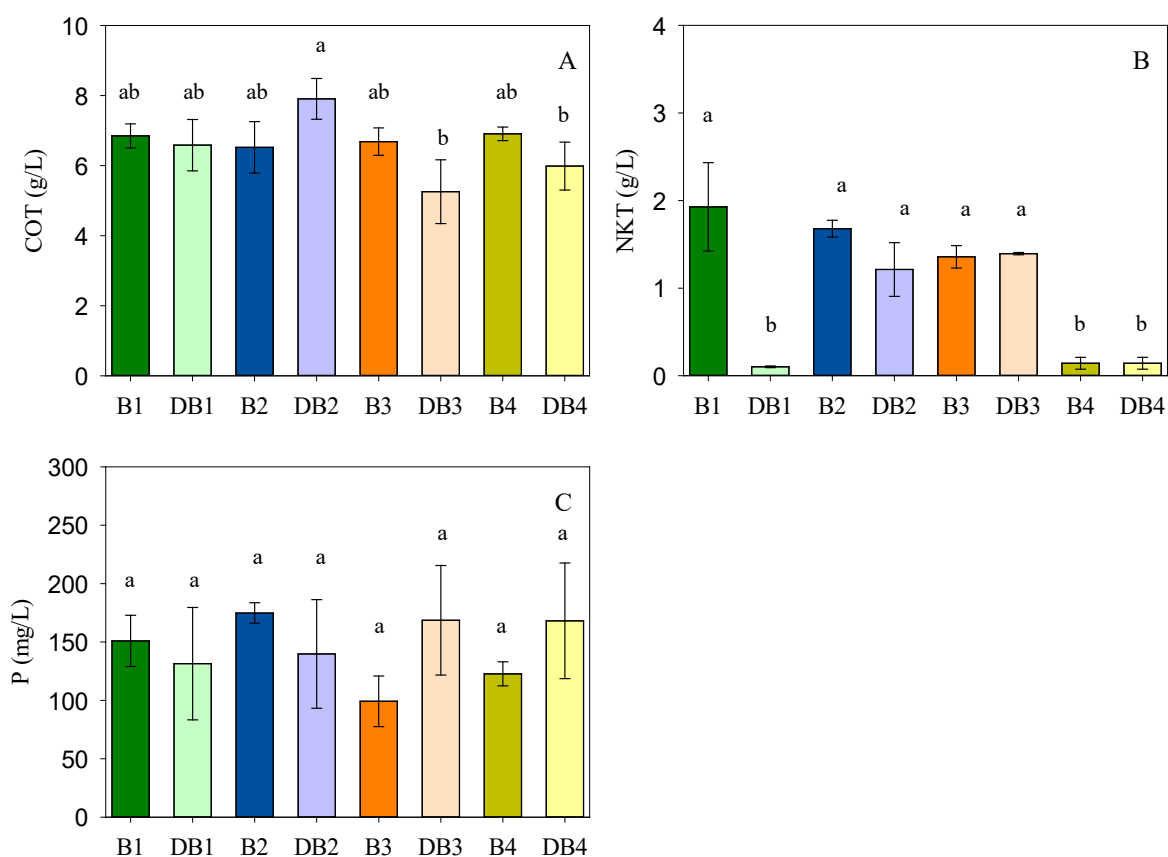
Outra alternativa menos explorada para os hidrochars produzidos com biomassa cultivada em efluentes é a obtenção de eletrodos de supercapacitores, considerados as baterias do futuro. A presença de N contribui para o hidrochar apresentar um notável desempenho de armazenamento eletroquímico por promover reações redox reversíveis e induzir a molhabilidade entre a superfície do eletrodo e o eletrólito (DEMIR et al., 2018; REN et al., 2018). O biochar com 1,5% de N a partir da CHT de macroalgas seguida de uma etapa de ativação com KOH proporcionou retenção da capacitância de até 96% (mesmo após 10000 ciclos na densidade de corrente de 10 A/g) (REN et al., 2018).

O biochar derivado de macroalga e ativação com  $\text{HNO}_3$  apresentou retenção da capacitância próximo de 100% (após 5000 ciclos em 2 A/g). Esse excelente desempenho foi atribuído, entre outros fatores, a introdução do tratamento com  $\text{HNO}_3$  que resultou em acréscimo de N no biochar de 0,05 para 4,9% e redução de cinzas. Para os biochars que não receberam esse tratamento foi observado um desempenho eletroquímico inferior, atribuído às reações de redução/oxidação de metais na estrutura do biochar (POURHOSSEINI; NOROUZI; NADERI, 2017). Portanto, os hidrochars H-DBs obtidos no presente estudo podem ser promissores para a produção de eletrodos para supercapacitores por apresentarem as características apropriadas como a redução nos teores de metais e acréscimo no

conteúdo de N. No entanto, a viabilidade dessa aplicação requer análises adicionais que não foram realizadas nesse trabalho.

### 7.3.3. Caracterização da fase aquosa

A Figura 7.7 apresenta as concentrações de COT, NKT e P para a fase aquosa obtidas em cada teste de CHT realizado. As concentrações de COT variaram entre 5,2 a 7,9 g/L com o maior teor obtido durante a produção do hidrochar H-DB2. Esse resultado indica uma maior transferência de C da biomassa DB2 para a fase aquosa o que não é um comportamento desejado uma vez que o objetivo da CHT é concentrar C no hidrochar. Ainda assim, os valores observados no presente estudo são inferiores aos reportados por Marin-Batista et al. (2019) de 11,5 a 13,1 g/L. Possivelmente devido as temperaturas mais elevadas aplicadas pelos autores (180 – 240°C) durante a CHT de biomassa algal se comparado ao do presente estudo (170°C), o que pode ter contribuído para a dissolução da matéria orgânica.



**Figura 7.7:** Caracterização da fase aquosa obtida após a CHT para as biomassas de microalgas com e sem o pré-tratamento para a remoção de cinzas.

As variações de NKT foram mais evidentes se comparada com o COT e P, com concentrações inferiores a 0,15 g/L observadas nas fases aquosas produzidas durante a CHT de DB1, B4 e DB4 enquanto nas demais foram observados teores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ), entre 1,2 e 1,9 g/L. Devido ao maior conteúdo de N nas biomassas submetidas ao pré-tratamento para a redução de cinzas, era esperado uma maior concentração de NKT nas fases aquosas derivadas dessas biomassas, o que não ocorreu. É possível sugerir que a formação de gases contendo N contribuiu para esse resultado. Um comportamento semelhante era aguardado para o P, contudo, os resultados demonstraram concentrações de P estatisticamente iguais para todas as fases aquosas (99 – 175 mg/L). As mesmas condições de temperatura e pressão adotadas em todos testes de CHT podem ter favorecido esse desempenho uma vez que a concentração de P na fase aquosa pode aumentar com o acréscimo da temperatura devido a maior dissolução da matéria orgânica (MARIN-BATISTA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022).

Devido a composição rica em nutrientes, estratégias visando a recuperação de energia e nutrientes presentes na fase aquosa podem ser adotadas. Entre elas foi proposto a recirculação na própria CHT o que possibilitou um acréscimo no conteúdo de C de 62,24% para 65,61% e um aumento no rendimento energético de 0,77 para 0,82 (STEMANN; PUTSCHEW; ZIEGLER, 2013). No entanto, a recirculação pode contribuir para acréscimos de N no hidrochar o que requer uma avaliação para a definir a proporção da fase aquosa que pode retornar na CHT. Outra possibilidade é a aplicação na reforma em fase aquosa (aqueous phase reforming - APR) o que permite a conversão de compostos orgânicos em  $H_2$ . A integração da CHT de lodo de esgoto e APR da fase aquosa possibilitou uma recuperação de energia de 93,5% nas condições otimizadas (OLIVEIRA et al., 2022).

Uma terceira possibilidade para a recuperação de energia presente na fase aquosa é a utilização como substrato na digestão anaeróbia para a produção de biogás. A aplicação da CHT da biomassa de microalgas seguida de digestão anaeróbia da fase aquosa alcançou uma recuperação de energia líquida de 91% (MARIN-BATISTA et al., 2019). Apesar dessa alternativa ser promissora tendo em vista os requisitos mínimos de energia da etapa de digestão anaeróbia, a fase aquosa obtida no presente estudo apresentou uma relação C:N:P de 64,4 - 31,2: 0,8 – 13,7: 1 (considerando o C como a concentração de COT e N igual a concentração de NKT). Essa composição é desbalanceada para o processo, considerando uma relação

recomendada de cerca de 130:5:1 (degradação de carboidratos) (CHERNICHARO, 2007). A deficiência de C observada em todas as fases aquosas e a limitação de N referentes aos tratamentos DB1, B4 e DB4 deve ser ajustada para a utilização na digestão anaeróbia. Uma alternativa é a co-digestão com materiais capazes de compensar essas deficiências.

Além das estratégias para recuperação de energia presente na fase aquosa, também é possível a recuperação dos nutrientes em aplicações agrícolas. A fase aquosa resultado da CHT de lodo esgoto e esterco de suínos foi aplicada no cultivo de arroz o que resultou em um aumento no rendimento da cultura de até 34,1% em relação ao tratamento com aplicação de uréia. Apesar desse excelente resultado, uma avaliação dos metais pesados deve ser realizada para garantir a aplicação segura da fase aquosa no solo (HE et al., 2022).

A recuperação de nutrientes também pode ocorrer por meio do cultivo de microalgas. Para essa rota é recomendada a diluição pois o crescimento algal pode ser inibido pela presença das substâncias inibidoras presentes na fase aquosa como fenóis e metais além de apresentar cor marrom que pode limitar a penetração de luz (YAO et al., 2016). Contudo, o cultivo de microalgas na fase aquosa de processos hidrotérmicos com diluição apropriada pode resultar em produção de biomassa comparável com o meio de cultivo padrão (meio sintético) (BAGNOUD-VELÁSQUEZ et al., 2015).

#### **7.3.4. Conclusão**

As cinzas presentes nas biomassas de microalgas cultivadas na água residuária da suinocultura foram majoritariamente compostas por P, K, Ca, Mg e Pb. A redução no conteúdo desses elementos antes da CHT proporcionou hidrochars com maior poder calorífico, melhor rendimento energético e presença de estruturas semicristalinas se comparado com os hidrochars produzidos sem essa etapa. Contudo, o pré-tratamento para redução de cinzas removeu possíveis elementos que poderiam atuar na hidrólise e como catalisadores da CHT, além de contribuir para uma maior concentração de N e S na biomassa.

Dessa forma, os hidrochars sem o pré-tratamento para redução de cinzas apresentaram características mais adequadas para a aplicação no solo, com a possibilidade de fornecer múltiplos nutrientes. Os hidrochars com o pré-tratamento

apresentaram maior potencial para aplicações energéticas como material combustível para fornecimento de energia após redução nos teores de N e S ou no armazenamento de energia como material eletrodo de supercapacitores.

Os efeitos das cinzas durante a CHT são complexos especialmente quando se utiliza biomassa com composição heterogênea como aquela cultivada em águas residuárias. Contudo, é possível concluir que estratégias de remoção de cinzas devem ser consideradas visando a retirada dos compostos indesejados, mas mantendo outros de interesse. Além disso, após a remoção das cinzas, as condições ótimas da CHT como tempo de reação e temperatura podem ser alteradas e devem ser identificados.

Por fim, remoção de cinzas não parece interferir na solubilização de nutrientes da biomassa para a fase aquosa.

## Referencias

ABIDLI, A. et al. Sustainable and efficient technologies for removal and recovery of toxic and valuable metals from wastewater: Recent progress, challenges, and future perspectives. *Chemosphere*, v. 292, p. 133102, 1 abr. 2022.

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23. ed. 1504p.

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, 1 set. 2017.

ASTON, J. E. et al. Application of aqueous alkaline extraction to remove ash from algae harvested from an algal turf scrubber. *Algal Research*, v. 35, p. 370–377, 1 nov. 2018.

AUDU, M. et al. Ash-pretreatment and hydrothermal liquefaction of filamentous algae grown on dairy wastewater. *Algal Research*, v. 57, p. 102282, 1 jul. 2021.

BAGNOUD-VELÁSQUEZ, M. et al. First developments towards closing the nutrient cycle in a biofuel production process. *Algal Research*, v. 8, p. 76–82, 1 mar. 2015.

BANDARA, Y. W.; GAMAGE, P.; GUNARATHNE, D. S. Hot water washing of rice husk for ash removal: The effect of washing temperature, washing time and particle size. *Renewable Energy*, v. 153, p. 646–652, 1 jun. 2020.

BHATIA, S. K. et al. Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 10 jan. 2021.

BI, L.; PAN, G. From harmful *Microcystis* blooms to multi-functional core-double-shell microsphere bio-hydrochar materials. *Scientific Reports* 2017 7:1, v. 7, n. 1, p. 1–9, 13 nov. 2017.

BRASIL. CONAMA No 498/2020 - Defines criteria and procedures for the production and application of biosolids in soils, and makes other provisions., 2020a. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-273467970>>. Acesso em: 16 jan. 2022

BRASIL. Normative Instruction No 61/2020. Establishes rules on definitions, requirements, specifications, guarantees, tolerances, registration, packaging and labeling of organic fertilizers and biofertilizers intended for agriculture., 2020b. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-61-de-8-de-julho-de-2020-266802148>>. Acesso em: 16 jan. 2022

CARPIO, R. B. et al. Characterization and thermal decomposition of demineralized wastewater algae biomass. *Algal Research*, v. 38, p. 101399, 1 mar. 2019.

CASTRO, J. DE S. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications. *Science of the Total Environment*, v. 768, p. 144480, 10 maio 2021.

CHEN, W. T. et al. Effect of ash on hydrothermal liquefaction of high-ash content algal biomass. *Algal Research*, v. 25, p. 297–306, 1 jul. 2017.

CHEN, X. et al. Conversion of sweet potato waste to solid fuel via hydrothermal carbonization. *Bioresource Technology*, v. 249, p. 900–907, 1 fev. 2018.

CHERNICHARO, C. A. L. *Anaerobic Reactors*. [s.l.] IWA Publishing, 2007.

CHU, Q. et al. Microalgae-derived hydrochar application on rice paddy soil: Higher rice yield but increased gaseous nitrogen loss. *Science of The Total Environment*, v. 717, p. 137127, 15 maio 2020.

COUTO, E. A. et al. Hydrothermal liquefaction of biomass produced from domestic sewage treatment in high-rate ponds. *Renewable Energy*, v. 118, p. 644–653, 1 abr. 2018.

DEMIR, M. et al. Nitrogen and oxygen dual-doped porous carbons prepared from pea protein as electrode materials for high performance supercapacitors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 43, n. 40, p. 18549–18558, 4 out. 2018.

EMBRAPA. Brazilian Agricultural Research Company. *Manual de análises químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (Standard of chemical analysis of soil, plants and fertilizers)*. 2 ed ed. Brasília: Rev. Ampl. Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

- EPA. PART 503 - Standards for the use or disposal of sewage sludge, 2018. Disponível em: <<https://www.epa.gov/biosolids/regulatory-determinations-pollutants-biosolids>>
- FENG, H. et al. Study on co-liquefaction of *Spirulina* and *Spartina alterniflora* in ethanol-water co-solvent for bio-oil. *Energy*, v. 155, p. 1093–1101, 15 jul. 2018.
- FENG, S. et al. Hydrothermal liquefaction of barks into bio-crude – Effects of species and ash content/composition. *Fuel*, v. 116, p. 214–220, 15 jan. 2014.
- FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. *Science of the Total Environment*, v. 746, p. 140939, 1 dez. 2020.
- FOWLER, R. W.; HU, R. Methods of Classification and Characterization of Coal. *Studies in Surface Science and Catalysis*, v. 150, n. C, p. 1–79, 1 jan. 2004.
- GAN, Y. Y. et al. Microwave-assisted wet torrefaction of microalgae under various acids for coproduction of biochar and sugar. *Journal of Cleaner Production*, v. 253, 20 abr. 2020.
- GAN, Y. Y. et al. Effect of wet torrefaction on pyrolysis kinetics and conversion of microalgae carbohydrates, proteins, and lipids. *Energy Conversion and Management*, v. 227, p. 113609, 1 jan. 2021.
- HAMID, S. B. A.; TEH, S. J.; LIM, Y. S. Catalytic hydrothermal upgrading of  $\alpha$ -cellulose using iron salts as a lewis acid. *BioResources*, v. 10, n. 3, p. 5974–5986, 2015.
- HE, C.; GIANNIS, A.; WANG, J. Y. Conversion of sewage sludge to clean solid fuel using hydrothermal carbonization: Hydrochar fuel characteristics and combustion behavior. *Applied Energy*, v. 111, p. 257–266, 1 nov. 2013.
- HE, H. et al. Waste-based hydrothermal carbonization aqueous phase substitutes urea for rice paddy return: Improved soil fertility and grain yield. *Journal of Cleaner Production*, v. 344, p. 131135, 10 abr. 2022.
- HEILMANN, S. M. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 6, p. 875–882, 1 jun. 2010.
- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. *Biomass and Bioenergy*, v. 123, p. 149–158, 1 abr. 2019.
- HOGNON, C. et al. Comparison of steam gasification reactivity of algal and lignocellulosic biomass: Influence of inorganic elements. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 347–353, 1 jul. 2014.

- HUPFAUF, B. et al. Cultivation of Microalgae in Municipal Wastewater and Conversion by Hydrothermal Carbonization: A Review. *ChemBioEng Reviews*, v. 3, n. 4, p. 186–200, 1 ago. 2016.
- ISO. ISO/TS 17225-8:2016 - Solid biofuels — Fuel specifications and classes — Part 8: Graded thermally treated and densified biomass fuels. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/71915.html>>. Acesso em: 2 maio. 2022.
- KHOO, C. G. et al. Hydrochar production from high-ash low-lipid microalgal biomass via hydrothermal carbonization: Effects of operational parameters and products characterization. *Environmental Research*, v. 188, p. 109828, 1 set. 2020.
- KUMAR, S.; ANKARAM, S. Waste-to-energy model/tool presentation. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Waste Treatment Processes for Energy Generation*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 239–258.
- LENG, L. et al. A review on nitrogen transformation in hydrochar during hydrothermal carbonization of biomass containing nitrogen. *Science of The Total Environment*, v. 756, p. 143679, 20 fev. 2021.
- LI, Y. et al. Correlations between the physicochemical properties of hydrochar and specific components of waste lettuce: Influence of moisture, carbohydrates, proteins and lipids. *Bioresource Technology*, v. 272, p. 482–488, 1 jan. 2019.
- LIU, H. et al. Hydrothermal carbonization of natural microalgae containing a high ash content. *Fuel*, v. 249, p. 441–448, 1 ago. 2019.
- LORENTZ, J. F. et al. Microalgal biomass as a biofertilizer for pasture cultivation: Plant productivity and chemical composition. *Journal of Cleaner Production*, v. 276, p. 124130, 10 dez. 2020.
- MARIN-BATISTA, J. D. et al. Valorization of microalgal biomass by hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 274, p. 395–402, 1 fev. 2019.
- MARIN-BATISTA, J. D. et al. Energy and phosphorous recovery through hydrothermal carbonization of digested sewage sludge. 2020.
- MATHIMANI, T.; MALLICK, N. A review on the hydrothermal processing of microalgal biomass to bio-oil - Knowledge gaps and recent advances *Journal of Cleaner Production* Elsevier Ltd, , 20 abr. 2019.
- 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. S. et al. Integration of hydrothermal carbonization and aqueous phase reforming for energy recovery from sewage sludge. *Chemical Engineering Journal*, v. 442, p. 136301, 15 ago. 2022.
- OZER, M. et al. Effect of coal nature on the gasification process. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017.
- PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J. Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Science and Technology*, v. 63, n. 10, p. 2403–2410, 1 maio 2011.
- POURHOSSEINI, S. E. M.; NOROUZI, O.; NADERI, H. R. Study of micro/macro ordered porous carbon with olive-shaped structure derived from *Cladophora glomerata* macroalgae as efficient working electrodes of supercapacitors. *Biomass and Bioenergy*, v. 107, p. 287–298, 1 dez. 2017.
- RANJAN, S.; GUPTA, P. K.; GUPTA, S. K. Comprehensive Evaluation of High-Rate Algal Ponds: Wastewater Treatment and Biomass Production. In: *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. p. 531–548.
- REN, M. et al. High Performance N-Doped Carbon Electrodes Obtained via Hydrothermal Carbonization of Macroalgae for Supercapacitor Applications. *ChemElectroChem*, v. 5, n. 18, p. 2686–2693, 12 set. 2018.
- ROBIN, A. et al. Deashing macroalgae biomass by pulsed electric field treatment A R T I C L E I N F O. 2018.
- SANTOS, F. M.; PIRES, J. C. M. Nutrient recovery from wastewaters by microalgae and its potential application as bio-char. *Bioresource Technology*, v. 267, p. 725–731, 1 nov. 2018.
- SCHIMMELPFENNIG, S.; GLASER, B. One step forward toward characterization: some important material properties to distinguish biochars. *Journal of environmental quality*, v. 41, n. 4, p. 1001–1013, jul. 2012.
- SILVA, J. D. O. et al. Thermal analysis and FTIR studies of sewage sludge produced in treatment plants. The case of sludge in the city of Uberlândia-MG, Brazil. *Thermochimica Acta*, v. 528, p. 72–75, 20 jan. 2012.
- SILVA, T. A. et al. Microalgae biomass as a renewable biostimulant: meat processing industry effluent treatment, soil health improvement, and plant growth. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.2000646>, 2021.

- SMITH, A. M.; SINGH, S.; ROSS, A. B. Fate of inorganic material during hydrothermal carbonisation of biomass: Influence of feedstock on combustion behaviour of hydrochar. *Fuel*, v. 169, p. 135–145, 1 abr. 2016.
- STEMANN, J.; PUTSCHEW, A.; ZIEGLER, F. Hydrothermal carbonization: Process water characterization and effects of water recirculation. *Bioresource Technology*, v. 143, p. 139–146, 1 set. 2013.
- TAG, A. T. et al. Effects of feedstock type and pyrolysis temperature on potential applications of biochar. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 120, p. 200–206, 1 jul. 2016.
- TARHAN, S. Z. et al. Cultivation of green microalgae by recovering aqueous nutrients in hydrothermal carbonization process water of biomass wastes. *Journal of Water Process Engineering*, v. 40, p. 101783, 1 abr. 2021.
- TSARPALI, M.; KUHN, J. N.; PHILIPPIDIS, G. P. Hydrothermal Carbonization of Residual Algal Biomass for Production of Hydrochar as a Biobased Metal Adsorbent. *Sustainability (Switzerland)*, v. 14, n. 1, 2022.
- URRUTIA, C.; YAÑEZ-MANSILLA, E.; JEISON, D. Bioremoval of heavy metals from metal mine tailings water using microalgae biomass. *Algal Research*, v. 43, p. 101659, 1 nov. 2019.
- WANG, R. et al. Energy recovery from high-ash municipal sewage sludge by hydrothermal carbonization: Fuel characteristics of biosolid products. *Energy*, v. 186, p. 115848, 1 nov. 2019a.
- YAO, C. et al. Utilization of recovered nitrogen from hydrothermal carbonization process by *Arthrospira platensis*. *Bioresource Technology*, v. 212, p. 26–34, 1 jul. 2016.
- ZHANG, Z.; ZHAO, Y.; WANG, T. *Spirulina* hydrothermal carbonization: Effect on hydrochar properties and sulfur transformation. *Bioresource Technology*, v. 306, p. 123148, 1 jun. 2020.

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

A produção de biomassa cultivada em lagoas de alta taxa foi otimizada com a adequação nas concentrações de Cu e Zn, sendo que as melhores condições identificadas correspondem a 1,8 mgCu/L + 15,0 mgZn/L; 1,0 mgCu/L e 40,0 mg Zn/L. No entanto, essas condições não favoreceram a remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por inibir o processo de nitrificação. Além disso, a remoção de DQOs apresentou acréscimos nos tratamentos com aplicação de metal o que foi relacionado com a produção de substâncias poliméricas extracelulares na forma de carboidratos. Essas características podem representar um desafio para conciliar a maximização da produção de biomassa algal com a remoção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e matéria orgânica. Para o P solúvel foi possível observar um comportamento oposto sendo que a adequação nos teores de Cu e Zn favoreceram a remoção desse elemento seja por precipitação ou assimilação. Esses resultados são inovadores considerando a dificuldade de remoção de P nos sistemas de tratamento de efluentes.

Quanto a composição bioquímica da biomassa, foi possível identificar que os elementos Cu e Zn comprometeram a produção de lipídeos neutros indicados para a produção de biodiesel. Por outro lado, as concentrações elevadas de carboidratos identificadas em todos os tratamentos é uma característica que potencializa a utilização da biomassa para a conversão em outras formas de energia como bioetanol e hidrochar. Essa possibilidade deve ser avaliada considerando os riscos e efeitos indesejáveis referentes as cinzas, pois a correção nos teores de Cu e Zn além de contribuir, por si só, para os acréscimos nas concentrações de cinzas também favoreceu a precipitação de outros elementos.

A respeito das cinzas verificou-se que a redução desse constituinte é possível com a lavagem da biomassa com solução ácida, contudo esse pré-tratamento promove uma concentração no conteúdo de N e S. A carbonização hidrotérmica das biomassas com e sem redução de cinzas resultou na produção de hidrochars com potencial para aplicações distintas. Sem o pré-tratamento é possível sugerir que os hidrochars são mais indicados para a recuperação de áreas degradadas. Os hidrochars obtidos a partir da biomassa com redução de cinzas são mais indicados para aplicações energéticas como material eletrodo para supercapacitores ou como combustível, sendo necessária uma redução nos teores de N para essa última aplicação.

## 9. RECOMENDAÇÕES

São apresentadas algumas recomendações para trabalhos futuros:

- Avaliar os efeitos da presença de Cu e Zn durante o tratamento de efluentes em lagoas de alta taxa em regime de operação contínua pois pode diferir do regime em batelada adotado na presente pesquisa. Uma das diferenças está relacionada com a capacidade de adaptação dos microrganismos aos metais.

- Avaliar as alterações na comunidade microbiana durante tratamento de efluente com diferentes concentrações de Cu e Zn. Essa análise permitirá a proposição de medidas de otimização para conciliar a máxima produção de biomassa com a remoção de nutrientes, especialmente de  $\text{N-NH}_4^+$ .

- Determinar as concentrações de outros micronutrientes para potencializar a produção de biomassa em lagoas de alta taxa e identificar as interferências na dinâmica do tratamento de efluentes. Dentre os elementos é possível sugerir o ferro.

- Caracterizar as substâncias poliméricas produzidas durante o tratamento da água residuária da suinocultura em lagoas de alta taxa.

- Identificar os compostos presentes nas cinzas da biomassa que podem atuar na hidrólise ou como catalizadores das reações relacionadas com a carbonização hidrotérmica.

- Verificar se os custos e impactos ambientais relacionados com a etapa de remoção de cinzas são compensados com o aumento do poder calórfico do hidrochar.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, P. et al. Tratamiento de aguas residuales porcícolas en lagunas de algas de alta tasa a nivel experimental. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, v. 2, n. 2, p. 57–66, 2011.
- 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, 1 set. 2017.
- ASSIS, T. C. DE et al. Using atmospheric emissions as CO<sub>2</sub> source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. *Journal of Cleaner Production*, v. 215, p. 1160–1169, 1 abr. 2019.
- BAYSAL, A.; OZBEK, N.; AKM, S. Determination of Trace Metals in Waste Water and Their Removal Processes. In: *Waste Water - Treatment Technologies and Recent Analytical Developments*. [s.l.] InTech, 2013.
- BHATIA, S. K. et al. Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 10 jan. 2021.
- CASTRO, J. DE S. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications. *Science of the Total Environment*, v. 768, p. 144480, 10 maio 2021.
- CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review *Applied Energy* Elsevier Ltd, , 1 jan. 2015.
- CHEN, W. T. et al. Effect of ash on hydrothermal liquefaction of high-ash content algal biomass. *Algal Research*, v. 25, p. 297–306, 1 jul. 2017.
- CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2019.
- COALE, K. H. Effects of iron, manganese, copper, and zinc enrichments on productivity and biomass in the subarctic Pacific. *Limnology and Oceanography*, v. 36, n. 8, p. 1851–1864, 1 dez. 1991.
- DELGADILLO-MIRQUEZ, L. et al. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, v. 11, p. 18–26, 1 set. 2016.

- DOSHI, H. et al. Bioaccumulation of heavy metals by green algae. *Current Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 246–255, 1 mar. 2008.
- 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, 2017.
- HEJNA, M. et al. Heavy-metal phytoremediation from livestock wastewater and exploitation of exhausted biomass. *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI AG, , 1 mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18030449>. Acesso em: 6 abr. 2021
- HESS, D. et al. Techno-economic analysis of ash removal in biomass harvested from algal turf scrubbers. *Biomass and Bioenergy*, v. 123, p. 149–158, 1 abr. 2019.
- HOGNON, C. et al. Comparison of steam gasification reactivity of algal and lignocellulosic biomass: Influence of inorganic elements. *Bioresource Technology*, v. 164, p. 347–353, 1 jul. 2014.
- KEBEDE-WESTHEAD, E.; PIZARRO, C.; MULBRY, W. W. Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *Journal of Applied Phycology*, v. 18, n. 1, p. 41–46, 2006.
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H.; KIM, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* BioMed Central Ltd., , 5 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>. Acesso em: 3 nov. 2020
- LI, X. et al. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource Technology*, v. 251, n. December 2017, p. 274–279, 2018.
- LI, X. et al. Nutrient removal from swine wastewater with growing microalgae at various zinc concentrations. *Algal Research*, v. 46, p. 101804, 1 mar. 2020.
- LI, Y. et al. Correlations between the physicochemical properties of hydrochar and specific components of waste lettuce: Influence of moisture, carbohydrates, proteins and lipids. *Bioresource Technology*, v. 272, p. 482–488, 1 jan. 2019.
- LIU, H. et al. Hydrothermal carbonization of natural microalgae containing a high ash content. *Fuel*, v. 249, p. 441–448, 1 ago. 2019.
- LUO, L. et al. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 135–141, 2016.

- MARIN-BATISTA, J. D. et al. Valorization of microalgal biomass by hydrothermal carbonization and anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 274, p. 395–402, 1 fev. 2019.
- MARTÍNEZ, M. E.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, v. 67, n. 3, p. 233–240, 1999.
- MELIS, A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency *Plant Science*, out. 2009.
- MENEGOL, T. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on biomass composition of heterochlorella luteoviridis. *Food Science and Technology*, v. 37, n. Special Issue, p. 28–37, 1 dez. 2017.
- MILITÃO, F. P. et al. Nutritional value changes in response to temperature, microalgae mono and mixed cultures. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 31, p. 17, 2019.
- MOHAMAD, S. et al. Advanced wastewater treatment using microalgae: Effect of temperature on removal of nutrients and organic carbon. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 67, n. 1, 2017.
- MOHSENPOUR, S. F. et al. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 15 jan. 2021.
- MORILLAS-ESPAÑA, A. et al. Microalgae based wastewater treatment coupled to the production of high value agricultural products: Current needs and challenges. *Chemosphere*, p. 132968, 18 nov. 2021.
- NOVÁK, Z. et al. Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (Chlorophyceae) species. *Phycological Research*, 23 mar. 2020.
- PASKULIAKOVA, A. et al. Microalgal bioremediation of nitrogenous compounds in landfill leachate – The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. *Algal Research*, v. 32, p. 162–171, 1 jun. 2018.
- POSADAS, E. et al. Influence of pH and CO<sub>2</sub> source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chemical Engineering Journal*, v. 265, p. 239–248, 1 abr. 2015.
- RAS, M.; STEYER, J. P.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 12, n. 2, p. 153–164, 10 jun. 2013.

- SALAMA, E. S. et al. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2017.
- SANGJUMRAS, P. et al. Effects of transition metal during the hydrothermal carbonization on characteristics of carbon materials. *AIP Conference Proceedings*. Anais...American Institute of Physics Inc., 5 set. 2018.
- SILVEIRA, C. F. et al. Valorization of swine wastewater in a circular economy approach: Effects of hydraulic retention time on microalgae cultivation. *Science of The Total Environment*, v. 789, p. 147861, 1 out. 2021.
- STERNER, R. W. Seasonal and spatial patterns in macro- and micronutrient limitation in Joe Pool Lake, Texas. *Limnology and Oceanography*, v. 39, n. 3, p. 535–550, 1 maio 1994.
- SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Antagonisms between cadmium and zinc toxicity and manganese limitation in a coastal diatom. *Limnology and Oceanography*, v. 41, n. 3, p. 373–387, 1 maio 1996.
- SUTHERLAND, D. L. et al. Winter-time CO<sub>2</sub> addition in high rate algal mesocosms for enhanced microalgal performance. *Water Research*, v. 89, p. 301–308, 1 fev. 2016.
- URRUTIA, C.; YAÑEZ-MANSILLA, E.; JEISON, D. Bioremoval of heavy metals from metal mine tailings water using microalgae biomass. *Algal Research*, v. 43, p. 101659, 1 nov. 2019.
- ZENG, Z. et al. The removal of copper and zinc from swine wastewater by anaerobic biological-chemical process: Performance and mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, v. 401, p. 123767, 5 jan. 2021.
- ZERAATKAR, A. K. et al. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*, v. 181, p. 817–831, 2016.
- 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, 1 fev. 2018.
- ZINICOVSCAIA, I. et al. Biotechnology of Metal Removal from Industrial Wastewater: Zinc Case Study. *CLEAN - Soil, Air, Water*, v. 43, n. 1, p. 112–117, 1 jan. 2015.

## APÊNDICE A

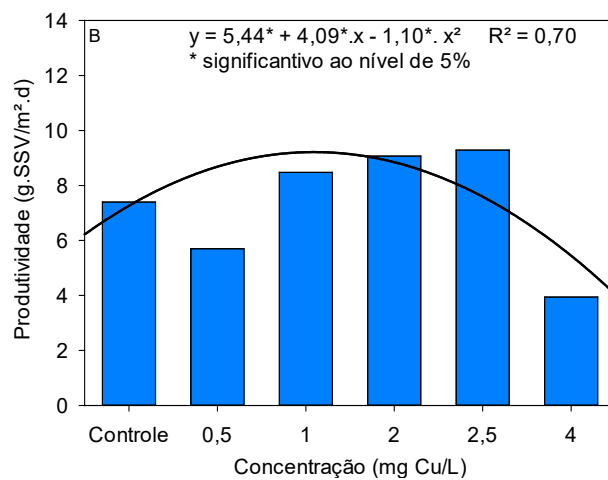


**Figura I:** Estação de tratamento da água residuária da suinocultura instalada na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Suinocultura da Universidade Federal de Viçosa.

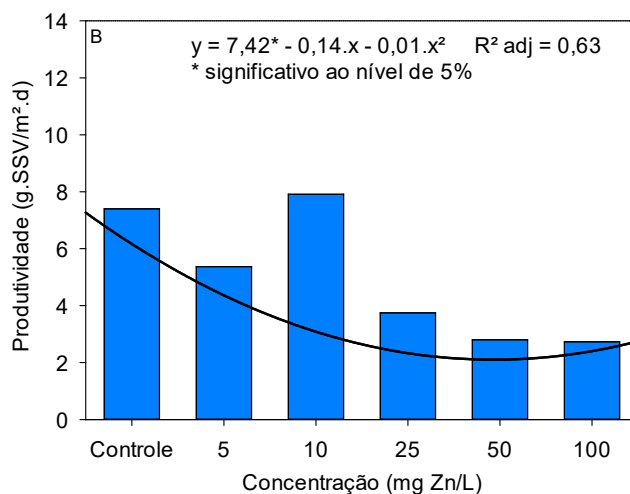


**Figura II:** Lagoas de alta taxa instaladas no Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Viçosa.

## APÊNDICE B



**Figura I:** Produtividade de biomassa total quantificados durante o cultivo de microalgas em água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de cobre.



**Figura II:** Produtividade de biomassa total quantificados durante o cultivo de microalgas em água residuária da suinocultura com diferentes concentrações de zinco.

**APÊNDICE C****Tabela III:** Tratamentos aplicados para remoção de cinzas com a identificação dos teores de carbono e cinzas (n=3).

Tratamento	Carbono (%)	Cinzas (%)
Biomassa bruta	20,6 d	39,7 b
Água	26,0 c	44,2 a
Água quente	25,6 c	42,4 a
HCl 0,10M	44,2 b	6,3 c
HCl 0,25M	49,2 a	3,8 e
HCl 0,50M	45,1 b	4,4 d
HCl 1,0M	47,5 ab	5,1 c
HCl 4,0M	45,0 b	4,4 d
NaOH 0,25M	23,4 cd	37,7 b
NaOH 0,50M	24,5 cd	38,8 b
NaOH 1,0M	26,2 c	40,8 ab
NaOH 4,0M	28,4 c	42,1 a

## ANEXO A

Journal of Environmental Management 299 (2021) 113668



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jenvman](http://www.elsevier.com/locate/jenvman)

## Swine wastewater treatment in high rate algal ponds: Effects of Cu and Zn on nutrient removal, productivity and biomass composition

Adriana Paulo de Sousa Oliveira<sup>a,\*</sup>, Paula Assemany<sup>b</sup>, José Ivo Ribeiro Júnior<sup>c</sup>, Lidiane Covell<sup>d</sup>, Adriano Nunes-Nesi<sup>d</sup>, Maria Lúcia Calijuri<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Civil Engineering, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Environmental Engineering, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Statistics, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

<sup>d</sup> Department of Plant Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Chlorella sp.

Bioremediation

Nutrient recovery

Agroindustrial effluent

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the simultaneous interferences of Cu and Zn found in swine wastewater (SW) in the development of microalgae considering real conditions of cultivation in high rate algal ponds (HRAPs). Ten HRAPs on a pilot scale were fed with SW with different mixtures of Cu (0.5–3.0 mg/L) and Zn (5.0–25.0 mg/L). The interferences of these metals in removing nutrients (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and soluble phosphorus (Ps)) from the SW were determined. In addition, this study evaluated the effects on biomass growth and biochemical composition. *Chlorella* sp. was dominant in all HRAPs and the condition that potentiated its growth occurred in medium containing 1.8 mg Cu/L + 15.0 mg Zn/L, while higher concentrations conferred inhibition. Only Cu compromised the removal rates of N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> while the effects of Zn were not significant. Contrary, Zn interfered with Ps removal rates, but the impact of Cu was not significant. The greatest Cu applications increased the protein levels by biomass (50.5–55.2 %). Carbohydrate accumulation was favored by conditions that inhibited the development of microalgae due to either limitation or excess of metals. Copper and Zn compromised the levels of lipids, and the control treatment had the highest content (24.5 %). The presence of Cu and Zn changed the dynamics of HRAPs regarding nutrient removal, productivity, and biochemical composition of the biomass.

## 1. Introduction

The supply of water and energy is essential for human and economic development. Thus, technological alternatives that make it possible to combine renewable energy generation in a systematic and coordinated approach with the protection of water resources are urgent. In this scenario, the cultivation of microalgae in wastewater has gained notoriety. As they develop, microalgae assimilate the nutrients from the wastewater and provide oxygen, allowing biological oxidation of organic matter and effluent treatment. The microalgae biomass produced in this process can be used as a source of bioenergy (Fallahi et al., 2021; Singh et al., 2021) or other value-added products.

However, several contaminants are present in wastewater. They can act as inhibitors of algal growth and consequently limit the integrated wastewater treatment system, biomass production, and bioenergy production. Heavy metals are among the biologically toxic compounds. Various wastewater such as those of industrial origin (metallurgical,

mining, textile, tannery, among others) and agroindustry (cattle, swine) have metals in their composition (Buzakov et al., 2018; Hejma et al., 2021). The most common elements in these effluents include copper (Cu) and zinc (Zn) (Akpor, 2014; Hejma et al., 2021). For example, swine farming uses Cu and Zn as feed additives; therefore, swine wastewater (SW) has high concentrations of these elements, reaching up to 13.5 mg Cu/L and 94.0 mg Zn/L (Cestonaro do Amaral et al., 2014).

Copper and Zn are critical elements in algae cultivation (Geddie and Hall, 2010). The excess of these metals can cause the formation of reactive oxygen species, which can damage various biochemical components of cells. On the other hand, Cu and Zn in low concentrations are essential for the microalgae development. Copper is an important component of the photosynthetic apparatus, being responsible for transferring electrons from photosystems II to I (Mlizek et al., 2019; Yong et al., 2020). Zinc, in turn composes several essential enzymes for the development of microalgae, such as alkaline phosphatase that acts on the absorption of P and carbonic anhydrase that integrates the CO<sub>2</sub>

\* Corresponding author.

E-mail address: [adriana.paulo@ufv.br](mailto:adriana.paulo@ufv.br) (A.P.S. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113668>

Received 21 April 2021; Received in revised form 6 August 2021; Accepted 30 August 2021

Available online 4 September 2021

0301-4797/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.