

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2018/2019

Avaliação do efeito de diferentes comprimentos de onda da luz no crescimento de microalgas e remoção de nutrientes

Ana Filipa Cruz Esteves

Dissertação submetida para obtenção do grau de
MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Joana Maia Moreira Dias
Professora Auxiliar do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da
Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Orientador: Doutor José Carlos Magalhães Pires
Investigador Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto.

Coorientador: Doutor Vítor Jorge Pais Vilar
Investigador Principal do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto.

Coorientadora: Doutora Ana Luísa da Cunha Gonçalves
Investigadora do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia
da Universidade do Porto.

Porto, Julho de 2019

Agradecimentos

Agradeço ao Professor José Carlos Pires pela disponibilidade e pelas críticas construtivas dadas durante todo o trabalho desenvolvido. Obrigada pelo seu apoio e o seu interesse constante, pela vontade de ensinar e fazer com que não restem nenhuma dúvida e principalmente por me mostrar o gosto que tem pelo seu trabalho o que fez com que ainda me interessasse mais pelo tema desenvolvido nesta dissertação. Ao Professor Vítor Vilar, por disponibilizar todos os recursos à sua disposição necessários para o desenvolvimento desta dissertação. Agradeço muito à Ana Luísa Gonçalves por tudo o que me ensinou e por tudo o que fez para me ajudar, por toda a simpatia, atenção, dedicação e disponibilidade durante todo o processo de elaboração da dissertação. Agradeço à Cíntia Almeida toda a disponibilidade e apoio dado. Agradeço também à equipa do Laboratório E404 e da ETAR pelo apoio e pelos momentos de descontração, especialmente à Bruna Porto pelo que me ensinou e por estar sempre disponível a ajudar ou a contar uma piada.

Palavra de apreço ao meu muro que me manteve de pé durante estes 5 anos, os meus amigos, obrigada por todo o apoio, todas as aventuras e diversões, por tudo o que me ensinaram, por serem quem são e por me levantarem se eu cair.

Um agradecimento especial à minha família por me animarem todos os dias e me apoiarem quando precisava, por sempre acreditarem em mim e me ajudarem no que fosse preciso, não podia pedir melhor.

Agradecimentos Institucionais

Este trabalho foi financiado por:

1. Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC);
2. Projeto POCI-01-0145-FEDER-031736 – PIV4Algae - Process Intensification for microalgal production and Valorisation, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC);
3. Projeto “LEPABE-2-ECO-INNOVATION”, com a referência NORTE-01-0145-FEDER-000005, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do FEDER;
4. Laboratório Associado LSRE-LCM - UID/EQU/50020/2019 - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).



Resumo

O crescimento populacional tem contribuído de forma significativa para o aumento do consumo de água potável e consequentemente a sua escassez. Por outro lado, o desenvolvimento das atividades industriais e agrícolas tem levado à degradação da qualidade da água, através da descarga de efluentes e escoamentos agrícolas com tratamento inadequado. A eutrofização é um dos principais problemas que afetam a qualidade das águas superficiais. A remoção de nutrientes de águas residuais pode ser realizada com recurso às microalgas, visto que o azoto e o fósforo são nutrientes essenciais para o crescimento destes organismos. A fonte de luz desempenha um papel fundamental no crescimento das microalgas e na sua capacidade de remoção de nutrientes, pois constitui a fonte de energia utilizada por estes microrganismos nas reações de fotossíntese. Neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito do comprimento de onda da luz no crescimento, remoção de nutrientes do meio de cultura e concentração de açúcares na biomassa produzida utilizando três espécies distintas de microalgas verdes: *Chlorella vulgaris*, *Tetrademus obliquus* e *Neochloris oleoabundans*. O estudo foi desenvolvido com LEDs de diferentes comprimentos de onda/cores: 380-750 nm (LED branco), 620-750 nm (LED vermelho) e 450-495 nm (LED azul). Para além disso, também foi avaliado o efeito do modo de operação em semi-contínuo nos parâmetros de crescimento, remoção de nutrientes e concentração de açúcares para as espécies *C. vulgaris* e *T. obliquus*.

Verificou-se que a luz branca proporciona a melhor condição para o crescimento de todas as espécies. As taxas específicas de crescimento para essa condição foram $0,18 \pm 0,03$, $0,205 \pm 0,003$ e $0,405 \pm 0,004$ d⁻¹ para *C. vulgaris*, *T. obliquus* e *N. oleoabundans*, respetivamente. No entanto, analisando as taxas específicas de crescimento em função da quantidade de fótons acumulada verificou-se que as menores taxas de crescimento foram obtidas com a luz branca quando comparado com os resultados obtidos pela luz vermelha e azul, para todas as espécies. Destes, o maior valor foi obtido pela *N. oleoabundans* com a luz vermelha, $(370,7 \pm 0,7) \times 10^{-7}$ L $\mu\text{mol}_{\text{fótons}}^{-1}$. A remoção de nitratos foi maior nos ensaios com luz branca, onde o valor mais elevado de eficiência de remoção de nitrato foi obtido pela *C. vulgaris* (43,0%) e o mais baixo pela *N. oleoabundans* (40,5%). No caso do fosfato, no ensaio com luz branca a *N. oleoabundans* apresenta o valor mais elevado de eficiência de remoção de fosfatos (52,8%) seguida pela *C. vulgaris* (25,2%) e por fim a *T. obliquus* (19,1%). A concentração de açúcares foi maior com luz branca para a *C. vulgaris* ($17,0 \pm 0,5$ mg L⁻¹) e *N. oleoabundans* (14 ± 2 mg L⁻¹). No caso da *T. obliquus*, esta obteve a maior concentração de açúcares com a luz vermelha (15 ± 1 mg L⁻¹). Nos ensaios realizados em modo semi-contínuo, a taxa de crescimento e a produtividade máxima foram mais elevadas na primeira fase ($0,20 \pm 0,03$ d⁻¹ e 25 ± 1 mg L⁻¹ d⁻¹ para a *C. vulgaris* e, no caso da *T. obliquus*, $0,15 \pm 0,01$ d⁻¹ e $8,8 \pm 0,9$ mg L⁻¹ d⁻¹). As eficiências de remoção de nitrato e

fosfato foram mais elevadas nos ensaios onde a *C. vulgaris* foi utilizada, chegando a valores máximos de 97,1% e 93,6% para os nitratos e fosfatos, respetivamente.

Palavras-chave: Biorremediação, Comprimento de onda da luz, LEDs, Microalgas, Produção de biomassa, Remoção de nutrientes.

Abstract

Population growth has contributed significantly to the increase of freshwater consumption and, consequently, to its scarcity. On the other hand, the development of industrial and agricultural activities has led to the degradation of water quality, through the discharges of effluents and agricultural runoff with inadequate treatment. Eutrophication is one of the main problems affecting surface water quality. The removal of nutrients from wastewater can be done using microalgae, since nitrogen and phosphorus are essential nutrients for the growth of these organisms. The light source plays a fundamental role in the growth of microalgae and its nutrient removal capacity, since it is the source of energy used by these microorganisms in photosynthetic reactions. The aim of this study was to evaluate the effect of light wavelength on growth, nutrient removal from the culture medium and sugar concentration in the biomass produced using three distinct green microalgae: *Chlorella vulgaris*, *Tetradesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans*. The experiments were conducted using LEDs with different colors/wavelengths: 380-750 nm (white LED), 620-750 nm (red LED) and 450-495 nm (blue LED). In addition, it was also evaluated the effect of the semi-continuous operation mode in the growth parameters, nutrient removal and sugar concentration for *C. vulgaris* and *T. obliquus* species.

It was observed that the white light represents the best condition for the growth of all species. The specific growth rates for this condition were 0.18 ± 0.03 , 0.205 ± 0.003 and $0.405 \pm 0.004 \text{ d}^{-1}$ for *C. vulgaris*, *T. obliquus* and *N. oleoabundans*, respectively. However, analyzing the specific growth rates as a function of the accumulated photon quantity, it was found that the lowest growth rates were obtained with white light when compared with the results obtained by red and blue light for all species. The highest value was obtained by *N. oleoabundans* with red light, $(370.7 \pm 0.7) \times 10^{-7} \text{ L } \mu\text{mol}^{-1}$. Nitrate removal was higher in white light experiments, where the highest nitrate removal efficiency was obtained by *C. vulgaris* (43.0%) and the lowest by *N. oleoabundans* (40.5%). In the case of phosphate, *N. oleoabundans* showed the highest removal efficiency (52.8%) followed by *C. vulgaris* (25.2%) and *T. obliquus* (19.1%). The concentration of sugars was higher with white light for *C. vulgaris* ($17.0 \pm 0.5 \text{ mg L}^{-1}$) and *N. oleoabundans* ($14 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$). In the case of *T. obliquus*, the highest concentration of sugars was obtained with red light ($15 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$). In the experiments performed in semi-continuous mode, the growth rate and maximum biomass productivities were higher in the first phase ($0.20 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$ and $25 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, for *C. vulgaris* and, in the case of *T. obliquus*, $0.15 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ and $8.8 \pm 0.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Both nitrate and phosphate removal efficiencies were higher for the experiments with *C. vulgaris*, reaching maximum values of 97.1% and 93.6% for nitrates and phosphates, respectively.

Keywords: Biomass production, Bioremediation, LEDs, Light wavelength, Microalgae, Nutrient removal.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Agradecimentos Institucionais	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas.....	xv
Notação e glossário	xvii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento e apresentação	1
1.2. Objetivos	3
1.3. Organização da dissertação	3
2. Revisão da literatura	5
2.1. Microalgas.....	5
2.1.1. Microalgas em estudo	5
2.2. Modo de crescimento	6
2.3. Tecnologias de cultivo.....	7
2.3.1. Sistemas fechados	7
2.3.2. Sistemas abertos.....	8
2.4. Fatores que afetam o crescimento das microalgas	9
2.4.1. Luz (intensidade, fotoperíodo e comprimento de onda)	9
2.4.2. Concentração de nutrientes	11
2.4.3. pH e concentração de CO ₂	12
2.4.4. Concentração de O ₂	13
2.4.5. Temperatura	14
2.4.6. Salinidade	14
2.5. Aplicações das microalgas	15
3. Materiais e métodos	19
3.1. Meio de cultura e microalgas	19
3.2. Instalação experimental.....	19

3.2.1.	Avaliação do efeito do comprimento de onda.....	20
3.2.2.	Avaliação do efeito do modo de operação em semi-contínuo	21
3.3.	Métodos analíticos.....	22
3.4.	Parâmetros cinéticos de crescimento e remoção de nutrientes.....	23
4.	Resultados e discussão.....	25
4.1.	Avaliação do efeito do comprimento de onda da luz.....	25
4.1.1.	Crescimento de biomassa.....	25
4.1.2.	Remoção de nutrientes	29
4.1.3.	Teor de açúcares.....	33
4.2.	Avaliação do efeito do modo de operação em semi-contínuo	34
4.2.1.	Crescimento de biomassa.....	34
4.2.2.	Remoção de nutrientes	35
4.2.3.	Teor de açúcares.....	38
5.	Conclusões.....	39
5.1.	Considerações finais	39
5.2.	Trabalhos futuros.....	40
	Referências bibliográficas.....	41
Anexo A.1.	Valores de temperatura e pH para os ensaios com diferentes comprimentos de onda	51
Anexo A.2.	Reta de calibração da densidade ótica <i>versus</i> concentração de biomassa	53
Anexo A.3.	Retas de calibração usadas nas medições de cromatografia iônica	55
Anexo A.4.	Reta de calibração da concentração de açúcares	57
Anexo A.5.	Representação gráfica de $\ln(X)$ em função do tempo para as diferentes condições de luz	59
Anexo A.6.	Representação gráfica de $\ln(X)$ em função da quantidade de fótons acumulada para as diferentes condições de luz	61

Índice de figuras

Figura 1 – Diagrama de especiação relativa (%) de dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) na água como função do pH (Adaptado de Pedersen et al. (2013)). No exemplo apresentado a temperatura é 20 °C e a condutividade elétrica 250 $\mu\text{S cm}^{-1}$	12
Figura 2 – Subprodutos obtidos da biomassa de microalgas.....	16
Figura 3 – Ciclo de carbono durante o cultivo de microalgas e produção de biocombustíveis.....	17
Figura 4 – Instalação experimental usada para o crescimento das microalgas com LEDs de diferentes cores: A. LED branco (380-750 nm); B. LED vermelho (620-750 nm); C. LED azul (450-495 nm).....	21
Figura 5 – Curvas de crescimento obtidas para as diferentes condições de luz (LED branco, LED vermelho e LED azul) para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A), <i>T. obliquus</i> (B) e <i>N. oleoabundans</i> (C).....	25
Figura 6 – Variação da concentração de nitratos e fosfatos para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C, F, I) para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A, B, C), <i>T. obliquus</i> (D, E, F) e <i>N. oleoabundans</i> (G, H, I).....	31
Figura 7 – Curvas de crescimento obtidas para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A) e <i>T. obliquus</i> (B) nos ensaios em semi-contínuo.	34
Figura 8 – Variação da concentração de nitratos e fosfatos nos ensaios realizados em semi-contínuo para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A), <i>T. obliquus</i> (B).	36
Figura A.2: 1 – Retas de calibração da concentração da biomassa para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A), <i>T. obliquus</i> (B) e <i>N. oleoabundans</i> (C).	53
Figura A.4: 1 – Reta de calibração de absorvância a 490 nm versus concentração de glicose.	57
Figura A.5: 1 – Representação gráfica de $\ln(X)$ em função do tempo para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C e F) para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A, B, C), <i>T. obliquus</i> (D, E, F) e <i>N. oleoabundans</i> (G e H). O gráfico relativo à <i>N. oleoabundans</i> nas condições de luz azul não está representado porque a microalga não cresceu nessas condições. Os pontos a laranja representam a fase exponencial de crescimento.	60
Figura A.6: 1– Representação gráfica de $\ln(X)$ em função da quantidade de fótons acumulada para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C e F) para as espécies <i>C. vulgaris</i> (A, B, C), <i>T. obliquus</i> (D, E, F) e <i>N. oleoabundans</i> (G e H). O gráfico relativo à <i>N. oleoabundans</i> nas condições de luz azul	

não está representado porque a microalga não cresceu nessas condições. Os pontos a laranja representam a fase exponencial de crescimento. 62

Índice de tabelas

Tabela 1 – Condições utilizadas nos diferentes ensaios	20
Tabela 2 – Intensidade luminosa média ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada nos ensaios de crescimento em descontínuo para cada espécie e comprimento de onda	21
Tabela 3 – Parâmetros de análise do crescimento das diferentes espécies de microalgas obtidos para os diferentes comprimentos de onda da luz utilizados	27
Tabela 4 – Taxa específica de crescimento determinada em função da quantidade de fótons acumulados pelas diferentes espécies de microalgas nos diferentes comprimentos de onda da luz utilizados.....	28
Tabela 5 – Parâmetros cinéticos de remoção de azoto e fósforo calculados para cada ensaio.....	32
Tabela 6 – Concentração de açúcares totais (mg L^{-1}) determinados em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada ensaio	33
Tabela 7 – Parâmetros de análise do crescimento das diferentes espécies de microalgas obtidos nos ensaios de crescimento em semi-contínuo	35
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos de remoção de azoto e fósforo calculados nos ensaios em semi-contínuo para cada microalga	37
Tabela 9 – Concentração de açúcares totais (mg L^{-1}) determinados em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada ciclo de crescimento em modo semi-contínuo.....	38
Tabela A.1: 1 – Valores de temperatura e pH da <i>C. vulgaris</i> para os ensaios com diferentes comprimentos de onda.....	51
Tabela A.1: 2 – Valores de temperatura e pH da <i>T. obliquus</i> para os ensaios com diferentes comprimentos de onda.....	51
Tabela A.1: 3 – Valores de temperatura e pH da <i>N. oleoabundans</i> para os ensaios com diferentes comprimentos de onda.....	52
Tabela A.3: 1 – Curvas de calibração usadas para cálculo da concentração dos iões analisados	55

Notação e glossário

Símbolos

A	Área da superfície iluminada	m ²
N	Quantidade de fótons acumulada por unidade de volume	μmol _{fótons} L ⁻¹
ER	Eficiência de remoção	%
I	Intensidade luminosa	μmol _{fótons} m ⁻² s ⁻¹
P _x	Produtividade	mg L ⁻¹ d ⁻¹
S	Concentração do nutriente	mg L ⁻¹
t	Tempo	d
TR	Taxa de remoção	mg L ⁻¹ d ⁻¹
V	Volume de cultura	L
X	Concentração de biomassa	mg L ⁻¹
Y _{x/s}	Rendimento específico de biomassa (b) em termos do substrato (S)	g _b g _s ⁻¹

Letras gregas

λ	Comprimento de onda	nm
μ	Taxa específica de crescimento	d ⁻¹ ou L μmol _{fótons} ⁻¹
σ	Desvio-padrão	
Δ	Variação	

Índices

0	Instante inicial da fase exponencial
1	Instante final da fase exponencial
acum	Acumulada
f	Instante final
i	Instante inicial
máx	Máximo
med	Médio
z	Instante z

Lista de Siglas

CCAP	<i>Culture Collection of Algae and Protozoa</i>
CQO	Carência química de oxigênio
DO ₆₈₀	Densidade ótica a 680 nm
LED	Díodos emissores de luz
PE	População equivalente
PTFE	Politetrafluoretileno
rpm	Rotações por minuto
UTEX	<i>University of Texas Culture Collection of Algae</i>
UE	União Europeia

1. Introdução

1.1. Enquadramento e apresentação

O rápido aumento populacional, assim como o aumento das atividades antropogénicas, têm contribuído para o aumento do consumo de água potável e consequente escassez deste recurso natural. Ao mesmo tempo, o crescimento da atividade agrícola, das atividades industriais e da urbanização tem contribuído para a descarga de resíduos nos cursos de água, resultando na contaminação destes recursos com o aumento da concentração de determinados elementos químicos, como o azoto e o fósforo (Aslan and Kapdan, 2006; Rawat et al., 2011; Renuka et al., 2013). O enriquecimento dos recursos hídricos em azoto e fósforo, fenómeno também conhecido como eutrofização, apresenta um grande impacto ambiental, podendo levar ao crescimento de algas à superfície das águas e desenvolvimento de plantas aquáticas que, por sua vez, contribuem para a diminuição da concentração de oxigénio na água, perda de determinadas espécies aquáticas e degradação total destes ecossistemas (Renuka et al., 2013; Ruiz et al., 2013). De forma a evitar estes problemas, a União Europeia (UE) definiu limites para a concentração de nutrientes (azoto e fósforo) nos efluentes, bem como percentagens de redução mínimas para as zonas mais suscetíveis ao fenómeno de eutrofização (Diretiva 1991/271/CEE, 1991; Diretiva 1998/15/CE, 1998). Estas diretivas foram transpostas para a legislação portuguesa pelos Decretos-Lei n.º 152/97 e n.º 348/98 (Decreto-Lei n.º 152/97, 1997; Decreto-Lei n.º 348/98, 1998). De acordo com estes Decretos-Lei, os limites para descarga de efluentes em termos de população equivalente (PE) são os seguintes: (i) 15 mg N L⁻¹ (10 < PE < 100 000) ou 10 mg N L⁻¹ (PE > 100 000) para o caso do azoto, com uma percentagem de redução mínima de 70-80%; (ii) 2 mg P L⁻¹ (10 < PE < 100 000) ou 1 mg P L⁻¹ (PE > 100 000) para o caso do fósforo, com uma percentagem de redução mínima de 80%.

No sentido de cumprir os limites estabelecidos pela UE, torna-se necessário adotar técnicas de tratamento efetivas, capazes de reduzir as concentrações de azoto e fósforo nos efluentes antes da sua descarga nos cursos de água. A remoção de azoto e fósforo nos efluentes é maioritariamente realizada durante o tratamento terciário, sendo os principais métodos utilizados processos anaeróbios, seguidos de processos de nitrificação e desnitrificação (Fulazzaky et al., 2015; Piao et al., 2015). Contudo, de forma a atingir os parâmetros definidos pela legislação europeia, a implementação destes processos requer a aplicação de vários ciclos de nitrificação e desnitrificação. Para além disso, estes métodos requerem vários tanques e ainda longos tempos de residência, aumentando significativamente os custos do tratamento, bem como a complexidade e as necessidades energéticas (Foess et al., 1998; Jeyanayagam, 2005; Singh et al., 2005). Por outro lado, a remoção destes nutrientes em águas residuais pode ser realizada recorrendo a processos físico-químicos, como a precipitação com sais de compostos

metálicos (maioritariamente ferro e alumínio). Contudo, também estes métodos apresentam elevados custos e a sua utilização resulta na produção de grandes quantidades de resíduos contaminados com metais, necessitando de um passo adicional de tratamento (Bernard and Rémond, 2012; Malhotra et al., 1964; Wang et al., 2006; Zang et al., 2015).

Em alternativa a estes métodos de remoção de nutrientes, a utilização de microrganismos fotossintéticos, como as microalgas e/ou cianobactérias, tem atraído o interesse de muitos investigadores a nível mundial. Estes microrganismos requerem fontes inorgânicas de azoto e fósforo para o seu crescimento, apresentando um papel importante na remoção de nutrientes de diferentes efluentes (Rawat et al., 2011; Silva-Benavides and Torzillo, 2012). Para além disso, o cultivo destes microrganismos apresenta outras vantagens (Allen et al., 2009; Brennan and Owende, 2010; Ho et al., 2011; Parmar et al., 2011; Singh et al., 2005; Spolaore et al., 2006; Tang et al., 2011): (i) através da fotossíntese, as microalgas são capazes de capturar CO₂ presente na atmosfera ou em emissões gasosas industriais, contribuindo para a mitigação das emissões deste gás na atmosfera; (ii) a biomassa de microalgas é muito rica em proteínas e hidratos de carbono, podendo ser utilizada na alimentação animal e humana; (iii) as microalgas acumulam uma grande diversidade de compostos, como pigmentos, antioxidantes, vitaminas, minerais, entre outros, o que lhes confere uma grande vantagem comercial, especialmente para a produção de compostos de elevado valor acrescentado; (iv) as microalgas também acumulam grandes quantidades de lípidos, que podem ser extraídos e convertidos em biocombustíveis; e (v) após extração dos compostos de interesse, a biomassa residual pode ser utilizada para produção de bioetanol (através da fermentação), eletricidade e energia térmica (através do processo de cogeração do biogás gerado por digestão anaeróbia).

Apesar das vantagens referidas para as microalgas, o cultivo/produção destes microrganismos, e consequente remoção de nutrientes, apresenta ainda alguns desafios, especialmente no que diz respeito à obtenção de elevadas produtividades de biomassa ao menor custo possível. Uma alternativa possível para otimização da produção de biomassa de microalgas consiste na otimização dos parâmetros de cultura com mais influência no processo. De uma forma geral, o crescimento de microalgas é influenciado pela luz, disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, salinidade, concentração de oxigénio dissolvido e presença de substâncias tóxicas. Para além disso, condições operacionais como a agitação, arejamento e modo de operação têm uma grande influência nas produtividades de biomassa obtidas (Barsanti and Gualtieri, 2014; Hu, 2004; Kumar et al., 2010; Yen et al., 2013). Destes, um dos fatores mais importantes é a luz, uma vez que é a fonte de energia utilizada nas reações de fotossíntese. A luz influencia o crescimento de microalgas, quer em termos de quantidade (intensidade luminosa), quer em termos de qualidade (comprimento de onda, fonte de luz utilizada, entre outros). No crescimento de microalgas podem ser utilizados vários tipos de iluminação artificial tais como lâmpadas fluorescentes ou díodos emissores de luz (LED).

As lâmpadas fluorescentes têm um largo espectro de emissão incluindo os comprimentos de onda que provocam uma eficiência fotossintética baixa; já os LEDs emitem luz monocromática a diferentes comprimentos de onda, permitindo um melhor controlo da luz e ainda a utilização de comprimentos de onda variáveis, de forma aumentar a eficiência fotossintética (Carvalho et al., 2011; Schulze et al., 2016). Por outro lado, diferentes modos de operação podem ser utilizados (descontínuo, contínuo e semi-contínuo), por forma a aumentar a produtividade de biomassa e remoção de nutrientes.

1.2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do efeito do comprimento de onda da luz no crescimento e remoção de nutrientes do meio de cultura utilizando três espécies distintas de microalgas verdes: *Chlorella vulgaris*, *Tetrademus obliquus* e *Neochloris oleoabundans*. As gamas de comprimentos de onda da luz (λ) testadas no cultivo destas microalgas foram as seguintes: 380-750 nm (luz branca), 620-750 nm (luz vermelha) e 450-495 nm (luz azul). Para avaliação do crescimento, foram avaliados os parâmetros cinéticos, nomeadamente a taxa específica de crescimento e a produtividade de biomassa. A remoção de nutrientes do meio de cultura (com concentrações de nitrato e fosfato semelhantes às tipicamente encontradas em diferentes efluentes) foi avaliada em termos de percentagens e taxas médias de remoção. Uma vez que a qualidade de luz tem também uma influência significativa na composição bioquímica da biomassa, a biomassa produzida nas diferentes condições de luz foi também analisada em termos de teor de açúcares.

Foi ainda objetivo deste trabalho a avaliação do modo de operação em semi-contínuo nos parâmetros de crescimento e remoção de nutrientes. Estes ensaios foram realizados para duas das espécies testadas (*C. vulgaris* e *T. obliquus*) e para as melhores condições de luz (luz branca).

1.3. Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se estruturada em cinco capítulos. O Capítulo 1 descreve o enquadramento e relevância do trabalho, bem como os principais objetivos e a estrutura do documento.

O capítulo 2 apresenta a revisão da literatura, onde é feita uma abordagem às microalgas, com especial destaque para as microalgas em estudo neste trabalho, aos diferentes modos de crescimento e parâmetros que influenciam o mesmo e às principais aplicações apontadas para estes microrganismos.

A metodologia adotada para avaliar o crescimento e remoção de nutrientes das microalgas em estudo sob diferentes condições de luz, bem como a metodologia para crescimento em modo semi-contínuo, são descritas no Capítulo 3.

O Capítulo 4 apresenta os resultados de crescimento (curvas de crescimento, taxas específicas de crescimento e produtividades de biomassa) e remoção de nutrientes (percentagens e taxas médias de remoção) obtidos para as três espécies de microalgas nas diferentes condições testadas.

Por último, o Capítulo 5 apresenta as principais conclusões deste trabalho e recomendações para trabalhos futuros.

2. Revisão da literatura

2.1. Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos eucarióticos (tais como microalgas verdes) ou procarióticos (por exemplo, as cianobactérias), fáceis de cultivar, capazes de crescer rapidamente, mesmo em condições desfavoráveis, devido à sua estrutura celular simples (Buono et al., 2016; Mata et al., 2010). Estes organismos encontram-se presentes em ambientes terrestres, de água doce e ambientes marinhos (Torres-Carvajal et al., 2017; Barbera et al., 2016). O número estimado de espécies existentes é de 50000, sendo que, só aproximadamente 30000 foram analisadas e estudadas (Mata et al., 2010). Estas podem ser classificadas em diferentes tipos, dependendo das suas características morfológicas, pigmentos que apresentam, entre outros. Relativamente às classes de microalgas eucarióticas mais preponderantes, estas incluem as microalgas verdes (*Chlorophyceae*), as microalgas douradas (*Chrysophyceae*) e as diatomáceas (*Bacillariophyceae*). Por outro lado, a classe de microalgas procarióticas com maior predominância é a das microalgas azuis-esverdeadas ou cianobactérias (*Cyanophyceae*) (Demirbas and Demirbas, 2010; Barsanti and Gualtieri, 2014).

Estes microrganismos contêm na sua composição bioquímica quatro elementos básicos (Williams and Laurens, 2010): (i) os hidratos de carbono, que desempenham funções estruturais e metabólicas; (ii) os ácidos nucleicos, que servem de base ao crescimento e à divisão celular; (iii) as proteínas que, tal como os hidratos de carbono, realizam funções estruturais e metabólicas e, para além disso, agem como catalisadores (enzimas) das reações metabólicas, ajudando no crescimento celular; e (iv) os lípidos, que exercem funções estruturais e de armazenamento de energia. A nível morfológico, as microalgas podem ser classificadas como unicelulares (móveis ou imóveis), coloniais (móveis ou imóveis), filamentosas ou sifonadas (Barsanti and Gualtieri, 2014).

As microalgas têm várias características vantajosas como (Buono et al., 2016; Guccione et al., 2014; Buono et al., 2014; Borowitzka, 2013): (i) elevada eficiência fotossintética; (ii) capacidade para crescer em água impotável ou salgada; (iii) rápido crescimento, mesmo em condições desfavoráveis; (iv) elevada percentagem de lípidos; (v) capacidade para fixar CO₂; (vi) capacidade para utilizarem nutrientes em excesso em efluentes; e (vii) biomassa rica em compostos passíveis de serem utilizados como matéria-prima de produtos de elevado valor acrescentado.

2.1.1. Microalgas em estudo

As microalgas estudadas neste trabalho são a *C. vulgaris*, *T. obliquus* e *N. oleoabundans*. *C. vulgaris* é uma microalga verde, unicelular, sem mobilidade e com reprodução vegetativa (Wang and Lan, 2018). Esta microalga é utilizada no tratamento de águas residuais e pelas indústrias alimentar, cosmética e petrolífera, devido à elevada

taxa de crescimento e alto teor em lípidos, proteínas e hidratos de carbono que podem ser obtidos da sua biomassa (Niederwieser et al., 2018; Fu et al., 2019). Além disso, esta microalga tem sido amplamente utilizada, quer à escala laboratorial, quer à escala industrial, sendo capaz de crescer numa grande variedade de condições ambientais (Safi et al., 2014).

T. obliquus é uma microalga verde de água doce, sem mobilidade (Buono et al., 2016). Tem uma parede celular rígida, composta principalmente por celulose e hemicelulose, e cresce em colónias de quatro células. Esta microalga tem sido amplamente utilizada no tratamento de águas residuais e na produção de biodiesel (Shen et al., 2015; Wang and Lan, 2018). Rugnini et al. (2019) estudaram a capacidade da microalga *T. obliquus* na remoção de fósforo e metais de um efluente sintético. O cultivo da espécie *T. obliquus* mostrou ser uma boa opção para o tratamento de águas que contêm estas substâncias, pois 97/50/50% do fósforo/cobre/níquel foram removidos, respetivamente. Para além disso, esta microalga consegue remover poluentes, como o paracetamol e o ácido salicílico, com maior eficácia do que a microalga *C. vulgaris* (Escapa et al., 2017).

N. oleoabundans é uma microalga verde com uma parede celular dinâmica e rígida (Rashidi and Trindade, 2018). Devido à elevada produção de lípidos, particularmente triglicerídeos, esta microalga é considerada uma importante fonte de óleos para a produção de biodiesel (Urreta et al., 2014; Hajar et al., 2017), podendo também ser utilizada para o tratamento de águas residuais (Peng et al., 2015; AlMomani and Örmeci, 2016).

2.2. Modo de crescimento

As microalgas podem adotar diferentes metabolismos, dependendo da fonte de energia e de carbono utilizada pelas mesmas: foto-autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e foto-heterotrófico (Chen et al., 2011; Adesanya et al., 2014). O metabolismo foto-autotrófico consiste num metabolismo onde a luz é a única fonte de energia, que é convertida em energia química através de reações fotossintéticas, e o carbono inorgânico (por exemplo, CO_2 e HCO_3^-) é usado como fonte de carbono. O metabolismo heterotrófico é um metabolismo de crescimento que só usa compostos orgânicos como fontes de energia e carbono através da respiração celular. O metabolismo mixotrófico é uma variação do sistema heterotrófico, no qual os compostos orgânicos e inorgânicos são utilizados como fonte de carbono, dependendo da luz disponível e da concentração de compostos orgânicos. O metabolismo foto-heterotrófico é um metabolismo no qual a luz é necessária para o processamento dos compostos orgânicos usados como fontes de carbono (Chen et al., 2011; Mata et al., 2010; Chew et al., 2018).

Em condições heterotróficas as microalgas apresentam maior produtividade de lípidos e biomassa do que em condições foto-autotróficas (Shu and Tsai, 2016). No entanto, em condições heterotróficas podem ocorrer mais facilmente contaminações.

Outra desvantagem é o facto de o custo do substrato ser elevado. O cultivo em condições foto-autotróficas é o mais comum. Tem como vantagem poder contribuir para a mitigação das emissões de CO₂, pois as microalgas podem utilizar como fonte de carbono o CO₂ atmosférico ou o CO₂ proveniente dos gases de combustão de fábricas ou de centrais termoelétricas. No entanto, neste modo de crescimento podem obter-se baixas taxas de crescimento e baixas produtividades de lípidos, devido ao efeito sombra que ocorre nas culturas mais densas (Adesanya et al., 2014; Chew et al., 2018). O cultivo em condições mixotróficas também é benéfico para a diminuição da concentração de CO₂ na atmosfera (tal como acontece nas condições foto-autotróficas). Em comparação com as condições heterotróficas, as microalgas que crescem em condições mixotróficas têm produtividades de lípidos e biomassa maiores (Shu and Tsai, 2016; Moon et al., 2013). Para além disso, o metabolismo mixotrófico está associado a custos de energia mais baixos quando comparado com o metabolismo foto-autotrófico, devido aos baixos requisitos de intensidade luminosa (Adesanya et al., 2014). Porém, nessas condições pode ser necessário operar em condições de assepsia, uma vez que o risco de contaminação é elevado. Adicionalmente, como o meio de cultura requer uma fonte de carbono orgânico, o processo de produção de biomassa torna-se mais dispendioso (Zhan et al., 2017).

2.3. Tecnologias de cultivo

O cultivo de microalgas em condições foto-autotróficas pode ser realizado em sistemas fechados ou abertos. As secções seguintes apresentam os dois tipos de sistemas, focando nas vantagens e desvantagens de cada um (Vuppaladadiyam et al., 2018).

2.3.1. Sistemas fechados

Nos sistemas fechados, o cultivo de determinada espécie de microalgas pode ser efetuado com riscos mínimos de contaminação e os parâmetros que influenciam o crescimento (por exemplo pH, temperatura, perdas por evaporação, entre outros) são mais facilmente controlados do que nos sistemas abertos. Porém os custos de investimento e operação são elevados (Mantzorou and Ververidis, 2018). Os sistemas fechados incluem os fotobiorreatores tubular vertical, tubular horizontal, painel plano, entre outros.

Dependendo do escoamento do líquido no interior do reator, existem dois tipos de reatores tubulares verticais: coluna de borbulhamento e reator tipo *airlift*. Ambos têm um dispersor de ar na base do reator para criar bolhas de ar, de forma a aumentar a transferência de massa gás/líquido. As colunas de borbulhamento têm uma forma cilíndrica e um dispersor na zona central. Os reatores *airlift* têm duas zonas distintas, separadas por uma estrutura no centro do reator. O ar é borbulhado da zona central

(zona ascendente) para a zona iluminada exterior (zona descendente), o que faz com que o fluído percorra todo o reator (Chew et al., 2018).

Os reatores tubulares horizontais são constituídos por tubos com diâmetros pequenos, entre 10 e 60 mm, que podem estar dispostos de várias formas: horizontal, vertical, inclinado, espiral e helicoidal. Os tubos estão expostos a uma fonte de luz e o meio de cultura circula dentro destes, com a ajuda de uma bomba de ar para promover o movimento do fluido e a mistura (Gupta et al., 2015).

Os fotobiorreatores de painel plano são constituídos por dois painéis retangulares de vidro transparente ou semitransparente. Podem ser colocados verticalmente ou inclinados, de forma a receberem uma maior quantidade de luz solar. Têm um dispersor de ar na base, responsável pela geração de bolhas, que permitem melhorar a taxa de mistura, o fornecimento adequado de CO₂ e a remoção de oxigénio (O₂) (Chew et al., 2018; Vuppaladadiyam et al., 2018).

2.3.2. Sistemas abertos

Nos sistemas abertos, os custos de operação são baixos, a iluminação solar não tem custos e a construção e operação são mais simples. Porém, os riscos de contaminação e de perda de água por evaporação são elevados e estes sistemas são dependentes das condições ambientais, sendo difícil o controlo de alguns parâmetros como a intensidade luminosa fornecida, temperatura, pH, entre outros (Mantzorou and Ververidis, 2018). Os sistemas abertos incluem lagoas não agitadas, *raceway* e circulares (Vuppaladadiyam et al., 2018).

As lagoas não agitadas são construídas em sistemas de água naturais com uma profundidade aproximada de 0,5 m para garantir a permeabilidade da luz. Como o próprio nome indica, são reatores isentos de um sistema de mistura. São sistemas muito económicos e de fácil operação. Contudo, a dissolução do CO₂ do ar para a água pode limitar o crescimento das microalgas (Chew et al., 2018) .

As lagoas *raceway* são o sistema mais usado para produção comercial de microalgas em grande escala. Estes sistemas são constituídos por um único canal ou um grupo de canais fechados com uma profundidade aproximada de 15-50 cm, de forma a evitar a limitação pela luz e a diminuição da atividade fotossintética (Chew et al., 2018). Dentro dos canais, a mistura e circulação são feitas por uma roda de pás. Desta forma é possível aumentar a transferência de massa gás/líquido para o CO₂, garantir que as células se movimentam para maior acesso à luz e evitar a sua sedimentação.

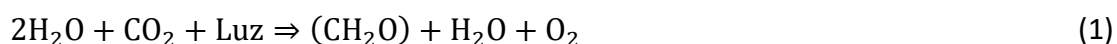
As lagoas circulares são reatores com um braço rotativo que mistura o meio de cultura e as microalgas, o que faz com que as taxas de transferência de massa e de eficiência fotossintética aumentem e a sedimentação diminua. Todavia, a temperatura é difícil de controlar e os riscos de contaminação são elevados, tal como nos restantes sistemas abertos (Meng et al., 2015).

2.4. Fatores que afetam o crescimento das microalgas

O crescimento das microalgas pode ser afetado por vários fatores. Em condições foto-autotróficas, os parâmetros mais importantes a considerar são a luz, a concentração de nutrientes, o pH e concentração de CO₂, a concentração de O₂, a temperatura e, por fim, a salinidade.

2.4.1. Luz (intensidade, fotoperíodo e comprimento de onda)

A luz é um dos fatores mais importantes para o crescimento foto-autotrófico das microalgas, pois é a fonte de energia utilizada. A fotossíntese pode ser representada pela equação química seguinte (Falkowski and Raven, 2007):



A fonte de luz (intensidade, comprimento de onda e fotoperíodo) afeta a taxa de crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos (Mohsenpour et al., 2012; Singh and Singh, 2015). De uma forma geral, quanto maior a intensidade luminosa, maior será a atividade fotossintética e, por isso, a produtividade de biomassa. Contudo, quando a luz é fornecida em excesso pode ocorrer *stress* oxidativo das células e inibição de crescimento (Gris et al., 2014).

Loera-Quezada et al. (2011) avaliaram o efeito da irradiância na densidade, tamanho e acumulação de lípidos pela microalga *N. oleoabundans*. Usaram-se três intensidades luminosas diferentes (50, 94 e 136 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A taxa de crescimento celular foi maior (1,30 d^{-1}) quando se usou a intensidade de 136 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Com o menor nível de irradiância, o valor da taxa de crescimento foi de 0,98 d^{-1} . As células com maior tamanho (12,6 μm) foram obtidas quando se usou a luz de menor intensidade e as de menor tamanho (4,04 μm) com a luz de maior intensidade. Gris et al. (2014) estudaram o efeito da intensidade da luz (10, 50, 150, 200, 350, 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no crescimento e composição bioquímica da microalga *T. obliquus* num fotobiorreator de painel plano. A temperatura durante o processo foi de 23 °C, o pH utilizado variou entre 7 e 8. A taxa de crescimento máxima (0,863 d^{-1}) foi obtida com uma intensidade de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Abaixo deste valor ocorreu a limitação do crescimento pela luz e com uma intensidade ainda maior ocorreu foto-inibição. A intensidade da luz afetou unicamente o teor dos pigmentos, sendo que os teores de lípidos e proteínas se mantiveram constantes. Vo and Tran (2014) avaliaram o efeito da intensidade da luz (50, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no crescimento da microalga *Dunaliella salina*. Os ensaios foram realizados a 25 °C. Os autores reportaram que a maior taxa de crescimento (0,36 d^{-1}) foi obtida para uma intensidade de luz de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sforza et al. (2014) avaliaram os efeitos da intensidade da luz (10, 50, 150, 200, 350, 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no cultivo da microalga *T. obliquus* num fotobiorreator plano a operar em modo descontínuo e contínuo. Os autores concluíram que a taxa de crescimento máxima (0,863 d^{-1}) foi obtida com uma

intensidade de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e que a microalga em estudo foi capaz de se adaptar a valores elevados de intensidade luminosa. Nadzir et al. (2018) analisaram o efeito combinado da temperatura (25, 29, 33, 36 e 40°C) e da intensidade da luz (4000, 10500, 17000, 23500, e 30000 lux) na produção de lípidos pela microalga *T. obliquus*, durante 14 dias. Nestes ensaios, o pH foi mantido a 8,5. A maior produtividade de biomassa ($115 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e de lípidos ($27 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$), assim como o maior teor de lípidos (23% m/m), foram obtidos à temperatura de 36°C e intensidade de luz de 23500 lux.

Mohsenpour et al. (2012) estudaram o efeito de condições de luz no crescimento da microalga *C. vulgaris*. Neste estudo, placas de acrílico luminescente de diferentes cores (violeta, verde, cor de laranja e vermelho) foram utilizadas e iluminadas por um simulador de luz solar. A intensidade de luz utilizada foi $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperatura foi 23°C . A maior taxa de crescimento ($0,13 \text{ d}^{-1}$) foi obtida com a luz cor de laranja e a maior produção de clorofila *a* (1,29% m/m) foi obtida com a luz vermelha. Atta et al. (2013) testaram o efeito de diferentes intensidades (100, 200 e $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodos luz:escuro (L:E - 12:12, 16:08 e 24:00), a 25°C , com luz LED azul no crescimento e produção de lípidos da *C. vulgaris*, tendo como controlo luz fluorescente branca. A maior taxa de crescimento ($1,26 \text{ d}^{-1}$) e maior teor de lípidos (23,5% m/m) foram obtidos com a luz azul com intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12:12, em 8 dias de cultivo. Com luz branca, a maior taxa de crescimento ($1,20 \text{ d}^{-1}$) e o maior teor de lípidos (20,9% m/m) foram obtidos com uma intensidade de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 16:08, em 10 dias de cultivo. Abiusi et al. (2014) avaliaram o crescimento, a eficiência fotossintética e a composição bioquímica da microalga *Tetraselmis suecica* usando LEDs de diferentes cores (branco neutro, azul, vermelho e verde). Neste estudo foi testada uma intensidade luminosa de $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperatura foi 25°C . A produtividade de biomassa foi semelhante entre os LEDs branco e vermelho e entre os LEDs azul e verde. Os valores mais elevados foram obtidos com os LEDs branco e vermelho. A maior taxa de crescimento ($0,12 \text{ d}^{-1}$) foi obtida com o LED vermelho, mas as células resultantes eram mais pequenas. O teor de hidratos de carbono foi maior (24% m/m) nas células que cresceram com a luz verde, sendo que o menor teor (15,1% m/m) foi obtido com a luz vermelha. O teor de lípidos foi maior (21,8 % m/m) com o uso da luz azul. A luz azul também provocou uma maior acumulação de clorofila; enquanto expostas à luz vermelha, as células apresentaram um menor teor de clorofila. Hultberg et al. (2014) analisaram o impacto da luz na produção de biomassa utilizando a microalga *C. vulgaris*. Utilizaram-se LEDs com seis comprimentos de onda diferentes: azul (460 nm), verde (525 nm), amarelo (585 nm), vermelho (620 nm), roxo (oito partes 660 nm e duas partes 460 nm) e branco (430-730 nm). A intensidade de luz utilizada foi $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a temperatura foi 20°C . Houve um maior crescimento com a utilização da luz amarela, branca e vermelha, sendo a concentração de biomassa final de 1596,7 mg L^{-1} , 1337,5 mg L^{-1} e 1263,3 mg L^{-1} , respetivamente. A maior quantidade de ácidos gordos produzidos (7,12% m/m) foi obtida com a luz roxa. Wong (2016) analisou os efeitos do comprimento de onda e ciclos de iluminação na produção de biomassa e

astaxantina utilizando a microalga *Haematococcus pluvialis*. Neste estudo foram utilizadas luzes LED de cor vermelha e azul e uma lâmpada plasma branca. A temperatura durante o estudo foi de 25 °C e a intensidade da luz foi 40,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No estudo compararam-se os períodos L:E 24:00 e 12:12. Relativamente aos resultados, verificou-se que houve uma maior taxa de crescimento utilizando fotoperíodo de 24:00 com a luz branca (0,365 d^{-1}), seguida pela luz vermelha (0,336 d^{-1}) e por fim a luz azul (0,291 d^{-1}). Torres-Carvajal et al. (2017) estudaram o efeito do comprimento de onda da luz na produção de biomassa da microalga *H. pluvialis*. Neste estudo foram utilizadas luzes fluorescentes de cores branca (referência), vermelha e azul, com fotoperíodo L:E de 12:12 e com uma temperatura de 24 °C. A taxa de crescimento foi máxima nas culturas realizadas com a luz vermelha (0,811 d^{-1}), seguida das culturas com luz azul (0,341 d^{-1}) e por fim as culturas com luz branca (0,301 d^{-1}).

2.4.2. Concentração de nutrientes

A produção de microalgas necessita de macronutrientes, como o azoto, o fósforo e o carbono, e de micronutrientes, como o ferro, magnésio, sódio, potássio, entre outros (Fox and Zimba, 2018). A razão molar N:P é um parâmetro importante para o crescimento das microalgas, sendo que o valor ótimo varia conforme a espécie de microalga. A razão Redfield foi estabelecida como 106:16:1 (C:N:P) e consiste numa razão estequiométrica da composição interna da maioria das células de microalgas marinhas. Consequentemente, de forma a acelerar o crescimento das microalgas, o meio de cultura deverá ter estas proporções de carbono, azoto e fósforo. Por outro lado, as microalgas de água doce apresentam uma maior taxa de crescimento usando uma razão molar N:P entre 8:1 e 45:1 (Whitton et al., 2016).

As microalgas crescem ao assimilar nutrientes como azoto, que usam para sintetizar proteínas, e fósforo, que é incorporado no ácido ribonucleico e utilizado para a síntese de energia nas células (Whitton et al., 2016). Quando o meio das microalgas tem deficiência de nutrientes como o azoto, fósforo e enxofre, a taxa fotossintética é afetada, fazendo com que a produção dos compostos intracelulares seja diferente (Danesh et al., 2017). Para maximizar a produção de determinados compostos, como lípidos, por exemplo, é comum submeter as microalgas a meios com deficiências nutricionais, pois nestas condições as microalgas continuam a assimilar carbono, acumulando-o sob a forma de lípidos. Contudo, nestas condições há uma diminuição da taxa de crescimento (Srinuanpan et al., 2018; Chen et al., 2017). Em meios com elevada concentração de nutrientes, as microalgas também conseguem acumular nutrientes em excesso. Diferentes concentrações de nutrientes no meio de cultura influenciam a composição da biomassa produzida (Whitton et al., 2016; Danesh et al., 2017).

Srinuanpan et al. (2018) estudaram o efeito de meios com deficiência de nutrientes no potencial de utilização de microalgas oleaginosas (*T. obliquus* e *Micractinium reisseri*) para produzir biodiesel. Utilizaram quatro meios diferentes: (i) sem azoto; (ii) sem fósforo; (iii) sem ferro; e (iv) o meio de controlo. Concluíram que

apesar de o crescimento celular ter sido menor no meio sem azoto, a produção de lípidos foi superior (56,87 e 36,72% m/m para *T. obliquus* e *M. reisseri*, respetivamente). Em condições de deficiência de azoto, os lípidos produzidos têm maior quantidade de ácidos gordos saturados, sendo adequados para a produção de biodiesel. A produção de lípidos também aumentou nos meios sem fósforo (40,28 e 30,45% m/m para *T. obliquus* e *M. reisseri*, respetivamente) e sem ferro (39,75 e 29,60% para *T. obliquus* e *M. reisseri*, respetivamente), mas nestas condições o crescimento celular não foi afetado. No meio utilizado como controlo, os teores de lípidos obtidos foram 35,54% e 20-25% para *T. obliquus* e *M. reisseri*, respetivamente. Danesh et al. (2017) avaliaram a produção de compostos bioquímicos de microalgas inseridas em meios deficitários de nutrientes. As microalgas foram cultivadas em três condições de deficiência de nutrientes: um meio sem azoto, outro sem enxofre e, por fim, um meio sem fósforo. Em meios sem enxofre e sem fósforo, as microalgas produziram uma menor quantidade de clorofila e proteínas. Em meios sem azoto a divisão celular foi muito menor do que nos outros ensaios, mas a produção de lípidos foi maior.

2.4.3. pH e concentração de CO₂

O pH e a concentração de CO₂ são fatores que estão relacionados, na medida em que o CO₂ consumido pelas microalgas faz com que o pH no meio de cultura aumente. Este fenómeno pode ser explicado pela Figura 1 e pelas seguintes reações de equilíbrio (Kirchman, 2018):

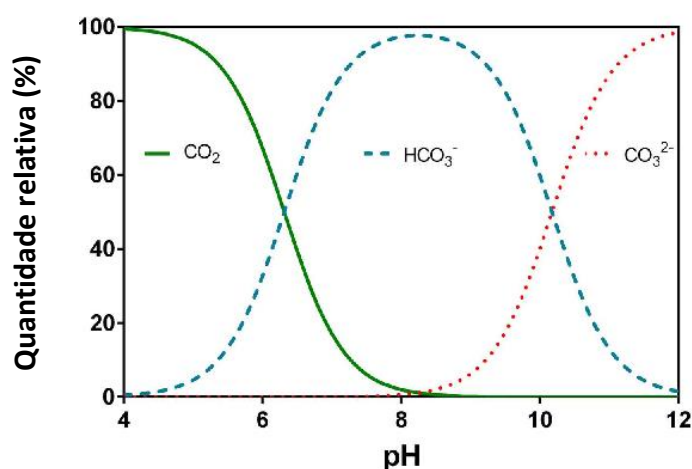
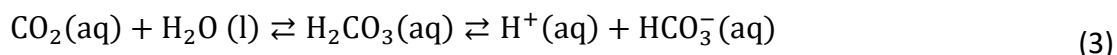


Figura 1 – Diagrama de especiação relativa (%) de dióxido de carbono (CO₂), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) na água como função do pH (Adaptado de Pedersen et al. (2013)). No exemplo apresentado a temperatura é 20 °C e a condutividade elétrica 250 μS cm⁻¹.

O CO_2 é dissolvido e reage com a água, formando ácido carbónico (H_2CO_3). Seguidamente, este ácido ioniza-se em iões bicarbonato (HCO_3^-) e protões (H^+) e, por sua vez, o bicarbonato também se ioniza em carbonato (CO_3^{2-}) e protões (H^+). Assim sendo, quando o CO_2 e/ou HCO_3^- são consumidos pelas microalgas, o equilíbrio desloca-se no sentido da sua formação, reduzindo a concentração de protões H^+ presentes no meio de cultura e, por conseguinte, este fica mais alcalino. Para que o pH não aumente de forma excessiva, pode-se acrescentar CO_2 à cultura. O pH influencia a acumulação de lípidos, o crescimento das microalgas e a possível contaminação com espécies não desejadas (Bartley et al., 2014).

A presença de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ influencia o crescimento das microalgas também porque é a fonte de carbono necessária para a fotossíntese (Falkowski and Raven, 2007). No entanto, se a sua concentração for demasiado elevada, o pH do meio diminui significativamente, inibindo o crescimento das microalgas (Kirchman, 2018). Hodaifa et al. (2009) avaliaram a influência do pH (gama de 5 a 9) no crescimento da microalga *T. obliquus* numa água residual. A taxa de crescimento mais elevada foi obtida quando o pH apresentava o valor de 7. Bartley et al. (2014) estudaram o efeito do pH (gama de 5 a 10) na presença de organismos invasores, no crescimento e na acumulação de lípidos da microalga *Nannochloropsis salina*. A gama de pH entre 8 e 9 corresponde ao valor de pH onde a taxa de crescimento foi maior ($0,19 \text{ d}^{-1}$) e a presença de organismos invasores foi menor. Gonçalves et al. (2016b) estudaram o efeito do aumento da concentração de CO_2 (0,04, 3, 5, 7, 9 e 10% v/v) no crescimento e produção de biomassa das microalgas *C. vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechocystis salina* e *Microcystis aeruginosa*. A concentração ótima de CO_2 obtida para as quatro microalgas foi de aproximadamente 5% (v/v).

2.4.4. Concentração de O_2

Como as microalgas são organismos fotossintéticos, estas produzem O_2 . Logo, com o aumento da atividade fotossintética, O_2 acumula-se no meio de cultura, aumentando a sua concentração. Elevadas concentrações de oxigénio dissolvido afetam a taxa de fotorrespiração, aumentando-a. Ao mesmo tempo, elevadas concentrações de O_2 podem causar inibição do crescimento das microalgas, pois com o aumento da concentração de O_2 e com a presença de luz pode ocorrer a acumulação de espécies reativas de oxigénio, que inibem a fotossíntese, provocam danos nas moléculas biológicas e stress oxidativo das células, podendo mesmo levar à morte celular (Kazbar et al., 2019; Sun et al., 2018). Para evitar um aumento excessivo da concentração de O_2 , é importante que os sistemas de cultivo possibilitem a libertação deste gás para a atmosfera.

Raso et al. (2012) estudaram o efeito da concentração de O_2 no crescimento da microalga *Nannochloropsis* sp., variando as concentrações de oxigénio na corrente gasosa entre 20 e 50% (v/v). Estes ensaios foram desenvolvidos num fotobiorreator de painel plano, a pH de 7,8, temperatura de 25°C e intensidade de luz de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para

os ensaios realizados com 20% (v/v) de O₂, obteve-se uma taxa de crescimento de 0,48 d⁻¹. Por outro lado, com o aumento da percentagem de O₂ na corrente gasosa, houve uma diminuição significativa da taxa de crescimento (de 0,48 para 0,18 d⁻¹). Kazbar et al. (2019) avaliaram o efeito da concentração de O₂ dissolvido no crescimento da microalga *C. vulgaris*, concluindo que para valores superiores a 30 mg L⁻¹ (3,75 vezes superior à concentração de saturação do oxigénio na fase líquida – 8,74 mg L⁻¹), a produtividade de biomassa diminuiu em 30%.

2.4.5. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que influencia o crescimento celular. No geral, as microalgas desenvolvem-se numa gama de temperaturas entre 15 e 35 °C, sendo que a nível de espécies este valor varia. Temperaturas superiores ao valor ótimo podem causar a degradação proteica, levando à morte celular. Uma redução na atividade metabólica é observada para temperaturas inferiores à gama ótima, com influência significativa no crescimento e produtividade de biomassa (Serra-Maia et al., 2016).

Gonçalves et al. (2016a) estudaram o efeito da luz e da temperatura no crescimento de quatro espécies microalgas (*C. vulgaris*, *P. subcapitata*, *S. salina* e *M. aeruginosa*) e consequente remoção de nutrientes, tendo determinado que as condições de temperatura ótimas para o crescimento destas microalgas é 25 °C. No estudo desenvolvido por Chokshi et al. (2015), a microalga *Acutodesmus dimorphus* (cultivada com uma intensidade de luz de 60 μmol m⁻² s⁻¹ e o fotoperíodo L:E de 12:12) teve uma taxa de crescimento maior a 35 °C, sendo menor para as temperaturas de 25 e 38 °C. Porém, a maior concentração de lípidos foi obtida a 38 °C.

2.4.6. Salinidade

A salinidade é um parâmetro que influencia as microalgas, sendo que cada espécie tem o seu valor ótimo. O efeito da salinidade nas microalgas tem sido estudado principalmente em microalgas marinhas. A salinidade pode ser utilizada para causar *stress* nas microalgas, com o objetivo de produzir maior quantidade de lípidos (Pancha et al., 2015; Zhang et al., 2018; Chen et al., 2017), havendo já alguns estudos a comprovar esse facto para as microalgas *Chlamydomonas* sp. JSC4 (Ho et al., 2017) e *Chlorella sorokiniana* HS1 (Kim et al., 2016), por exemplo. O *stress* causado pela salinidade provoca alterações fisiológicas e na composição bioquímica das microalgas (BenMoussa-Dahmen et al., 2016). Pandit et al. (2017) avaliaram o efeito do *stress* salino (concentrações de NaCl de 0,06, 0,08, 0,1, 0,3 e 0,4 M) no crescimento e produção de lípidos em duas microalgas, *Acutodesmus obliquus* e *C. vulgaris*. Neste estudo a temperatura foi 25 °C, o pH de 7,4, o período L:E de 16:08 e a intensidade de luz de 4000 lux. Ambas as espécies apresentaram uma taxa de crescimento maior no meio com concentração de NaCl de 0,06 M do que nas condições de controlo (sem adição de NaCl). O maior teor de lípidos foi 49% (m/m) para a microalga *C. vulgaris* e 43% (m/m) para a

microalga *A. obliquus*, valores obtidos no meio de cultura com concentração de NaCl de 0,4 M. Ji et al. (2018) analisaram o efeito do *stress* salino (utilizando concentrações de NaCl de 0, 0,01, 0,10, 0,15, 0,20 M) na eficiência fotossintética e na produção de lípidos pela microalga de água doce *T. obliquus*. Neste estudo a microalga foi cultivada à temperatura de 25 °C, intensidade luminosa de 4800 lux e fotoperíodo L:E de 14:10. Os autores concluíram que com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura, a produtividade de biomassa e os teores de clorofila *a* e *b* e carotenoides diminuíram. Já o teor de lípidos foi máximo (32% m/m) no meio com maior salinidade (0,20 M de NaCl). Vo and Tran (2014) estudaram o efeito da salinidade (concentrações de NaCl de 1, 1,5 e 2 M) no crescimento da microalga *D. salina* a 25 °C, tendo obtido maiores valores de taxa de crescimento para as concentrações de NaCl superiores (1,5 e 2 M).

2.5. Aplicações das microalgas

As microalgas são consideradas microrganismos com elevado potencial comercial e económico, pois têm aplicações em vários setores como farmacêutico, cosmético, alimentar e aquacultura. Podem ser utilizadas como uma fonte de biocombustíveis, pigmentos, antioxidantes e proteínas ou para o tratamento de águas residuais e captura de CO₂ (Buono et al., 2016; Borowitzka, 2013).

Biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de biomassa (Saladini et al., 2016). Os biocombustíveis possíveis de se produzir a partir das microalgas são o biodiesel, o biometano e o bioetanol (Simas-Rodrigues et al., 2015; Barata, 2016). O biodiesel é produzido através dos lípidos presentes nas microalgas. Os lípidos são extraídos da biomassa através de um solvente de extração e, seguidamente, são convertidos em biodiesel por uma reação de transesterificação. O tipo de lípido maioritariamente usado para a produção de biodiesel são os triglicerídeos pois têm elevado teor de ácidos gordos (Goh et al., 2019; Barata, 2016). As microalgas podem também ser consideradas uma fonte de biomassa para a produção de bioetanol, devido aos seus elevados teores de hidratos de carbono. O bioetanol pode ser obtido através da fermentação da biomassa produzida pelas microalgas e pode ser adicionado nos combustíveis como aditivo (Simas-Rodrigues et al., 2015). Através da digestão anaeróbia de resíduos de biomassa pode-se ainda produzir o biometano (também designado por biogás) que, por sua vez, pode ser utilizado na produção de eletricidade. É possível combinar este processo com a produção de biodiesel pois após extração dos lípidos, os resíduos de biomassa podem ser utilizados para a produção de biometano (Saratale et al., 2018).

Para além da produção de biocombustíveis através das microalgas, é também possível aproveitar outras substâncias químicas com interesse económico e comercial geradas através da produção de biomassa. Os vários produtos e subprodutos que se podem obter da biomassa de microalgas são apresentados na Figura 2.

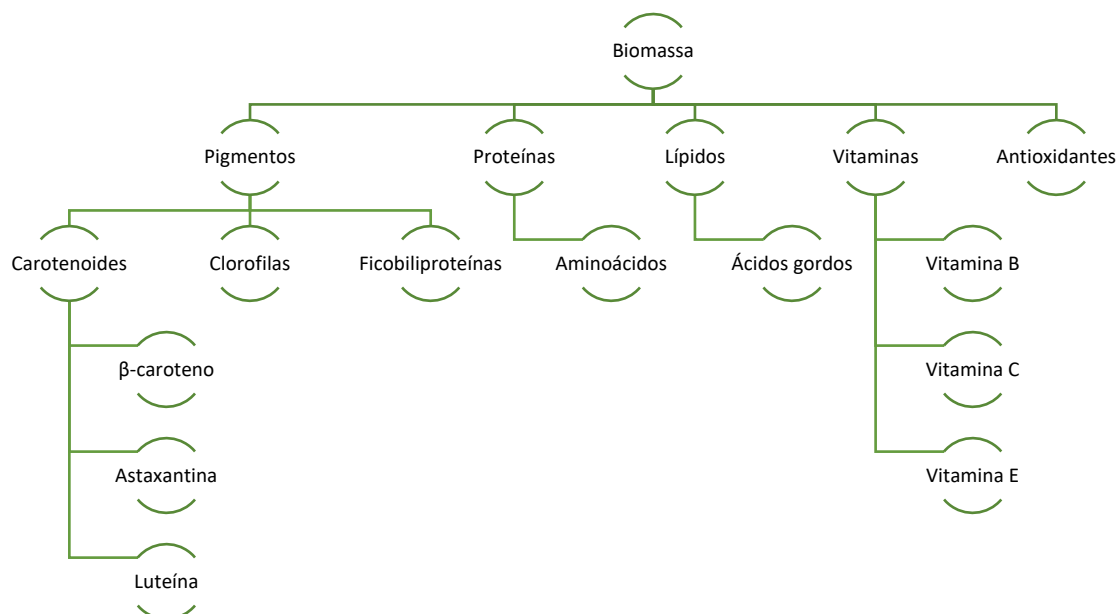


Figura 2 – Subprodutos obtidos da biomassa de microalgas.

A biomassa das microalgas é utilizada como alimento na Ásia e no norte da América, especialmente pelos povos mais antigos. Visto que a maioria das espécies de microalgas tem um teor de proteínas acima dos 50% (m/m), estas foram consideradas um suplemento proteico com benefícios nutricionais para os seres humanos (Jacob-Lopes et al., 2018). Quando as microalgas são cultivadas em condições de *stress*, também são capazes de acumular outras substâncias com valor acrescentado, tais como os pigmentos. Os carotenoides são um exemplo desses pigmentos, sendo os mais importantes a astaxantina, o β -caroteno e a luteína (Panis and Carreon, 2016; Hu et al., 2018). Astaxantina é usada na aquacultura para colorir os músculos dos peixes e é considerada um dos antioxidantes mais fortes da natureza, com propriedades anti-inflamatórias e com capacidade de proteção contra o *stress* oxidativo (Mobin and Alam, 2017; Panis and Carreon, 2016). Para além disso, a astaxantina é considerada um alimento com elevada densidade nutricional e com benefícios para a saúde, sendo capaz de aumentar a estamina e reduzir o tempo de recuperação muscular, levando a uma melhoria no desempenho dos atletas (Capelli et al., 2013). Nos seres humanos, o β -caroteno é convertido em vitamina A, que permite que o sistema imunitário funcione de forma eficiente. β -caroteno é também um corante alimentar e tem funções de prevenção contra a fibrose hepática (Mobin and Alam, 2017; Sathasivam et al., 2017). A luteína tem propriedades protetoras contra a degeneração macular do olho e, como os humanos não conseguem sintetizar esta substância, é considerada importante (Hu et al., 2018). As ficobiliproteínas são proteínas fotossintéticas suplementares, também incluídas na categoria dos pigmentos. As principais aplicações desta substância são na indústria alimentar, como corante natural, e na indústria farmacêutica (Manirafasha et al., 2016; Chew et al., 2017). As microalgas são também consideradas uma fonte de vitaminas B, C e E (Khan et al., 2018). Podem, por isso, ser utilizadas como aditivo alimentar, por exemplo em pães, biscoitos, doces e gelados, para melhorar os seus

valores nutricionais (Mobin and Alam, 2017). Para além de todas as aplicações referidas acima, as microalgas podem ser usadas pela indústria dos cosméticos, onde os extratos das microalgas são utilizados em cremes regeneradores para a face, loções corporais, protetores solares e shampôs (Mobin and Alam, 2017; Varfolomeev and Wasserman, 2011).

Outra aplicação importante das microalgas é a captura de CO_2 da atmosfera e de gases de combustão, visto que estas são organismos fotossintéticos que conseguem transformar CO_2 e água em matéria orgânica (produção dos subprodutos mencionados acima) e libertar oxigénio para a atmosfera (Klinthong et al., 2015). A capacidade das microalgas em fixar CO_2 é 10 a 50 vezes maior do que a capacidade das plantas terrestres, sendo que em cada quilograma de biomassa de microalgas produzida, aproximadamente 1,83 kg de CO_2 são fixados (Cheah et al., 2015; Jiang et al., 2013). As microalgas têm a capacidade de capturar o CO_2 atmosférico, o CO_2 proveniente da indústria (gases de combustão) e CO_2 na forma de carbonatos solúveis (Wang et al., 2008). A assimilação de CO_2 depende das características da espécie de microalga (uma vez que cada microalga tem diferentes tolerâncias à concentração de CO_2), do sistema de cultivo, da concentração de CO_2 utilizada, de condições operacionais e de fatores ambientais (Cheah et al., 2015). Quando a biomassa produzida é utilizada para a produção de biocombustíveis, é possível criar um ciclo de carbono sustentável (Figura 3), pois o CO_2 emitido na queima dos biocombustíveis é capturado novamente pelas microalgas para o seu crescimento que, por sua vez, vão produzir mais biomassa para posteriormente ser utilizada para a produção de biocombustíveis (Lam et al., 2012). De forma a ser um processo economicamente viável e sustentável ambientalmente, o processo de captura de CO_2 pode ser combinado com o tratamento de águas residuais: as microalgas obteriam nutrientes (azoto e fósforo) do efluente e a fonte de carbono seria o CO_2 (Wang et al., 2008). Jiang et al. (2013) utilizaram um gás de combustão simulado e testaram os efeitos de diferentes concentrações de CO_2 (2 a 20% v/v) no

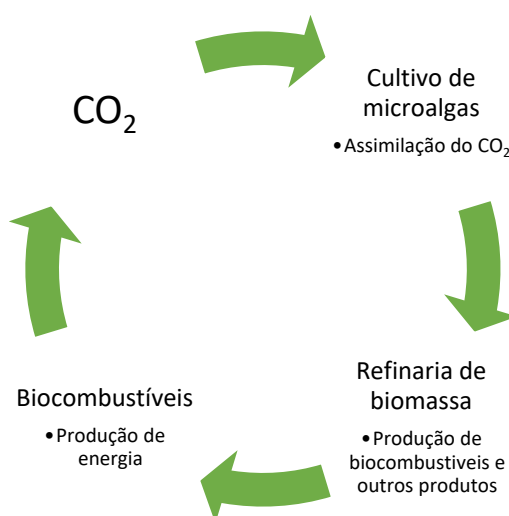


Figura 3 – Ciclo de carbono durante o cultivo de microalgas e produção de biocombustíveis.

cultivo da microalga *Scenedesmus dimorphus*. A microalga atingiu a concentração de 4,51 e 3,82 g L⁻¹ quando a concentração utilizada foi 10 e 20% (v/v) de CO₂, respetivamente. Porém o valor máximo de concentração de biomassa (5,17 g L⁻¹) foi obtido com 2% (v/v) CO₂. Este estudo mostrou que a espécie em estudo tem uma tolerância elevada a concentrações de CO₂, pois cresceu na presença de elevadas concentrações (10 e 20% v/v de CO₂), mas a sua atividade fotossintética é máxima para concentrações mais baixas (2% v/v CO₂).

Por último, as microalgas podem ser utilizadas para tratar efluentes através do processo de biorremediação, visto que conseguem capturar espécies de azoto e fósforo e também metais pesados (Hodaifa et al., 2013). O tratamento de águas residuais é composto por quatro fases: o tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar tem como objetivo remover os sólidos grosseiros, óleos e gorduras. No tratamento primário, os sólidos suspensos são removidos através de processos físicos como a sedimentação ou flotação. O tratamento secundário é utilizado para remover a matéria orgânica dissolvida com recurso a processos biológicos. Por fim, o tratamento terciário tem como objetivos (Gonçalves et al., 2017; Rawat et al., 2011): (i) remover os nutrientes em excesso (nomeadamente azoto e fósforo) do efluente, através de digestão anaeróbia e nitrificação e desnitrificação; e (ii) remover os agentes patogénicos, através de desinfecção. Tendo em conta os passos convencionais do tratamento de efluentes, bem como os requisitos nutricionais das microalgas em termos de azoto e fósforo, estas podem desempenhar um papel relevante no tratamento terciário. Hernández-García et al. (2019) avaliaram a remoção de nutrientes de uma água residual real durante 28 dias. As microalgas utilizadas neste estudo foram *T. obliquus* e *Desmodesmus* spp.. A microalga *T. obliquus* teve uma taxa de remoção de ortofosfatos de 60%, de carbono de 86% e de azoto total de 90%. Por outro lado, a microalga *Desmodesmus* spp. obteve eficiências de remoção de ortofosfatos, carência química de oxigénio (CQO) e azoto total de 57, 86 e 94%, respetivamente. Huo et al. (2019) avaliaram a eficiência da microalga *Tribonema* sp. no tratamento de águas residuais petroquímicas. A cultura da microalga *Tribonema* sp. foi feita diretamente num fotobiorreator utilizando um efluente proveniente do digestor anaeróbio. As taxas de remoção de CQO, de azoto total e a concentração final de biomassa foram respetivamente, 98,4%, 96,8% e 4,4 g L⁻¹. A utilização de águas residuais no cultivo de microalgas tem vantagens económicas e ambientais. Sob o ponto de vista económico, verifica-se que os custos de produção podem ser reduzidos significativamente, uma vez que os custos associados à aquisição dos nutrientes podem ser eliminados. A nível ambiental, a utilização de águas residuais permite reduzir o consumo de água doce no cultivo das microalgas. Além disso, as microalgas podem contribuir para a biorremediação destes efluentes, através da redução de nutrientes em excesso.

3. Materiais e métodos

3.1. Meio de cultura e microalgas

Neste estudo, as três espécies diferentes de microalgas verdes que foram testadas foram obtidas da *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP, Reino Unido) e da *University of Texas Culture Collection of Algae* (UTEX, EUA): *C. vulgaris* CCAP 211/11B, *T. obliquus* CCAP 276/34 e *N. oleoabundans* UTEX 1185. A seleção destas espécies teve em conta os seguintes fatores (Safi et al., 2014; Urreta et al., 2014; Hajar et al., 2017): (i) a *C. vulgaris* é capaz de crescer em diversas condições ambientais, sendo utilizada em várias áreas da indústria; (ii) a *T. obliquus* é amplamente utilizada no tratamento de efluentes; e (iii) a *N. oleoabundans* pode ser usada para a produção de biodiesel. As microalgas foram inoculadas em meio de cultura teste da OCDE modificado com a seguinte composição (por litro): 250 mg NaNO₃; 12 mg MgCl₂·6H₂O; 18 mg CaCl₂·2H₂O; 15 mg MgSO₄·7H₂O; 45 mg KH₂PO₄; 0,08 mg FeCl₃·6H₂O; 0,1 mg Na₂EDTA·2H₂O; 0,185 mg H₃BO₃; 0,415 mg MnCl₂·4H₂O; 3 µg ZnCl₂; 1,5 µg CoCl₂·6H₂O; 0,01 µg CuCl₂·2H₂O; 7 µg Na₂MoO₄·2H₂O; e 50 mg NaHCO₃. Relativamente à receita original, foram aumentadas as concentrações de NaNO₃ e KH₂PO₄, por forma a que estas concentrações se assemelhassem às concentrações de azoto sob a forma de nitrato (N-NO₃) e fósforo sob a forma de fosfato (P-PO₄) tipicamente encontradas em diferentes águas residuais (Goncalves et al., 2017) e de forma a manter razões molares e mássicas de N:P adequadas ao crescimento das microalgas (9:1 e 4:1, respetivamente)

As soluções *stock* de microalgas foram preparadas em matrizes de 100 mL (volume operacional de 50 mL) utilizando o meio de cultura acima referido, em condições assépticas. Os matrizes foram mantidos numa incubadora (Lovibond®, Reino Unido) à temperatura constante de 25 °C, com fornecimento de luz contínuo, a uma intensidade de aproximadamente 6,50 µmol m⁻² s⁻¹. A agitação dos inóculos foi promovida recorrendo a um agitador orbital (Unimax 1010, Heidolph, Alemanha) regulado para uma agitação de 100 rpm (rotações por minuto).

3.2. Instalação experimental

Neste estudo foram avaliados os efeitos do comprimento de onda da luz e do modo de operação em semi-contínuo na produção das microalgas referidas na Secção 3.1 e respetiva remoção de nutrientes do meio de cultura. Estes ensaios foram realizados em duplicado em frascos de borossilicato com um volume operacional de 900 mL, sem recurso a condições assépticas. Estes decorreram numa instalação com uma fonte luminosa composta por um painel LED com comprimento de onda regulável. A superfície onde as culturas se encontravam estava a uma distância de 49,0 cm da fonte luminosa. De forma a manter a temperatura das culturas entre 20 e 22 °C, nos dias mais

frios, esta foi controlada através de fitas de aquecimento (Heating tapes 265 W, J. P. Selecta, Espanha) e monitorizada diariamente (ver Anexo A.1). A agitação das culturas foi promovida através da injeção de ar atmosférico a um caudal de 1.5 L min⁻¹, recorrendo a bombas de ar (Trixie AP 180, Tarp, Alemanha). O ar injetado nas culturas era previamente filtrado através de filtros de membrana de acetato de celulose (0,22 µm). De forma a controlar a perda de água por evaporação, foi efetuada diariamente uma marcação do nível superficial, que era restituído no dia seguinte. A Tabela 1 apresenta um resumo das principais condições utilizadas nos ensaios de avaliação do efeito do comprimento de onda e do modo de operação em semi-contínuo.

3.2.1. Avaliação do efeito do comprimento de onda

Os ensaios de avaliação do efeito do comprimento de onda no crescimento das microalgas em estudo e na remoção de nutrientes foram realizados na instalação experimental descrita anteriormente (ver Figura 4), em modo descontínuo, por um período de 12 dias. As culturas começaram com uma concentração inicial de: (i) 54±4 mg L⁻¹ para a *C. vulgaris*; (ii) 33,1±0,4 mg L⁻¹ para a *T. obliquus*; e (iii) 18±1 mg L⁻¹ para a *N. oleoabundans*. As concentrações iniciais em cada ensaio e a sua duração estão apresentadas na Tabela 1. As cores/comprimentos de onda (λ) testados nestes ensaios foram as seguintes: (i) branco (B, 380-750 nm); (ii) vermelho (V, 620-750 nm); e (iii) azul (A, 450-495 nm). A luz foi fornecida continuamente (fotoperíodo L:E=24:00), com valores de intensidade luminosa variáveis, de acordo com o comprimento de onda utilizado (ver Tabela 2). A intensidade luminosa foi medida ao nível da superfície líquida utilizando um radiómetro (HD 2102.2, Delta OHM, Itália).

Tabela 1 – Condições utilizadas nos diferentes ensaios

Modo de operação	Comprimento de onda (nm)	Espécies	Concentração inicial de biomassa (mg L ⁻¹)	Duração (d)
Descontínuo	380-750 (B)	<i>C. vulgaris</i>	50,9	12
		<i>T. obliquus</i>	33,0	
		<i>N. oleoabundans</i>	17,6	
	620-750 (V)	<i>C. vulgaris</i>	53,6	12
		<i>T. obliquus</i>	32,7	
		<i>N. oleoabundans</i>	19,4	
	450-495 (A)	<i>C. vulgaris</i>	58,3	12
		<i>T. obliquus</i>	33,5	
		<i>N. oleoabundans</i>	17,0	
Semi-contínuo	380-750 (B)	<i>C. vulgaris</i>	52,4	39
		<i>T. obliquus</i>	32,5	32



Figura 4 – Instalação experimental usada para o crescimento das microalgas com LEDs de diferentes cores: A. LED branco (380-750 nm); B. LED vermelho (620-750 nm); C. LED azul (450-495 nm).

Tabela 2 – Intensidade luminosa média ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada nos ensaios de crescimento em descontínuo para cada espécie e comprimento de onda

Espécie	λ (nm)	Intensidade luminosa média ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
<i>C. vulgaris</i>	380-750 (B)	30 ± 1
	620-750 (V)	$8,0 \pm 0,2$
	450-495 (A)	$6,1 \pm 0,1$
<i>T. obliquus</i>	380-750 (B)	38 ± 1
	620-750 (V)	$9,3 \pm 0,4$
	450-495 (A)	$6,7 \pm 0,5$
<i>N. oleoabundans</i>	380-750 (B)	34 ± 4
	620-750 (V)	8 ± 1
	450-495 (A)	$6,4 \pm 0,9$

3.2.2. Avaliação do efeito do modo de operação em semi-contínuo

Devido às maiores produtividades de biomassa e taxas de consumo de nutrientes obtidas utilizando luz branca, foi avaliado o crescimento das espécies *C. vulgaris* e *T. obliquus* nestas condições de luz, em modo semi-contínuo. Estes ensaios foram realizados na mesma instalação experimental, com fornecimento de luz contínuo (comprimento de onda de 380-750 nm, intensidade de $31,8 \pm 0,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o caso da *C. vulgaris* e $34,5 \pm 0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no ensaio da *T. obliquus*). Os ensaios com a microalga *C. vulgaris* decorreram durante 39 d, enquanto os ensaios com a microalga *T. obliquus* tiveram uma duração de 32 d. As culturas iniciaram com uma concentração de 52,4 e 32,5 mg L^{-1} para a *C. vulgaris* e *T. obliquus*, respetivamente. Após 14 d de crescimento (estado estacionário), um volume de 50% da cultura foi removido, tendo sido substituído por meio fresco. Seguiu-se mais uma etapa de crescimento até à fase estacionária, com nova diluição de 50% (no dia 28) e crescimento até ao tempo final do ensaio. No total completaram-se 3 ciclos/fases de crescimento para a *C. vulgaris* e 2 ciclos para a *T. obliquus*, uma vez que após a segunda diluição esta microalga diminuiu consideravelmente a sua concentração.

3.3. Métodos analíticos

Diariamente foram efetuadas medições de temperatura e pH através de um medidor de pH (SympHony SB90M5, VWR). O crescimento das culturas de microalgas, também monitorizado diariamente, foi avaliado pela medição da densidade ótica a 680 nm, DO_{680} , com recurso a um espectrofotómetro (UV-6300PC Double Beam Spectrophotometer, VWR, Portugal). A seleção deste comprimento de onda para a monitorização do crescimento foi feita com base no pico de absorvância máximo observado a este comprimento de onda, aquando da realização do varrimento de absorvância para cada uma das espécies. Posteriormente, a concentração de biomassa foi obtida indiretamente a partir de retas de calibração (previamente determinadas) que relacionam a concentração de biomassa em termos de peso seco com a DO_{680} (ver Anexo A.2).

Nos dias 0, 1, 2, 4, 7, 9 e 11 de cada ensaio em descontínuo e nos mesmos dias de cada ciclo do ensaio em semi-contínuo foram recolhidas amostras para análise dos nutrientes presentes no meio de cultura. As amostras foram centrifugadas (Himac CT6E Centrifuge, VWR, Portugal) a uma velocidade de 4000 rpm durante 10 min e posteriormente filtradas com filtros de seringa com membrana de nylon de 0,45 μ m (Specanalitica). As concentrações de nutrientes nas amostras filtradas foram analisadas por cromatografia iónica (ICS-2100, Dionex). Neste caso, apenas foram analisados os aniões (Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- e NO_2^-), com recurso a uma coluna AS9-HC e ao supressor ASRS®300. Os resultados obtidos através do cromatógrafo ficaram registados num programa informático *Chromeleon*®, que faz a aquisição e conversão de dados de forma simplificada, convertendo o sinal obtido em valores de concentração através de retas de calibração pré-estabelecidas para cada anião (ver Anexo A.3).

A biomassa resultante de cada ensaio realizado em descontínuo e de cada ciclo de crescimento em modo semi-contínuo foi analisada em termos do teor de açúcares totais utilizando um método colorimétrico. Para isso, centrifugou-se 200 mL de amostra de cada espécie (em duplicado) e efetuou-se a lavagem das células com água destilada duas vezes. Após este processo, a biomassa foi seca a 70 °C durante 48 h. Posteriormente, a biomassa foi submetida a um tratamento mecânico de maceração (utilizando um almofariz), até obtenção de um pó fino, que foi pesado (0,01 g) e transferido para tubos de ensaio para o processo de hidrólise ácida, de acordo com o método descrito por Hoebler et al. (1989), com algumas modificações. Este processo consistiu na adição de ácido sulfúrico a 95% (v/v), e posterior hidrólise durante 1 h, num banho termostático à temperatura de 30 °C. Após a hidrólise, foi adicionada água ultrapura (Millipore) de forma a obter uma concentração de ácido sulfúrico de 4% (v/v), e a solução resultante foi filtrada utilizando filtros de seringa de politetrafluoretileno (PTFE, 0,45 μ m). Por fim, foi feita a quantificação dos açúcares totais através do método colorimétrico que envolve a reação de fenol com ácido sulfúrico, proposto por Dubois et al. (1956). Resumidamente, o método consiste na desidratação dos açúcares

presentes na amostra em meio ácido que, quando em contacto com o fenol, estabelecem ligações, resultando numa solução de cor alaranjada que pode ser detetada através da medição da absorvância a 490 nm. A concentração de açúcares totais foi determinada com base na reta de calibração obtida para padrões de glicose com diferentes concentrações (10-100 mg L⁻¹) submetidos ao mesmo tratamento com ácido sulfúrico e fenol que as amostras (ver Anexo A.4).

3.4. Parâmetros cinéticos de crescimento e remoção de nutrientes

A partir dos dados recolhidos durante os ensaios determinou-se a taxa específica de crescimento (μ , em d⁻¹) para cada ensaio através de uma cinética de 1ª ordem (Equação 5):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Leftrightarrow \mu = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0} \quad (5)$$

onde X_1 e X_0 representam a concentração de biomassa (g L⁻¹) no instante final (t_1) e no instante inicial (t_0) da fase exponencial de crescimento. Com os dados recolhidos foi possível fazer uma representação gráfica de $\ln(X)$ em função do tempo (t , em d), de forma a seleccionar o grupo de pontos representativos da fase de crescimento exponencial e assim determinar a taxa específica de crescimento (correspondente ao declive da reta nessa mesma fase) (ver Anexo A.5).

Com os valores de concentração de biomassa, foram também calculadas a produtividade (P_x , mg L⁻¹ d⁻¹) entre duas amostras consecutivas (X_z e X_{z+1} , ver Equação 6), a produtividade máxima ($P_{x,max}$), que consiste no valor mais elevado do conjunto de valores de P_x , e a produtividade média ($P_{x,med}$), calculada através da Equação 7, onde X_f corresponde à concentração de biomassa no final do ensaio (mg L⁻¹), t_f o tempo final do ensaio (d) e X_i corresponde à concentração de biomassa inicial (mg L⁻¹):

$$P_x = \frac{X_{z+1} - X_z}{t_{z+1} - t_z} \quad (6)$$

$$P_{x,med} = \frac{X_f - X_i}{t_f} \quad (7)$$

De forma a ser possível avaliar o desempenho das microalgas em estudo na remoção de nutrientes, determinou-se a eficiência de remoção (ER , %) e a taxa de remoção média (TR , mg L⁻¹ d⁻¹) através das Equações 8 e 9, respetivamente:

$$ER (\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (8)$$

$$TR = \frac{S_i - S_f}{t_f - t_i} \quad (9)$$

onde S_i e S_f representam a concentração de um dado nutriente (mg L^{-1}) no tempo inicial (t_i) e final (t_f) da cultura (em d), respetivamente.

Também foi possível calcular o rendimento específico de biomassa ($Y_{X/S}$, em $\text{g}_b \text{g}_s^{-1}$) através dos valores anteriormente calculados de produtividade média e taxa de remoção média de nutrientes (Equação 10). Este parâmetro representa a quantidade de biomassa produzida (b) por quantidade de substrato consumido (S).

$$Y_{X/S} = \frac{P_{x,med}}{TR} \quad (10)$$

A Equação 11 permite calcular a quantidade de fotões acumulada por volume de cultura ($N_{acum,z}$, $\mu\text{mol}_{fotões} \text{L}^{-1}$) no intervalo de tempo Δt (s). Com os resultados obtidos foi possível fazer uma representação gráfica de $\ln(X)$ em função da quantidade de fotões acumulada por volume de cultura ($N_{acum,z}$, $\mu\text{mol}_{fotões} \text{L}^{-1}$), de forma a seleccionar o grupo de pontos representativos da fase de crescimento exponencial e assim determinar a taxa específica de crescimento (ver Anexo A.6).

$$N_{acum,z} = N_{acum,z-1} + \frac{\bar{I}\Delta t A}{V} \quad (11)$$

onde $\bar{I}$ é a intensidade luminosa média ($\mu\text{mol}_{fotões} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Δt é período de tempo entre medições (s), V é o volume de cultura (L) e A corresponde à área superficial iluminada (m^2).

4. Resultados e discussão

4.1. Avaliação do efeito do comprimento de onda da luz

4.1.1. Crescimento de biomassa

A evolução da concentração de biomassa ao longo do tempo para cada uma das espécies de microalgas nas diferentes condições de luz testadas é apresentada na Figura 5.

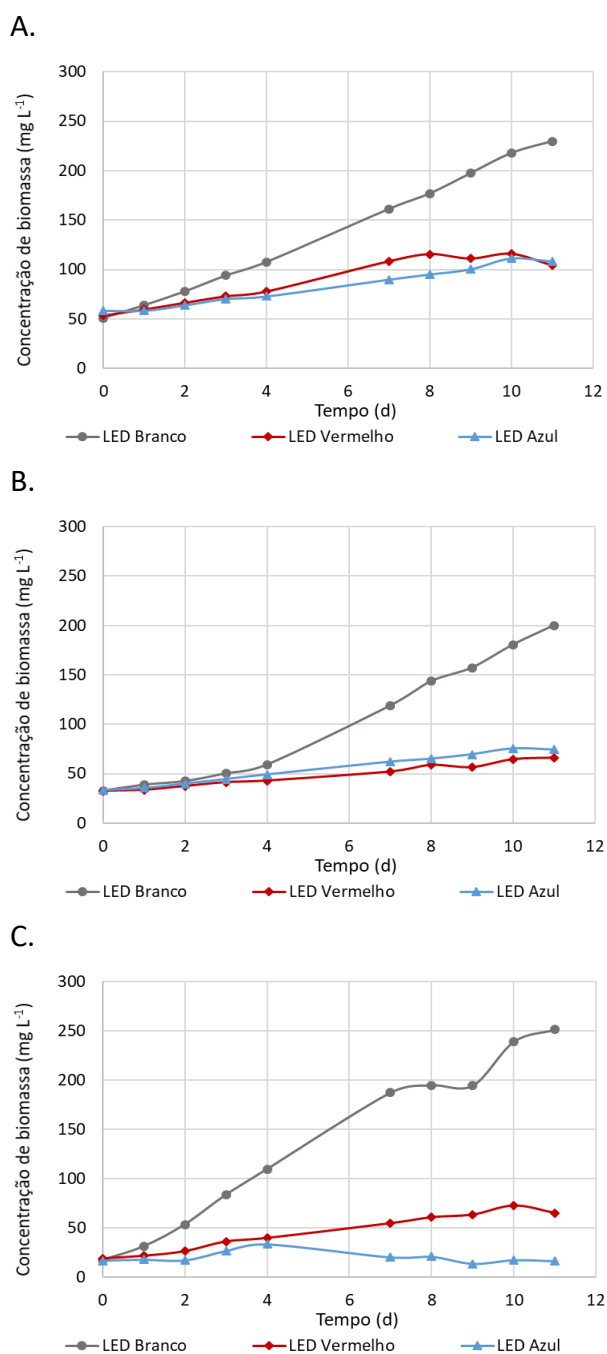


Figura 5 – Curvas de crescimento obtidas para as diferentes condições de luz (LED branco, LED vermelho e LED azul) para as espécies *C. vulgaris* (A), *T. obliquus* (B) e *N. oleoabundans* (C).

Pela análise da Figura 5 é possível verificar que as espécies de microalgas selecionadas cresceram nas diferentes condições de luz testadas, à exceção da microalga *N. oleoabundans* quando cultivada com luz azul. Para além disso, verifica-se um crescimento significativamente maior nas condições de luz branca, para todas as espécies. Relativamente às luzes vermelha e azul, verifica-se que em condições de luz vermelha foi favorecido o crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *N. oleoabundans*. Já para a microalga *T. obliquus*, o crescimento foi ligeiramente superior nos ensaios realizados com luz azul. Verificou-se ainda que, nestas condições (luz vermelha e azul), as três espécies testadas apresentaram uma fase de adaptação mais longa, o que se traduziu num menor crescimento. A maior fase de adaptação observada nestas condições poderá estar relacionada com os baixos valores de intensidade luminosa utilizados neste estudo, com o fornecimento de luz numa gama mais estreita do espectro da radiação visível e também com o facto de os inóculos terem sido preparados em condições de luz branca, o que fez com que as microalgas não estivessem previamente acondicionadas a estas condições.

De maneira a ser possível efetuar uma análise mais detalhada do efeito das diferentes condições de luz testadas, a Tabela 3 apresenta um resumo dos parâmetros cinéticos do crescimento determinados para cada microalga em cada condição. As concentrações máximas de biomassa obtidas com a luz branca variaram entre 197 e 254 mg L⁻¹, sendo que a espécie *N. oleoabundans* foi a que obteve valores superiores (251±3 mg L⁻¹) em comparação com a *C. vulgaris* e com a *T. obliquus*, que alcançaram 230±5 e 200±3 mg L⁻¹, respetivamente. Com a luz vermelha, a concentração máxima de biomassa mais elevada foi obtida pela *C. vulgaris* (116±2 mg L⁻¹) e a mais baixa pela *T. obliquus* (66±2 mg L⁻¹). Por fim, com a luz azul a espécie *C. vulgaris* foi a que conseguiu alcançar um valor mais alto de concentração máxima de biomassa (111±2 mg L⁻¹) e a *N. oleoabundans* a mais baixa (34±4 mg L⁻¹). Tendo em conta os resultados da Tabela 3, pode-se também confirmar que as concentrações mais elevadas foram obtidas com a luz branca para todas as espécies.

De forma a se poder analisar em que condições a cultura alcançou uma velocidade de crescimento maior, determinou-se a taxa específica de crescimento para cada uma das espécies nas diferentes condições de luz. As taxas de crescimento mais elevadas foram obtidas com luz branca. A *C. vulgaris* obteve a taxa de crescimento mais baixa com a luz azul (0,0657±0,0008 d⁻¹) e a mais elevada com a luz branca (0,18±0,03 d⁻¹). A taxa de crescimento obtida com a luz branca para a microalga *C. vulgaris* está abaixo da gama reportada na literatura (0,55-1,20 d⁻¹) (Atta et al., 2013; Silva et al., 2015). O valor da taxa de crescimento com a luz vermelha (0,090±0,007 d⁻¹) encontra-se dentro da gama obtida noutros estudos (0,07-0,43 d⁻¹) (Mohsenpour et al., 2012; Mejia Rendon, 2014). No caso da luz azul, o valor da taxa de crescimento está abaixo dos resultados reportados em alguns estudos (0,64-1,22 d⁻¹) (Atta et al., 2013; Das et al., 2011). Os menores valores de taxa específica de crescimento obtidos para a luz branca (em comparação com os valores reportados na literatura) poderão ser resultado da

menor intensidade luminosa utilizada neste estudo ($\approx 30 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Kiss and Németh (2019) utilizaram LEDs branco, vermelho, azul e verde para o crescimento da microalga *C. vulgaris*, obtendo valores de taxa específica de crescimento seguindo a mesma tendência do que a que foi obtida neste trabalho (LED branco > LED vermelho > LED azul). A *T. obliquus* teve uma taxa específica de crescimento menor com a luz vermelha ($0,08 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$) e maior com a luz branca ($0,205 \pm 0,003 \text{ d}^{-1}$). Zhao et al. (2015) reportaram taxas específicas de crescimento para esta espécie mais elevadas para todos os comprimentos de onda utilizados, o que poderá também estar relacionado com as menores intensidades luminosas fornecidas às culturas neste trabalho (entre $6,7 \pm 0,5$ e $38 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respetivamente). Por último, a taxa específica de crescimento obtida pela *N. oleoabundans* com luz branca ($0,405 \pm 0,004 \text{ d}^{-1}$) foi a mais elevada. Usando luz vermelha, conseguiu-se alcançar uma taxa de crescimento de $0,17 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$, sendo que com luz azul esta microalga não foi capaz de crescer, não tendo sido possível calcular a taxa específica de crescimento nestas condições. No estudo de Zhao et al. (2015), esta microalga obteve uma taxa específica de crescimento mais baixa para a luz branca ($0,216 \text{ d}^{-1}$) e semelhante para a luz vermelha ($0,179 \text{ d}^{-1}$). Porém, neste estudo a *N. oleoabundans* conseguiu crescer com luz azul, com uma taxa específica de crescimento de $0,134 \text{ d}^{-1}$. Comparando os resultados obtidos entre as diferentes espécies, é possível verificar-se que no ensaio com luz branca a espécie que obteve maior taxa específica de crescimento foi a *N. oleoabundans*, seguida pela *T. obliquus* e por fim a *C. vulgaris*. Nestas condições, a *N. oleoabundans* apresentou uma fase exponencial de crescimento mais curta, atingindo a fase estacionária mais cedo do que as restantes espécies, que cresceram continuamente até ao final do tempo de cultura (ver Figura 5).

Relativamente aos valores de produtividade máxima de biomassa obtidos, verifica-se que estes seguem a tendência dos valores da taxa específica de crescimento.

Tabela 3 – Parâmetros de análise do crescimento das diferentes espécies de microalgas obtidos para os diferentes comprimentos de onda da luz utilizados

Espécie	λ (nm)	$X_{\text{máx}}$ (mg L^{-1})	μ (d^{-1})	$P_{\text{máx}}$ ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	P_{med} ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
<i>C. vulgaris</i>	380-750 (B)	230 ± 5	$0,18 \pm 0,03$	25 ± 5	$16,3 \pm 0,3$
	620-750 (V)	116 ± 2	$0,090 \pm 0,007$	$10,1 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,5$
	450-495 (A)	111 ± 2	$0,0657 \pm 0,0008$	11 ± 3	$4,53 \pm 0,07$
<i>T. obliquus</i>	380-750 (B)	200 ± 3	$0,205 \pm 0,003$	25 ± 1	$15,2 \pm 0,1$
	620-750 (V)	66 ± 2	$0,08 \pm 0,01$	8 ± 1	$3,0 \pm 0,2$
	450-495 (A)	75 ± 1	$0,106 \pm 0,007$	$5,9 \pm 0,2$	$3,70 \pm 0,08$
<i>N. oleoabundans</i>	380-750 (B)	251 ± 3	$0,405 \pm 0,004$	45 ± 8	$21,3 \pm 0,1$
	620-750 (V)	73 ± 8	$0,17 \pm 0,03$	10 ± 1	$4,2 \pm 0,3$
	450-495 (A)	34 ± 4	ND	ND	ND

λ - comprimento de onda da luz fornecido às culturas (nm); $X_{\text{máx}}$ - concentração máxima de biomassa (mg L^{-1}); $P_{\text{máx}}$ - produtividade máxima de biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$); P_{med} - produtividade média de biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$); ND - valor não determinado.

Ou seja, para as microalgas *C. vulgaris* e *N. oleoabundans*, os valores de produtividade máxima de biomassa seguiram a tendência LED branco > LED vermelho > LED azul. No caso da *T. obliquus* a tendência foi a mesma, sendo que em estudos da literatura a tendência para esta espécie foi semelhante (LED branco > LED vermelho > LED azul) (Kim et al., 2013; Zhao et al., 2015). A produtividade máxima mais elevada foi obtida pela espécie *N. oleoabundans* com a luz branca ($45 \pm 8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). A produtividade máxima é um parâmetro importante a analisar, pois fornece informações sobre quais são as condições ótimas para a cultura resultando num crescimento mais eficiente. Relativamente aos valores de produtividade média obtidos, verifica-se que estes seguem a mesma tendência que os restantes parâmetros cinéticos de crescimento, sendo os valores obtidos para os ensaios realizados com luz branca significativamente superiores aos valores obtidos nas restantes condições de luz. Estes valores variaram entre $15,2 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (para a microalga *T. obliquus*) e $21,3 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (para a microalga *N. oleoabundans*). Os resultados relativos ao crescimento foram maiores para a luz vermelha do que para a luz azul, o que está de acordo com outros estudos da literatura, onde *C. vulgaris* obteve valores de crescimento seguindo a tendência LED vermelho > LED branco > LED azul (Yan et al., 2013b; Yan et al., 2013a). O facto de a luz vermelha ter obtido melhores resultados do que a branca neste caso é devido ao valor das intensidades luminosas desses estudos serem iguais para todos os comprimentos de onda e serem superiores às utilizadas neste trabalho, onde a luz branca tem maior intensidade luminosa do que a vermelha (ver Tabela 2).

Visto que as intensidades luminosas variavam conforme as gamas de comprimento de onda utilizadas, calculou-se a taxa específica de crescimento em função da quantidade de fótons acumulada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Pela sua análise, verifica-se que em todas as espécies as menores taxas de crescimento foram obtidas com a luz branca, quando comparado com os resultados obtidos por outras cores. Estes resultados estão de acordo com a literatura (Katsuda et al., 2004; Teo et al., 2014; Atta et al., 2013). No caso da *C. vulgaris*, esta obteve valores mais elevados de taxa específica de crescimento com a luz vermelha.

Tabela 4 – Taxa específica de crescimento determinada em função da quantidade de fótons acumulados pelas diferentes espécies de microalgas nos diferentes comprimentos de onda da luz utilizados

Espécie	λ (nm)	$\mu \times 10^7 (\text{L } \mu\text{mol}_{\text{fótons}}^{-1})$
<i>C. vulgaris</i>	380-750 (B)	$108,6 \pm 0,2$
	620-750 (V)	$207,1 \pm 0,2$
	450-495 (A)	198 ± 5
<i>T. obliquus</i>	380-750 (B)	100 ± 1
	620-750 (V)	$159,9 \pm 0,3$
	450-495 (A)	$289,7 \pm 0,2$
<i>N. oleoabundans</i>	380-750 (B)	230 ± 2
	620-750 (V)	$370,7 \pm 0,7$
	450-495 (A)	ND

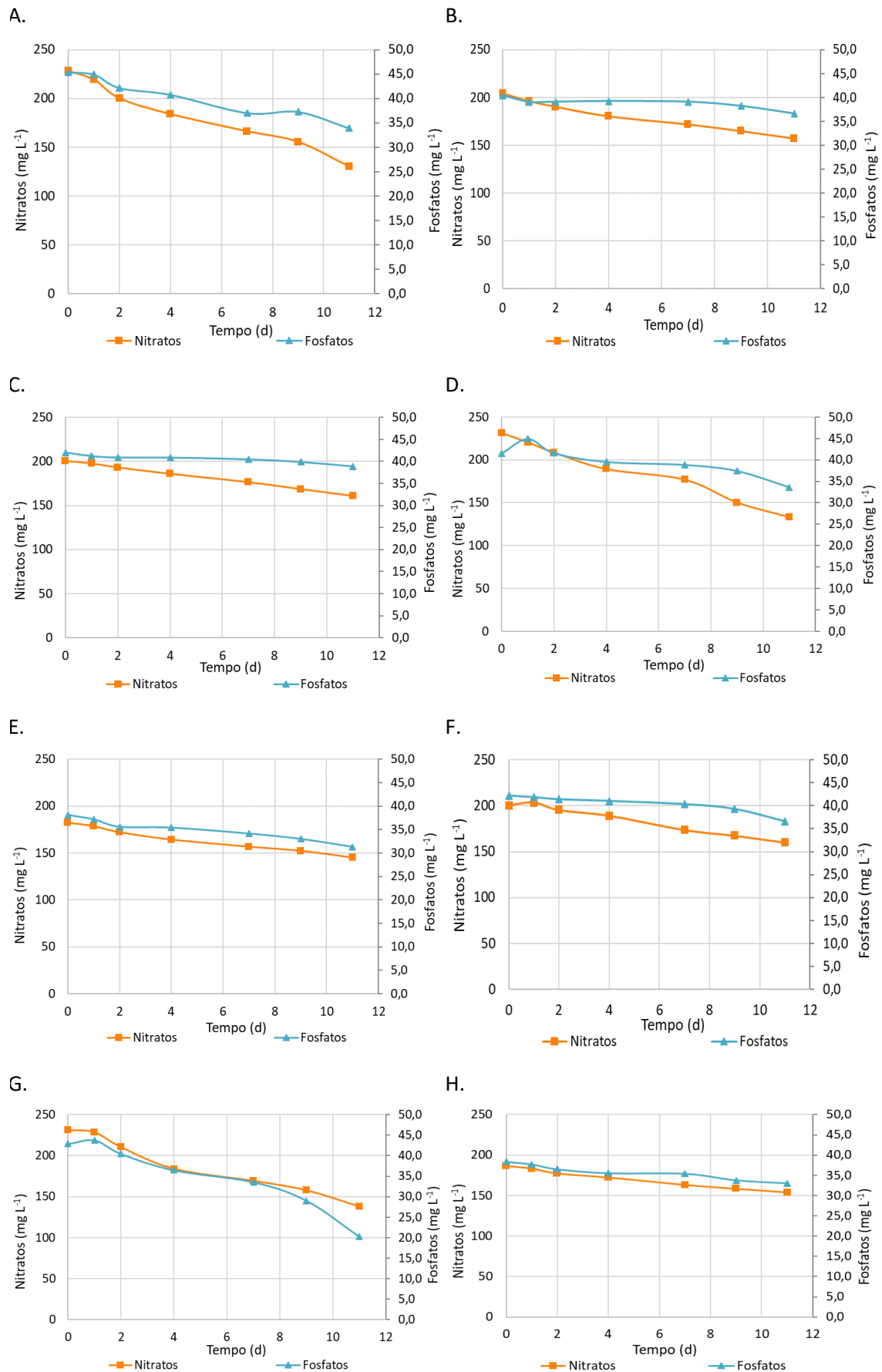
λ - comprimento de onda da luz fornecida às culturas (nm); ND - valor não determinado.

A *T. obliquus* obteve os melhores resultados com luz azul. A *N. oleoabundans* foi a espécie que obteve o valor mais elevado de taxa de crescimento, sendo que esse valor foi obtido nas condições de luz vermelha. De uma forma geral, a luz vermelha está relacionada com um maior crescimento e menor consumo de nutrientes, já a luz azul provoca um menor crescimento mas um maior consumo de nutrientes (Schulze et al., 2016).

4.1.2. Remoção de nutrientes

A evolução da concentração de nutrientes no meio de cultura ao longo do tempo é apresentada na Figura 6. Pela análise destes resultados, verifica-se que o consumo de dois dos macronutrientes essenciais ao crescimento das microalgas (nitratos e fosfatos, como fontes de azoto e fósforo, respetivamente) não foi significativo, uma vez que não houve uma redução significativa na sua concentração ao longo do tempo. Tal poderá estar relacionado com as baixas produtividades de biomassa e taxas específicas de crescimento obtidas nestes ensaios. De facto, verifica-se que nas culturas onde o crescimento foi menor (ensaios realizados com luz vermelha e azul, por exemplo), também o consumo destes nutrientes foi menor. Esta tendência foi ainda mais notória na cultura da microalga *N. oleoabundans* com luz azul. Nestas condições praticamente não houve crescimento da microalga e o mesmo se verificou relativamente ao consumo de nitratos e fosfatos presentes no meio de cultura. Apesar dos baixos consumos de nutrientes obtidos nos ensaios realizados com luz vermelha e azul, no caso dos ensaios com luz branca o consumo destes nutrientes foi superior. Contudo, também nestes ensaios se verificou um consumo abaixo do que seria esperado, que poderá estar relacionado com uma limitação pela luz. Por exemplo, analisando a curva de crescimento da microalga *C. vulgaris* (Figura 5-A), verifica-se que esta atinge a fase estacionária nos dois últimos dias de cultura. Uma vez que se trata do crescimento em modo descontínuo, seria de esperar que houvesse crescimento até o esgotamento de algum nutriente essencial, o que não se verificou nestes ensaios (Barsanti and Gualtieri, 2014). Assim sendo, tendo em conta a intensidade luminosa fornecida às culturas ($30 \pm 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pode-se atribuir a cessação do crescimento e a baixa remoção de nutrientes do meio de cultura à limitação pela luz.

Os resultados relativos aos cálculos da eficiência de remoção, da taxa de remoção média e dos rendimentos específicos de biomassa estão apresentados na Tabela 5. Os resultados apresentados referem-se apenas à remoção de azoto e fósforo do meio de cultura, dois macronutrientes indispensáveis ao crescimento das microalgas. No caso do azoto, os cálculos basearam-se na concentração de nitratos presentes no meio de cultura, enquanto que no caso do fósforo, estes resultados tiveram por base a concentração de fosfatos no meio de cultura. As eficiências de remoção de nitratos pela microalga *C. vulgaris* variaram de 19,7 a 43,0% e as taxas médias de remoção variaram entre 4,25 e 8,92 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, sendo que os valores mais elevados foram obtidos com luz



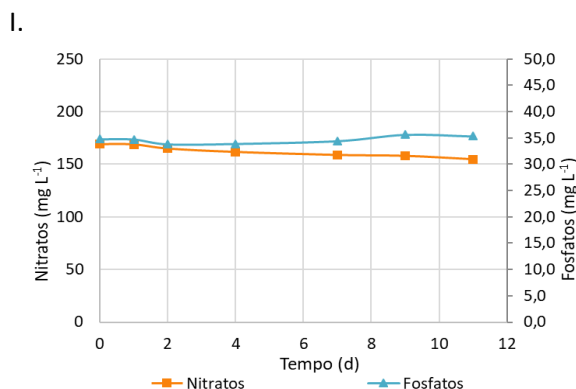


Figura 6 – Variação da concentração de nitratos e fosfatos para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C, F, I) para as espécies *C. vulgaris* (A, B, C), *T. obliquus* (D, E, F) e *N. oleoabundans* (G, H, I).

branca e os menores com luz vermelha. A microalga *T. obliquus* obteve valores de eficiências de remoção de nitratos entre 20,4 e 42,6% e taxas médias de remoção dentro da gama de 3,39 e 8,96 mg L⁻¹ d⁻¹. Os valores de eficiência de remoção e taxa média de remoção de nitratos obtidos para a microalga *N. oleoabundans* com luz branca foram semelhantes aos valores obtidos para as outras espécies em estudo. Por outro lado, os valores obtidos com luz vermelha e azul foram mais baixos que os obtidos para as microalgas *C. vulgaris* e *T. obliquus*.

As eficiências de remoção de fosfatos obtidas pela *C. vulgaris* variaram entre 7,44 e 25,2%, onde o valor mais elevado foi obtido com luz branca e o mais baixo com luz vermelha, tal como para a remoção de nitratos. Também as taxas médias de remoção seguiram a mesma tendência, com o menor valor obtido com a luz vermelha (0,284 mg L⁻¹ d⁻¹) e o maior valor obtido com a luz branca (1,04 mg L⁻¹ d⁻¹). Apesar de a taxa de crescimento da *C. vulgaris* ter sido maior nos ensaios realizados com luz vermelha do que com luz azul, as eficiências e as taxas médias de remoção de nitratos e fosfatos obtidas para a luz azul foram superiores às obtidas para a luz vermelha. Este desvio observado entre o consumo de nutrientes e o crescimento poderá estar relacionado com a capacidade que alguns microrganismos têm para acumular nutrientes, como é o caso dos nitratos e fosfatos, mesmo que não esteja diretamente relacionado com o crescimento (Lomas and Glibert, 2000; Tarayre et al., 2016). A *T. obliquus* obteve os valores mais baixos de eficiência de remoção (13,2%) e taxa média de remoção de fosfatos (0,508 mg L⁻¹ d⁻¹) com a luz vermelha e os mais altos com a luz branca (19,1% e 0,722 mg L⁻¹ d⁻¹, respetivamente). A *N. oleoabundans* foi a espécie que obteve valores de eficiência de remoção e taxa média de remoção de fosfatos mais elevados para a luz branca (52,8% e 2,06 mg L⁻¹ d⁻¹, respetivamente).

Vários estudos reportaram valores de eficiência e taxa média de remoção destes nutrientes na mesma ordem de grandeza. Kim et al. (2013) utilizaram LEDs brancos, vermelhos e azuis para o crescimento da microalga *T. obliquus* e obtiveram taxas de remoção de azoto dentro do intervalo 5-7 mg L⁻¹ d⁻¹, ao fim de 6 dias, para todos os

comprimentos de onda. Na remoção de fosfatos, a taxa de remoção esteve dentro da gama 1-2 mg L⁻¹ d⁻¹, sendo que a taxa mais elevada foi obtida com a luz azul, seguida pela luz vermelha e, por último, a luz branca. Schulze et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes: as microalgas consumiram mais nitratos com a luz azul do que com a luz vermelha, pois em crescimento com luz azul, as microalgas ficam mais dependentes da utilização de nutrientes para o seu crescimento. Isto acontece, pois, neste comprimento de onda ocorre a ativação oxirredutases de nitrato e fósforo, o que origina um aumento na absorção de nutrientes (Kamiya and Saitoh, 2002; Kim et al., 2013).

O rendimento específico da biomassa (também apresentado na Tabela 5) relaciona a quantidade de biomassa produzida com a quantidade de substrato consumido. Os valores do rendimento específico relativos ao consumo de nitratos da *C. vulgaris* foram mais elevados nos ensaios com a luz branca (1,82 g_b g_N⁻¹) e mais baixos com a luz vermelha (1,08 g_b g_N⁻¹). No caso dos valores deste parâmetro relativos ao consumo de fosfatos, o valor mais elevado foi obtido com a luz azul (16,0 g_b g_P⁻¹) e o menor com a luz vermelha (13,3 g_b g_P⁻¹). A *T. obliquus* obteve os valores mais elevados do rendimento específico relativos ao consumo de nitrato e de fosfato com a luz branca (1,69 g_b g_N⁻¹ e 21,0 g_b g_P⁻¹) e os valores mais baixos com a luz vermelha (0,897 g_b g_N⁻¹ e 4,95 g_b g_P⁻¹). Por último, a *N. oleoabundans* obteve os valores mais elevados com a luz branca e os menores com a luz vermelha, tanto para o rendimento relativo ao consumo de nitratos como para o relativo ao consumo de fosfatos. Quanto ao rendimento é possível verificar-se que, no caso da *T. obliquus*, este variou de 4,95 a 21,0 g_b g_P⁻¹. No caso da *C. vulgaris*, o rendimento variou de 13,3 para 16,0 g_b g_P⁻¹, mostrando que a composição bioquímica da *T. obliquus* apresenta maior variabilidade para diferentes comprimentos de onda, sendo assim uma espécie mais sensível para este parâmetro de crescimento. De uma forma geral, os maiores valores de rendimento específico obtidos

Tabela 5 – Parâmetros cinéticos de remoção de azoto e fósforo calculados para cada ensaio

Espécie	λ (nm)	ER _{N-NO₃} (%)	TR _N (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Y _{X/N} (g _b g _N ⁻¹)	ER _{P-PO₄} (%)	TR _P (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Y _{X/P} (g _b g _P ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	380-750 (B)	43,0	8,92	1,82	25,2	1,04	15,6
	620-750 (V)	19,7	3,60	1,08	7,44	0,284	13,3
	450-495 (A)	22,9	4,25	1,26	9,40	0,345	16,0
<i>T. obliquus</i>	380-750 (B)	42,6	8,96	1,69	19,1	0,722	21,0
	620-750 (V)	20,1	3,67	0,897	13,2	0,508	4,95
	450-495 (A)	20,4	3,39	1,01	17,8	0,614	7,29
<i>N. oleoabundans</i>	380-750 (B)	40,5	8,51	2,50	52,8	2,06	10,3
	620-750 (V)	17,4	2,95	1,42	13,8	0,482	8,69
	450-495 (A)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

λ - comprimento de onda de luz fornecida às culturas (nm); ER_{N-NO₃} - eficiência de remoção de nitratos (%); TR_N - taxa de remoção média de nitratos (mg L⁻¹ d⁻¹); Y_{X/N} - rendimento específico da biomassa relativamente ao consumo de nitratos (g_b g_N⁻¹); ER_{P-PO₄} - eficiência de remoção de fosfatos (%); TR_P - taxa de remoção média de fosfatos (mg L⁻¹ d⁻¹); Y_{X/P} - rendimento específico da biomassa relativamente ao consumo de fosfatos (g_b g_P⁻¹) (%); ND - valor não determinado.

para as condições de luz branca estão relacionados com as maiores produtividades de biomassa observadas nestas condições. Por outro lado, os maiores valores do rendimento específico relativos ao consumo de fosfatos obtidos indicam que, para obter a mesma produtividade de biomassa, todas as espécies estudadas consomem mais nitratos do que fosfatos, o que está de acordo com a composição típica descrita para as microalgas ($\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$) (Chisti, 2007). Os resultados obtidos para o rendimento específico constituem também evidência da capacidade das microalgas para acumularem nutrientes, mesmo que não seja para o seu crescimento, e também das condições limitantes (ao nível da luz) a que as microalgas foram submetidas nestes ensaios. Isto porque, os valores obtidos neste estudo foram bastante inferiores aos reportados por Pereira et al. (2016): $4,1\text{-}46 \text{ g}_b \text{ g}_N^{-1}$, relativamente ao consumo de nitratos, e $20\text{-}150 \text{ g}_b \text{ g}_P^{-1}$, relativamente ao consumo de fosfatos.

4.1.3. Teor de açúcares

A concentração de açúcares totais presentes em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada ensaio é apresentada na Tabela 6. Podemos verificar que a espécie que apresenta maior concentração de açúcares em todas as gamas de comprimentos de onda utilizados é a *C. vulgaris*, sendo que o valor mais elevado foi obtido com a luz branca ($17,0 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$). O valor mais baixo de concentração de açúcares obtido por esta espécie foi com a luz azul ($12 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$). A *T. obliquus* obteve a maior concentração no ensaio com a luz vermelha ($15 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$), seguida pelo ensaio com luz branca ($14 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$) e por fim da luz azul ($10,0 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$). As concentrações mais baixas foram obtidas com a luz azul para todas as espécies. No caso da microalga *N. oleoabundans*, o teor de açúcares nestas condições não foi determinado porque não houve crescimento da microalga. Para esta microalga, a concentração de açúcares foi maior com a luz branca ($14 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$) do que com a luz vermelha ($8,0 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$). As concentrações de hidratos de carbono foram mais baixas com o LED azul do que com o vermelho, o que pode estar relacionado com o facto dos fotões azuis libertados por

Tabela 6 – Concentração de açúcares totais (mg L^{-1}) determinados em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada ensaio

Espécie	λ (nm)	Concentração de açúcares totais em solução (mg L^{-1})
<i>C. vulgaris</i>	380-750 (B)	$17,0 \pm 0,5$
	620-750 (V)	$16,0 \pm 0,6$
	450-495 (A)	12 ± 1
<i>T. obliquus</i>	380-750 (B)	14 ± 3
	620-750 (V)	15 ± 1
	450-495 (A)	$10,0 \pm 0,2$
<i>N. oleoabundans</i>	380-750 (B)	14 ± 2
	620-750 (V)	$8,0 \pm 0,6$
	450-495 (A)	ND

λ - comprimento de onda da luz fornecida às culturas (nm); ND - valor não determinado.

essas luzes induzirem a redução das reservas de hidratos de carbono nas células (Kamiya and Saitoh, 2002).

4.2. Avaliação do efeito do modo de operação em semi-contínuo

4.2.1. Crescimento de biomassa

A evolução da concentração de biomassa ao longo do tempo para as duas espécies de microalgas é apresentada na Figura 7. Pela análise destes resultados, pode-se verificar um crescimento significativamente maior da *C. vulgaris* relativamente à *T. obliquus*. Relativamente à *C. vulgaris* verifica-se que na primeira fase o crescimento foi maior comparando com as restantes fases, sendo que esta espécie cresceu em todas as fases. No caso da *T. obliquus*, verifica-se que: (i) a microalga cresceu na primeira fase; (ii) na segunda fase o crescimento não foi tão acentuado; e (iii) na terceira fase a microalga não cresceu. Sendo assim, esta espécie não é adequada para crescimento/produção em semi-contínuo.

De forma a efetuar uma análise mais detalhada de cada uma das espécies, a Tabela 7 apresenta um resumo dos parâmetros cinéticos do crescimento determinados para cada microalga. Para ambas as espécies, tanto as concentrações de biomassa como a taxa de crescimento e as produtividades foram mais elevadas na primeira fase do ensaio. A gama de concentrações de biomassa máxima obtidas pela *C. vulgaris* (256-347 mg L⁻¹) são um pouco inferiores às obtidas noutros estudos (460-2300 mg L⁻¹) (Chang et al., 2016; Pires et al., 2014). As taxas de crescimento obtidas para a *C. vulgaris* (0,056-0,23 d⁻¹) estão abaixo da gama reportada pela literatura (0,550-1,20 d⁻¹) (Atta et al., 2013; Silva et al., 2015). As produtividades máximas obtidas variaram entre 13 e 35 mg L⁻¹ d⁻¹ e encontram-se dentro dos valores reportados na literatura (16-162 mg L⁻¹ d⁻¹) (Griffiths et al., 2014; Pires et al., 2014). No caso da *C. vulgaris*, comparando a segunda e terceira fase, pode-se verificar que, apesar de a concentração de biomassa máxima ser superior na segunda fase, a taxa específica de crescimento e as produtividades são

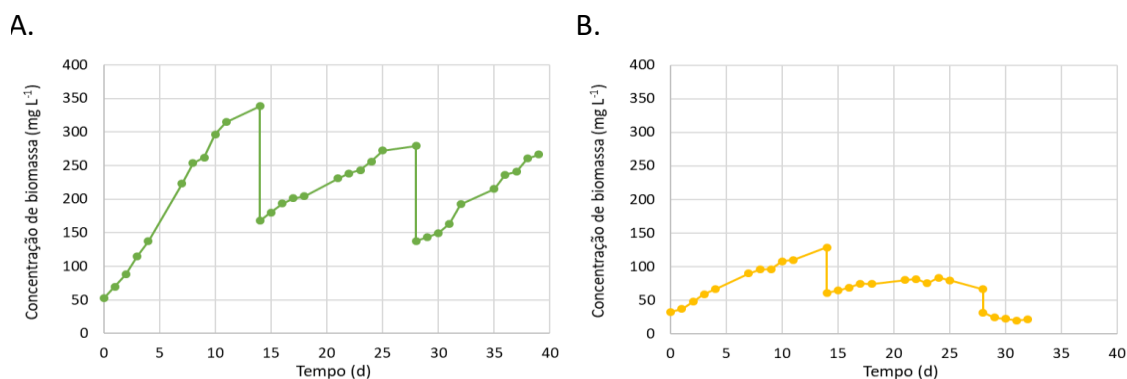


Figura 7 – Curvas de crescimento obtidas para as espécies *C. vulgaris* (A) e *T. obliquus* (B) nos ensaios em semi-contínuo.

Tabela 7 – Parâmetros de análise do crescimento das diferentes espécies de microalgas obtidos nos ensaios de crescimento em semi-contínuo

Espécie	Fase do ensaio	$X_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	$P_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	P_{med} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	1ª fase	339 ± 8	0,20 ± 0,03	34,5 ± 0,6	23,9 ± 0,5
	2ª fase	279 ± 7	0,061 ± 0,005	17 ± 4	9,5 ± 0,3
	3ª fase	266 ± 10	0,114 ± 0,003	29 ± 4	11,7 ± 0,6
<i>T. obliquus</i>	1ª fase	128 ± 5	0,15 ± 0,01	12 ± 1	7,1 ± 0,6
	2ª fase	83,5 ± 0,9	0,07 ± 0,01	9 ± 4	1,7 ± 0,5
	3ª fase	32 ± 6	ND	ND	ND

λ - comprimento de onda da luz fornecida às culturas (nm); $X_{\text{máx}}$ - concentração máxima de biomassa (mg L⁻¹); $P_{\text{máx}}$ - produtividade máxima de biomassa (mg L⁻¹ d⁻¹); P_{med} - produtividade média de biomassa (mg L⁻¹ d⁻¹); ND - valor não determinado.

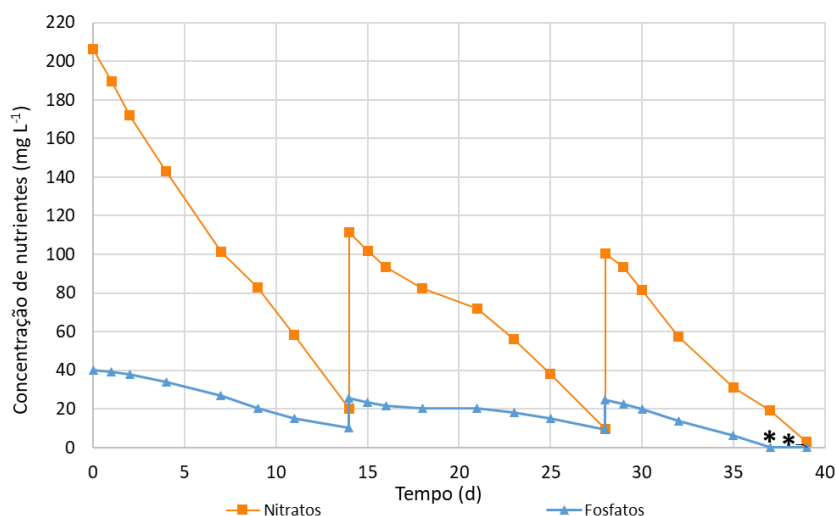
inferiores aos valores obtidos na terceira fase. Este facto pode ser explicado pela maior concentração celular presente na cultura no início da segunda fase de crescimento (168±4 mg L⁻¹), quando comparado com a concentração de biomassa presente no início da terceira fase (138±3 mg L⁻¹), o que leva a que haja um maior sombreamento e, consequentemente, as microalgas ficam com menor capacidade de captar a luz incidente. A *C. vulgaris* apresenta uma concentração de biomassa máxima e uma produtividade máxima muito superior à obtida pela *T. obliquus* no mesmo intervalo de tempo ($t = 25$ d) apesar de terem uma taxa de crescimento similar (0,061±0,005 e 0,07±0,01 d⁻¹ para a *C. vulgaris* e *T. obliquus*, respetivamente).

No caso da *T. obliquus*, as concentrações máximas de biomassa encontram-se no intervalo de 26 a 133 mg L⁻¹, sendo que o valor deste parâmetro foi decrescendo a cada fase do ensaio. A taxa específica de crescimento e as produtividades não foram determinadas na terceira fase porque a microalga deixou de crescer. As taxas de crescimento variaram de 0,06 até 0,16 d⁻¹, encontrando-se assim dentro da gama encontrada na literatura 0,10-1,19 d⁻¹ (Thiansathit et al., 2015; Barbera et al., 2016). No caso das produtividades máximas, estas mantiveram-se dentro do intervalo de 5 a 13 mg L⁻¹ d⁻¹, sendo que estes valores estão muito abaixo da gama reportada na literatura (45-293 mg L⁻¹ d⁻¹) (Thiansathit et al., 2015; Nadzir et al., 2018).

4.2.2. Remoção de nutrientes

A variação da concentração de nutrientes no meio de cultura ao longo do tempo é apresentada na Figura 8. Pela análise destes resultados, verifica-se que a *C. vulgaris* consumiu uma maior concentração de nitratos e fosfatos, comparando com a *T. obliquus*, visto que a sua taxa de crescimento foi superior à da *T. obliquus*. Verifica-se também que nas culturas onde o crescimento foi menor (na segunda fase da *T. obliquus*), o consumo destes nutrientes foi menor. Na terceira fase de crescimento desta espécie, onde não houve crescimento da microalga, as concentrações de fosfato

A.

*Valores abaixo do limite de detecção ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$)

B.

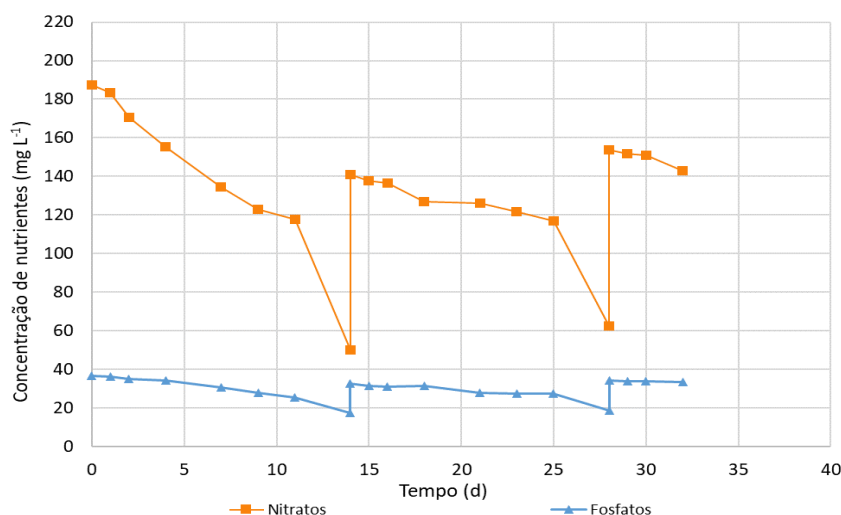


Figura 8 – Variação da concentração de nitratos e fosfatos nos ensaios realizados em semi-contínuo para as espécies *C. vulgaris* (A), *T. obliquus* (B).

mantiveram-se constantes. No caso da *C. vulgaris*, as concentrações dos nutrientes diminuíram consideravelmente em cada fase, mostrando ser uma boa opção no tratamento de efluentes com estes nutrientes em modo semi-contínuo.

Os resultados relativos aos cálculos da eficiência de remoção, da taxa de remoção média e dos rendimentos específicos de biomassa estão apresentados na Tabela 8. Os resultados apresentados referem-se apenas à remoção de azoto e fósforo do meio de cultura. As eficiências de remoção de nitratos obtidas pela *C. vulgaris* variaram de 65,8 a 97,1%, sendo que o valor mais elevado foi obtido na terceira fase, assim como no caso das taxas de remoção onde os valores variaram entre 6,66 e 13,5 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$. Outros estudos encontrados na literatura reportaram eficiências de remoção de nitratos que variam de 21-100% e taxas de remoção na gama dos 0,82-4,22 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$;

porém

estes

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos de remoção de azoto e fósforo calculados nos ensaios em semi-contínuo para cada microalga

Espécie	Fase do ensaio	ER _{N-NO₃} (%)	TR _N (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Y _{X/N} (g _b g _N ⁻¹)	ER _{P-PO₄} (%)	TR _P (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Y _{X/P} (g _b g _P ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	1ª fase	71,7	13,5	1,78	62,6	2,28	10,5
	2ª fase	65,8	6,66	1,43	41,9	0,974	9,77
	3ª fase	97,1	9,85	1,32	> 93,6	2,11	ND
<i>T. obliquus</i>	1ª fase	37,1	6,31	1,12	30,5	1,01	6,96
	2ª fase	17,3	2,22	0,769	16,5	0,492	3,46
	3ª fase	6,98	2,68	ND	2,10	0,180	ND

ER_{N-NO₃} - eficiência de remoção de nitratos (%); TR_N - taxa de remoção média de nitratos (mg L⁻¹ d⁻¹); Y_{X/N} - rendimento específico da biomassa relativamente ao consumo de nitratos (g_b g_N⁻¹); ER_{P-PO₄} - eficiência de remoção de fosfatos (%); TR_P - taxa de remoção média de fosfatos (mg L⁻¹ d⁻¹); Y_{X/P} - rendimento específico da biomassa relativamente ao consumo de fosfatos (g_b g_P⁻¹); ND - valor não determinado.

estudos foram desenvolvidos em modo descontínuo (Pereira et al., 2016; Silva et al., 2015). O valor de eficiência de remoção de fosfatos mais baixo foi 41,9% e o mais elevado foi superior a 93,6%, sendo que este último valor foi obtido na terceira fase. A taxa de remoção foi mais elevada na primeira fase (2,28 mg L⁻¹ d⁻¹) e menor na segunda (0,974 mg L⁻¹ d⁻¹). Os valores da literatura para eficiências de remoção de fosfatos de ensaios em descontínuo estão entre 54-100% e para as taxas de remoção encontram-se dentro da gama 0,38-1,4 mg L⁻¹ d⁻¹ (Pereira et al., 2016; Silva et al., 2015). Comparando com a primeira fase, os valores de eficiências remoção de nitratos e fosfatos na terceira fase foram muito mais elevados evidenciando que a *C. vulgaris* é uma espécie adequada para a produção/cultivo em semi-contínuo para a remoção destes nutrientes. Pode-se verificar que, como na segunda fase a taxa de crescimento da *C. vulgaris* foi menor comparativamente com as outras fases, as eficiências e as taxas de remoção, tanto de nitrato como de fosfato, também foram mais baixas nessa fase. Os rendimentos específicos obtidos relativos ao consumo de nitrato variaram entre 6,66 e 13,5 g_b g_N⁻¹, estando dentro da gama reportada por Silva et al. (2015) de 13,2-71,0 g_b g_N⁻¹, num estudo onde o modo de operação era descontínuo. Os rendimentos específicos relativos ao consumo de fosfato variaram entre 9,77 e 28,7 g_b g_P⁻¹, estando também de acordo com a gama reportada pela literatura para ensaios em descontínuo (20,0-150 g_b g_P⁻¹) (Pereira et al., 2016).

As eficiências de remoção de nitratos da *T. obliquus* decresceram ao longo das fases, sendo o valor mais alto 37,1% e o mais baixo 6,98%. As taxas de remoção relativas aos nitratos apresentaram valores entre os 2,22 e 6,31 mg L⁻¹ d⁻¹. As eficiências de remoção de fosfatos foram menores do que as de remoção de nitratos e variaram de 2,10 a 30,5%. As taxas de remoção diminuíram a cada fase, sendo o valor mais elevado obtido na primeira fase (1,01 mg L⁻¹ d⁻¹) e o mais baixo na terceira fase (0,180 mg L⁻¹ d⁻¹). Os rendimentos específicos obtidos relativos ao consumo de nitratos variaram entre 0,769 e 1,12 g_b g_N⁻¹, sendo que o valor mais elevado foi obtido durante a primeira fase. Os rendimentos relativos ao consumo de fosfatos variaram entre 6,96 e 3,46 g_b g_P⁻¹. Os rendimentos específicos de biomassa da *T. obliquus* não foram determinados na terceira

fase pois a curva de crescimento começou a decrescer não tendo sido possível calcular a produtividade média (sendo este um parâmetro necessário para o cálculo dos rendimentos específicos). Comparando as duas espécies, pode-se verificar que os valores de eficiência e de taxa de remoção obtidos para a *C. vulgaris* foram superiores aos resultados obtidos pela *T. obliquus* em todas as fases.

4.2.3. Teor de açúcares

Na Tabela 9 estão apresentadas as concentrações de açúcares totais presentes em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada fase de crescimento para cada espécie. Pela sua análise pode-se verificar que, de um modo geral, a *C. vulgaris* apresenta maior concentração de açúcares em todas as fases, comparativamente com a *T. obliquus*. Em ambas as espécies a concentração de açúcares totais em solução foi maior na segunda fase, pois nesta fase houve uma maior acumulação, em detrimento do aumento de concentração de biomassa. No caso da *C. vulgaris* as concentrações de açúcares totais em solução variaram entre os valores 9,4 e 27 mg L⁻¹, sendo que o valor mais alto corresponde à segunda fase e o mais baixo à primeira fase. No caso da *T. obliquus*, esta obteve a maior concentração na segunda fase (21±2 mg L⁻¹) e a mais baixa na terceira fase (10±2 mg L⁻¹), o que faz sentido pois na terceira fase a *T. obliquus* praticamente não cresceu.

Tabela 9 – Concentração de açúcares totais (mg L⁻¹) determinados em solução após hidrólise ácida da biomassa resultante de cada ciclo de crescimento em modo semi-contínuo

Espécie	Fase do ensaio	Concentração de açúcares totais em solução (mg L ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	1ª fase	10,1 ± 0,7
	2ª fase	25 ± 2
	3ª fase	14 ± 1
<i>T. obliquus</i>	1ª fase	12,7 ± 0,7
	2ª fase	21 ± 2
	3ª fase	10 ± 2

5. Conclusões

5.1. Considerações finais

Nos ensaios desenvolvidos em descontínuo foram avaliados parâmetros cinéticos, nomeadamente a taxa específica de crescimento e as produtividades de biomassa nas diferentes gamas de comprimentos de onda da luz testados. Os resultados demonstraram que a luz branca foi a gama de comprimentos de onda na qual as três espécies em estudo apresentaram maior crescimento. Nestas condições, o valor máximo de taxa específica de crescimento foi $0,405 \pm 0,004 \text{ d}^{-1}$ e a produtividade de biomassa máxima foi de $45 \pm 8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, ambos obtidos pela espécie *N. oleoabundans*. No caso das taxas específicas de crescimento em função da quantidade de fotões acumulada, as menores taxas de crescimento foram obtidas com a luz branca relativamente aos resultados obtidos pela luz vermelha e azul, em todas as espécies. O maior valor foi obtido pela *N. oleoabundans* com a luz vermelha, $(370,7 \pm 0,7) \times 10^{-7} \text{ L } \mu\text{mol}_{\text{fotões}}^{-1}$. A remoção de nutrientes (nitrato e fosfato) do meio de cultura foi avaliada em termos de eficiências de remoção e taxas de remoção médias. As eficiências de remoção de nitratos obtidas nos ensaios da luz branca foram as mais elevadas para as três microalgas, sendo que variaram dos 40,5 aos 43,0%. Neste comprimento de onda da luz, o valor mais elevado foi obtido pela *C. vulgaris* e o mais baixo pela *N. oleoabundans*. As menores eficiências de remoção de nitrato foram obtidas com a luz vermelha, atingindo valores de 17,4 a 20,1%. No caso do fosfato, os ensaios com luz branca apresentaram os valores mais elevados de eficiência de remoção (19,1 a 52,8%) e os ensaios com luz vermelha obtiveram os valores mais baixos deste mesmo parâmetro (7,44 a 13,8%). A *N. oleoabundans* apresenta o valor mais elevado de eficiência de remoção de fosfatos relativamente às outras microalgas em estudo para todos os comprimentos de onda da luz (exceto na luz azul, pois a microalga não cresceu nesta condição de luz). A composição da biomassa produzida foi analisada em termos de teor de açúcares. Concluiu-se que a espécie que apresenta maior concentração de açúcares em todos os comprimentos de onda da luz é a *C. vulgaris*. A concentração de açúcares foi maior com luz branca para a *C. vulgaris* e *N. oleoabundans*. No caso da *T. obliquus*, esta obteve a maior concentração de açúcares com a luz vermelha. De um modo geral, as concentrações mais baixas foram obtidas com a luz azul para todas as espécies.

Nos ensaios desenvolvidos em semi-contínuo também foram avaliados os parâmetros de crescimento e remoção de nutrientes, assim como a concentração de açúcares na biomassa. Através dos resultados obtidos concluiu-se que, para ambas as espécies, a taxa de crescimento e as produtividades foram mais elevadas na primeira fase do ensaio. A *C. vulgaris* apresentou valores de concentração de biomassa máxima e de produtividade muito superiores às obtidas pela *T. obliquus* em todas as fases do ensaio. Na primeira fase do ensaio, o crescimento da *C. vulgaris* foi maior comparando

com o resto das fases, sendo que esta espécie cresceu em todas as fases. No caso da *T. obliquus*, verifica-se que a microalga cresceu nas primeira e segunda fases, porém praticamente não cresceu na terceira fase, evidenciando que esta espécie de microalga não é apropriada para produção em semi-contínuo. Tanto as eficiências de remoção de nitrato como as eficiências de remoção de fosfato foram mais elevadas nos ensaios onde a *C. vulgaris* foi utilizada, chegando a valores máximos de 97,1%, no caso dos nitratos, e 93,6%, no caso dos fosfatos, mostrando que esta espécie é adequada para o cultivo/produção em semi-contínuo. As duas microalgas obtiveram valores semelhantes de concentração de açúcares em cada fase, sendo que a segunda fase apresentou concentrações de açúcares maiores, devido a uma maior acumulação nesta fase.

5.2. Trabalhos futuros

Visto que a intensidade luminosa tem uma grande influência nas taxas de crescimento e, conseqüentemente, na remoção dos nutrientes do efluente, era importante testar intensidades luminosas de maior grandeza com a luz branca, mas especialmente com os outros comprimentos de onda utilizados neste estudo, pois foram muito baixos. Além disso, para melhor comparação entre as diferentes condições era importante testar todos os comprimentos de onda da luz na mesma intensidade luminosa.

Outro parâmetro importante de ser avaliado seria o teor de lípidos contidos na biomassa, pois as microalgas são capazes de acumular diferentes quantidades de lípidos dependendo do comprimento de onda utilizado. Além disso, visto que uma das aplicações das microalgas é a produção de biocombustíveis, seria interessante averiguar qual o melhor comprimento de onda para obter a maior concentração destes constituintes. As microalgas também são capazes de produzir vários tipos de pigmentos, sendo pertinente fazer-se uma análise à variação da concentração desses compostos com a variação do comprimento de onda da luz.

Por fim, seria interessante avaliar o crescimento e a remoção de nutrientes das microalgas utilizando uma combinação de diferentes comprimentos de onda da luz, visto que em diferentes estudos encontrados na literatura esta condição de cultivo apresenta resultados superiores aos obtidos quando é utilizado unicamente um comprimento de onda (Katsuda et al., 2004; Zhao et al., 2015).

Por fim, seria importante utilizar efluentes reais de forma a validar os resultados obtidos neste estudo, pois as condições em ensaios com efluentes reais são mais próximas das condições dos processos em grande escala.

Referências bibliográficas

- ABIUSI, F., SAMPIETRO, G., MARTURANO, G., BIONDI, N., RODOLFI, L., D'OTTAVIO, M. & TREDICI, M. R. 2014. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 956-964.
- ADESANYA, V. O., DAVEY, M. P., SCOTT, S. A. & SMITH, A. G. 2014. Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology*, 157, 293-304.
- ALLEN, M. R., FRAME, D. J., HUNTINGFORD, C., JONES, C. D., LOWE, J. A., MEINSHAUSEN, M. & MEINSHAUSEN, N. 2009. Warming caused by cumulative carbon emissions towards the trillionth tonne. *Nature*, 458, 1163-1166.
- ALMOMANI, F. A. & ÖRMECI, B. 2016. Performance of *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. *Ecological Engineering*, 95, 280-289.
- ASLAN, S. & KAPDAN, I. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28, 64-70.
- ATTA, M., IDRIS, A., BUKHARI, A. & WAHIDIN, S. 2013. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373-378.
- BARATA, A. F. L. 2016. *Microalgas: produção económica e ambientalmente sustentável*. Tese de mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- BARBERA, E., SFORZA, E., KUMAR, S., MOROSINOTTO, T. & BERTUCCO, A. 2016. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in liquid hydrolysate from flash hydrolysis for nutrient recycling. *Bioresource Technology*, 207, 59-66.
- BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, USA, CRC press.
- BARTLEY, M. L., BOEING, W. J., DUNGAN, B. N., HOLGUIN, F. O. & SCHAUB, T. 2014. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26, 1431-1437.
- BENMOUSSA-DAHMAN, I., CHTOUROU, H., REZGUI, F., SAYADI, S. & DHOUB, A. 2016. Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella* sp. for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 218, 816-825.
- BERNARD, O. & RÉMOND, B. 2012. Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource Technology*, 123, 520-527.
- BOROWITZKA, M. A. 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25, 743-756.
- BRENNAN, L. & OWENDE, P. 2010. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- BUONO, S., COLUCCI, A., ANGELINI, A., LANGELLOTTI, A. L., MASSA, M., MARTELLO, A., FOGLIANO, V. & DIBENEDETTO, A. 2016. Productivity and biochemical composition of *Tetrademus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3179-3192.
- BUONO, S., LANGELLOTTI, A. L., MARTELLO, A., RINNA, F. & FOGLIANO, V. 2014. Functional ingredients from microalgae. *Food & Function*, 5, 1669-1685.
- CAPELLI, B., JENKINS, U. & CYSEWSKI, G. R. 2013. Role of astaxanthin in sports nutrition. *Nutrition and Enhanced Sports Performance*. Elsevier.

- CARVALHO, A. P., SILVA, S. O., BAPTISTA, J. M. & MALCATA, F. X. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1275-1288.
- CHANG, H.-X., HUANG, Y., FU, Q., LIAO, Q. & ZHU, X. 2016. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresource Technology*, 206, 231-238.
- CHEAH, W. Y., SHOW, P. L., CHANG, J.-S., LING, T. C. & JUAN, J. C. 2015. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 190-201.
- CHEN, B., WAN, C., MEHMOOD, M. A., CHANG, J.-S., BAI, F. & ZHAO, X. 2017. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource Technology*, 244, 1198-1206.
- CHEN, C.-Y., YEH, K.-L., AISYAH, R., LEE, D.-J. & CHANG, J.-S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102, 71-81.
- CHEW, K. W., CHIA, S. R., SHOW, P. L., YAP, Y. J., LING, T. C. & CHANG, J.-S. 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332-344.
- CHEW, K. W., YAP, J. Y., SHOW, P. L., SUAN, N. H., JUAN, J. C., LING, T. C., LEE, D.-J. & CHANG, J.-S. 2017. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- CHOKSHI, K., PANCHAI, I., TRIVEDI, K., GEORGE, B., MAURYA, R., GHOSH, A. & MISHRA, S. 2015. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresource Technology*, 180, 162-171.
- DANESH, A. F., EBRAHIMI, S., SALEHI, A. & PARSA, A. 2017. Impact of nutrient starvation on intracellular biochemicals and calorific value of mixed microalgae. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 56-64.
- DAS, P., LEI, W., AZIZ, S. S. & OBBARD, J. P. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*, 102, 3883-3887.
- DECRETO-LEI N.º 152/97 1997. Decreto-Lei de 19 de Junho de 1997 relativo ao tratamento de águas residuais. DL n.º 152/97. Diário da República.
- DECRETO-LEI N.º 348/98 1998. Decreto-Lei de 9 de Novembro de 1998 que altera o Decreto-Lei n.º 152/97 no que respeita a determinados requisitos estabelecidos no seu Anexo I. DL n.º 348/98. Diário da República.
- DEMIRBAS, A. & DEMIRBAS, M. F. 2010. *Algae energy: algae as a new source of biodiesel*, Springer Science & Business Media.
- DIRETIVA 1991/271/CEE 1991. Diretiva do Conselho Europeu de 21 de Maio de 1991 relativa ao tratamento de águas residuais. 1991/271/CEE Jornal Oficial das Comunidades Europeias L135, 40-52.
- DIRETIVA 1998/15/CE 1998. Diretiva da Comissão Europeia de 27 de Fevereiro de 1998 que altera a Diretiva 91/271/CEE no que respeita a determinados requisitos estabelecidos no seu Anexo I. 1998/15/CE. Jornal Oficial das Comunidades Europeias L67, 29-30.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. T. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- ESCAPA, C., COIMBRA, R., PANIAGUA, S., GARCÍA, A. & OTERO, M. 2017. Comparison of the culture and harvesting of *Chlorella vulgaris* and *Tetrademus obliquus* for the removal of pharmaceuticals from water. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1179-1193.
- FALKOWSKI, P. G. & RAVEN, J. 2007. An introduction to photosynthesis in aquatic systems. *Aquatic Photosynthesis*, 2, 1.

- FOESS, G. W., STEINBRECHER, P., WILLIAMS, K. & GARRETT, G. S. 1998. Cost and performance evaluation of BNR processes. *Florida Water Resources Journal*, 1, 11-13.
- FOX, J. M. & ZIMBA, P. V. 2018. Minerals and Trace Elements in Microalgae. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier.
- FU, W., GUDMUNDSSON, S., WICHUK, K., PALSSON, S., PALSSON, B. O., SALEHI-ASHTIANI, K. & BRYNJÓLFSSON, S. 2019. Sugar-stimulated CO₂ sequestration by the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Science of the Total Environment*, 654, 275-283.
- FULAZZAKY, M. A., ABDULLAH, N. H., YUSOFF, A. R. M. & PAUL, E. 2015. Conditioning the alternating aerobic-anoxic process to enhance the removal of inorganic nitrogen pollution from a municipal wastewater in France. *Journal of Cleaner Production*, 100, 195-201.
- GOH, B. H. H., ONG, H. C., CHEAH, M. Y., CHEN, W.-H., YU, K. L. & MAHLIA, T. M. I. 2019. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 59-74.
- GONCALVES, A. L., PIRES, J. C. & SIMÕES, M. 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403-415.
- GONÇALVES, A. L., PIRES, J. C. & SIMOES, M. 2016a. The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. *RSC Advances*, 6, 22896-22907.
- GONÇALVES, A. L., PIRES, J. C. & SIMÕES, M. 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, 24, 403-415.
- GONÇALVES, A. L., RODRIGUES, C. M., PIRES, J. C. & SIMÕES, M. 2016b. The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. *Algal Research*, 14, 127-136.
- GRIFFITHS, M. J., VAN HILLE, R. P. & HARRISON, S. T. 2014. The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2345-2356.
- GRIS, B., MOROSINOTTO, T., GIACOMETTI, G. M., BERTUCCO, A. & SFORZA, E. 2014. Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2377-2389.
- GUCCIONE, A., BIONDI, N., SAMPIETRO, G., RODOLFI, L., BASSI, N. & TREDICI, M. R. 2014. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 84.
- GUPTA, P. L., LEE, S.-M. & CHOI, H.-J. 2015. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1409-1417.
- HAJAR, H. A., RIEFLER, R. & STUART, B. 2017. Cultivation of the microalga *Neochloris oleoabundans* for biofuels production and other industrial applications (a review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53, 640-653.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, A., VELÁSQUEZ-ORTA, S. B., NOVELO, E., YÁÑEZ-NOGUEZ, I., MONJE-RAMÍREZ, I. & LEDESMA, M. T. O. 2019. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 435-444.
- HO, S.-H., CHEN, C.-Y., LEE, D.-J. & CHANG, J.-S. 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - a review. *Biotechnology Advances*, 29, 189-198.
- HO, S.-H., NAKANISHI, A., KATO, Y., YAMASAKI, H., CHANG, J.-S., MISAWA, N., HIROSE, Y., MINAGAWA, J., HASUNUMA, T. & KONDO, A. 2017. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4. *Scientific Reports*, 7, 45471.
- HODAIFA, G., MARTÍNEZ, M. E. & SÁNCHEZ, S. 2009. Influence of pH on the culture of *Scenedesmus obliquus* in olive-mill wastewater. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 854-860.

- HODAIFA, G., SÁNCHEZ, S., MARTÍNEZ, M. E. & ÓRPEZ, R. 2013. Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium. *Applied Energy*, 104, 345-352.
- HOEBLER, C., BARRY, J. L., DAVID, A. & DELORT-LAVAL, J. 1989. 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*, 37, 360-367.
- HU, J., NAGARAJAN, D., ZHANG, Q., CHANG, J.-S. & LEE, D.-J. 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36, 54-67.
- HU, Q. 2004. Environmental effects on cell composition. In: RICHMOND, A. (ed.) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- HULTBERG, M., JÖNSSON, H. L., BERGSTRAND, K.-J. & CARLSSON, A. S. 2014. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 159, 465-467.
- HUO, S., CHEN, J., ZHU, F., ZOU, B., CHEN, X., BASHEER, S., CUI, F. & QIAN, J. 2019. Filamentous microalgae *Tribonema* sp. cultivation in the anaerobic/oxic effluents of petrochemical wastewater for evaluating the efficiency of recycling and treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 145, 27-32.
- JACOB-LOPES, E., MARONEZE, M. M., DEPRÁ, M. C., SARTORI, R. B., DIAS, R. R. & ZEPKA, L. Q. 2018. Bioactive food compounds from microalgae: An innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 25, 1-7.
- JEYANAYAGAM, S. 2005. True confessions of the biological nutrient removal process. *Florida Water Resources Journal*, 1, 37-46.
- JI, X., CHENG, J., GONG, D., ZHAO, X., QI, Y., SU, Y. & MA, W. 2018. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002. *Science of the Total Environment*, 633, 593-599.
- JIANG, Y., ZHANG, W., WANG, J., CHEN, Y., SHEN, S. & LIU, T. 2013. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 128, 359-364.
- KAMIYA, A. & SAITOH, T. 2002. Blue-light-control of the uptake of amino acids and of ammonia in *Chlorella* mutants. *Physiologia Plantarum*, 116, 248-254.
- KATSUDA, T., LABABPOUR, A., SHIMAHARA, K. & KATOH, S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 81-86.
- KAZBAR, A., COGNE, G., URBAIN, B., MAREC, H., LE-GOUIC, B., TALLEC, J., TAKACHE, H., ISMAIL, A. & PRUVOST, J. 2019. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39, 101432.
- KHAN, M. I., SHIN, J. H. & KIM, J. D. 2018. 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*, 17, 36.
- KIM, B.-H., RAMANAN, R., KANG, Z., CHO, D.-H., OH, H.-M. & KIM, H.-S. 2016. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity. *Biomass and Bioenergy*, 85, 300-305.
- KIM, T.-H., LEE, Y., HAN, S.-H. & HWANG, S.-J. 2013. The effects of wavelength and wavelength mixing ratios on microalgae growth and nitrogen, phosphorus removal using *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 130, 75-80.
- KIRCHMAN, D. L. 2018. *Processes in microbial ecology*, Oxford University Press.
- KISS, B. & NÉMETH, Á. 2019. High-throughput microalgae cultivation with adjustable LED-module applying different colours for *Nannochloropsis* and *Chlorella* microcultures. *Acta Alimentaria*, 48, 115-124.

- KLINTHONG, W., YANG, Y.-H., HUANG, C.-H. & TAN, C.-S. 2015. A review: microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research*, 15, 712-742.
- KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X. & VAN LANGENHOVE, H. 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*, 28, 371-380.
- LAM, M. K., LEE, K. T. & MOHAMED, A. R. 2012. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 10, 456-469.
- LOERA-QUEZADA, M., ANGELES, G. & OLGUÍN, E. 2011. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2, 8.
- LOMAS, M. W. & GLIBERT, P. M. 2000. Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *Journal of Phycology*, 36, 903-913.
- MALHOTRA, S. K., LEE, G. F. & ROHLICH, G. 1964. Nutrient removal from secondary effluent by alum flocculation and lime precipitation. *International Journal of Air and Water Pollution*, 8, 487-500.
- MANIRAFASHA, E., NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., LU, Y. & JING, K. 2016. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282-296.
- MANTZOROU, A. & VERVERIDIS, F. 2018. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. *Science of The Total Environment*, 651, 3187-3201.
- MATA, T. M., MARTINS, A. A. & CAETANO, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- MEJIA RENDON, S. 2014. *Effects of light, CO₂ and reactor design on growth of algae: An experimental approach to increase biomass production*. PhD, The University of Guelph
- MENG, C., HUANG, J., YE, C., CHENG, W., CHEN, J. & LI, Y. 2015. Comparing the performances of circular ponds with different impellers by CFD simulation and microalgae culture experiments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 1347-1363.
- MOBIN, S. & ALAM, F. 2017. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. *Energy Procedia*, 110, 510-517.
- MOHSENPOUR, S. F., RICHARDS, B. & WILLOUGHBY, N. 2012. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresource Technology*, 125, 75-81.
- MOON, M., KIM, C. W., PARK, W.-K., YOO, G., CHOI, Y.-E. & YANG, J.-W. 2013. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 2, 352-357.
- NADZIR, S. M., YUSOF, N., NORDIN, N., ABDULLAH, H. & KAMARI, A. Combination effect of temperature and light intensity on lipid productivity of *Tetrademus obliquus*. *Journal of Physics: Conference Series*, 2018. IOP Publishing, 012038.
- NIEDERWIESER, T., KOCIOLEK, P. & KLAUS, D. 2018. Spacecraft cabin environment effects on the growth and behavior of *Chlorella vulgaris* for life support applications. *Life Sciences in Space Research*, 16, 8-17.
- PANCHA, I., CHOKSHI, K., MAURYA, R., TRIVEDI, K., PATIDAR, S. K., GHOSH, A. & MISHRA, S. 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
- PANDIT, P. R., FULEKAR, M. H. & KARUNA, M. S. L. 2017. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 13437-13451.
- PANIS, G. & CARREON, J. R. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18, 175-190.

- PARMAR, A., SINGH, N. K., PANDEY, A., GNANSOUNOU, E. & MADAMWAR, D. 2011. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102, 10163-10172.
- PEDERSEN, O., COLMER, T. D. & SAND-JENSEN, K. 2013. Underwater photosynthesis of submerged plants—recent advances and methods. *Frontiers in Plant Science*, 4, 140.
- PENG, L., LAN, C. Q., ZHANG, Z., SARCH, C. & LAPORTE, M. 2015. Control of protozoa contamination and lipid accumulation in *Neochloris oleoabundans* culture: effects of pH and dissolved inorganic carbon. *Bioresource Technology*, 197, 143-151.
- PEREIRA, S., GONÇALVES, A., MOREIRA, F., SILVA, T., VILAR, V. & PIRES, J. 2016. Nitrogen removal from Landfill leachate by microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1926.
- PIAO, W., KIM, Y., KIM, H., KIM, M. & KIM, C. 2015. Life cycle assessment and economic efficiency analysis of integrated management of wastewater treatment plants. *Journal of Cleaner Production*, 113, 325-337.
- PIRES, J., GONÇALVES, A., MARTINS, F., ALVIM-FERRAZ, M. & SIMÕES, M. 2014. Effect of light supply on CO₂ capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 19, 1109-1117.
- RASHIDI, B. & TRINDADE, L. M. 2018. Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Neochloris oleoabundans* cell wall. *Algal Research*, 35, 152-159.
- RASO, S., VAN GENUGTEN, B., VERMUE, M. & WIJFFELS, R. H. 2012. Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *Journal of Applied Phycology*, 24, 863-871.
- RAWAT, I., KUMAR, R., MUTANDA, T. & BUX, F. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 3411-3424.
- RENUKA, N., SOOD, A., RATHA, S. K., PRASANNA, R. & AHLUWALIA, A. S. 2013. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25, 1529-1537.
- RUGNINI, L., ELLWOOD, N. T. W., COSTA, G., FALSETTI, A., CONGESTRI, R. & BRUNO, L. 2019. Scaling-up of wastewater bioremediation by *Tetrademus obliquus*, sequential bio-treatments of nutrients and metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 59-64.
- RUIZ, J., ARBIB, Z., ÁLVAREZ-DÍAZ, P., GARRIDO-PÉREZ, C., BARRAGÁN, J. & PERALES, J. 2013. Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater. *Environmental Technology*, 34, 979-991.
- SAFI, C., ZEBIB, B., MERAH, O., PONTALIER, P.-Y. & VACA-GARCIA, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
- SALADINI, F., PATRIZI, N., PULSELLI, F. M., MARCHETTINI, N. & BASTIANONI, S. 2016. Guidelines for emergy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 221-227.
- SARATALE, R. G., KUMAR, G., BANU, R., XIA, A., PERIYASAMY, S. & SARATALE, G. D. 2018. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresource Technology*, 262, 319-332.
- SATHASIVAM, R., RADHAKRISHNAN, R., HASHEM, A. & ABD_ALLAH, E. F. 2017. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 709-722.
- SCHULZE, P. S., PEREIRA, H. G., SANTOS, T. F., SCHUELER, L., GUERRA, R., BARREIRA, L. A., PERALES, J. A. & VARELA, J. C. 2016. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Algal Research*, 16, 387-398.

- SERRA-MAIA, R., BERNARD, O., GONÇALVES, A., BENSALÉM, S. & LOPES, F. 2016. Influence of temperature on *Chlorella vulgaris* growth and mortality rates in a photobioreactor. *Algal Research*, 18, 352-359.
- SFORZA, E., GRIS, B., DE FARIAS SILVA, C., MOROSINOTTO, T. & BERTUCCO, A. 2014. Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 38, 211.
- SHEN, X.-F., LIU, J.-J., CHU, F.-F., LAM, P. K. & ZENG, R. J. 2015. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation. *Applied Energy*, 158, 348-354.
- SHU, C.-H. & TSAI, C.-C. 2016. Enhancing oil accumulation of a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* using fish waste hydrolysate. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 67, 377-384.
- SILVA-BENAVIDES, A. M. & TORZILLO, G. 2012. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24, 267-276.
- SILVA, N. F., GONÇALVES, A. L., MOREIRA, F., SILVA, T., MARTINS, F. G., ALVIM-FERRAZ, M., BOAVENTURA, R., VILAR, V. & PIRES, J. 2015. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Research*, 11, 350-358.
- SIMAS-RODRIGUES, C., VILLELA, H. D., MARTINS, A. P., MARQUES, L. G., COLEPICOLO, P. & TONON, A. P. 2015. Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. *Journal of Experimental Botany*, 66, 4097-4108.
- SINGH, S., KATE, B. & BANERJEE, U. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73-95.
- SINGH, S. & SINGH, P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. & ISAMBERT, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- SRINUANPAN, S., CHEIRSILP, B., PRASERTSAN, P., KATO, Y. & ASANO, Y. 2018. Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: Nutrient starvations and cost-effective harvesting process. *Renewable Energy*, 122, 507-516.
- SUN, X.-M., GENG, L.-J., REN, L.-J., JI, X.-J., HAO, N., CHEN, K.-Q. & HUANG, H. 2018. Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. *Bioresource Technology*, 250, 868-876.
- TANG, D., HAN, W., LI, P., MIAO, X. & ZHONG, J. 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102, 3071-3076.
- TARAYRE, C., NGUYEN, H.-T., BROGNAUX, A., DELEPIERRE, A., DE CLERCQ, L., CHARLIER, R., MICHELS, E., MEERS, E. & DELVIGNE, F. 2016. Characterisation of phosphate accumulating organisms and techniques for polyphosphate detection: a review. *Sensors*, 16, 797.
- TEO, C. L., ATTA, M., BUKHARI, A., TAISIR, M., YUSUF, A. M. & IDRIS, A. 2014. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource technology*, 162, 38-44.
- THIANSATHIT, W., KEENER, T. C., KHANG, S.-J., RATPUKDI, T. & HOVICHITR, P. 2015. The kinetics of *Scenedesmus obliquus* microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas. *Biomass and Bioenergy*, 76, 79-85.
- TORRES-CARVAJAL, L., GONZÁLEZ-DELGADO, A., BARAJAS, A. & URBINA-SUAREZ, N. 2017. The effects of wavelength and salinity on biomass production from *Haematococcus pluvialis*. *Contemporary Engineering Sciences*, 10, 1693-1700.

- URRETA, I., IKARAN, Z., JANICES, I., IBAÑEZ, E., CASTRO-PUYANA, M., CASTAÑÓN, S. & SUÁREZ-ALVAREZ, S. 2014. Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. *Algal Research*, 5, 16-22.
- VARFOLOMEEV, S. & WASSERMAN, L. 2011. Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 789-807.
- VO, T. & TRAN, D. 2014. Effects of salinity and light on growth of *Dunaliella* isolates. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 208-211.
- VUPPALADADIYAM, A. K., PRINSEN, P., RAHEEM, A., LUQUE, R. & ZHAO, M. 2018. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12, 304-324.
- WANG, B., LI, Y., WU, N. & LAN, C. Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 707-718.
- WANG, C. & LAN, C. Q. 2018. Effects of shear stress on microalgae—A review. *Biotechnology Advances*, 36, 986-1002.
- WANG, X.-J., XIA, S.-Q., CHEN, L., ZHAO, J.-F., RENAULT, N. & CHOVELON, J.-M. 2006. Nutrients removal from municipal wastewater by chemical precipitation in a moving bed biofilm reactor. *Process Biochemistry*, 41, 824-828.
- WHITTON, R., LE MÉVEL, A., PIDOU, M., OMETTO, F., VILLA, R. & JEFFERSON, B. 2016. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371-378.
- WILLIAMS, P. J. L. B. & LAURENS, L. M. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3, 554-590.
- WONG, Y.-K. 2016. Effects of light intensity, illumination cycles on microalgae *Haematococcus Pluvialis* for production of astaxanthin. *Journal of Marine Biology and Aquaculture*, 2, 0-0.
- YAN, C., LUO, X. & ZHENG, Z. 2013a. Performance of purifying anaerobic fermentation slurry using microalgae in response to various LED light wavelengths and intensities. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88, 1622-1630.
- YAN, C., ZHAO, Y., ZHENG, Z. & LUO, X. 2013b. Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. *Biodegradation*, 24, 721-732.
- YEN, H.-W. Y., HU, I.-C., CHEN, C.-Y. & CHANG, J.-S. 2013. Design of photobioreactors for algal cultivation. In: PANDEY, A., LEE, D.-J., CHISTI, Y. & SOCCOL, C. R. (eds.) *Biofuels from Algae*. 1 ed. USA: Elsevier.
- ZANG, Y., LI, Y., WANG, C., ZHANG, W. & XIONG, W. 2015. Towards more accurate life cycle assessment of biological wastewater treatment plants: a review. *Journal of Cleaner Production*, 107, 676-692.
- ZHAN, J., RONG, J. & WANG, Q. 2017. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42, 8505-8517.
- ZHANG, L., PEI, H., CHEN, S., JIANG, L., HOU, Q., YANG, Z. & YU, Z. 2018. Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae. *Bioresource Technology*, 250, 449-456.
- ZHAO, Y., SUN, S., HU, C., ZHANG, H., XU, J. & PING, L. 2015. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various mixed light-emitting diode light wavelengths. *Bioresource Technology*, 187, 338-345.

Anexos

Anexo A.1. Valores de temperatura e pH para os ensaios com diferentes comprimentos de onda

Os valores de temperatura e pH medidos ao longo dos ensaios estão apresentados seguintes tabelas:

Tabela A.1: 1 – Valores de temperatura e pH da *C. vulgaris* para os ensaios com diferentes comprimentos de onda

Tempo (d)	Luz branca		Luz vermelha		Luz azul	
	pH	T	pH	T	pH	T
0	6,89 ± 0,01	17,6 ± 0,1	7,3 ± 0,1	24,1 ± 0,1	7,28 ± 0,01	20,8 ± 0,2
1	7,96 ± 0,07	19 ± 1	7,89 ± 0,01	20,8 ± 0,1	7,66 ± 0,01	25 ± 1
2	8,1 ± 0,1	20 ± 1	7,88 ± 0,01	19,6 ± 0,1	7,78 ± 0,01	25 ± 2
3	8,00 ± 0,02	21 ± 1	7,97 ± 0,04	18,2 ± 0,1	7,74 ± 0,01	22,3 ± 0,1
4	8,1 ± 0,1	20,7 ± 0,1	8,00 ± 0,06	17,2 ± 0,1	7,72 ± 0,01	23,7 ± 0,2
7	8,2 ± 0,2	21,9 ± 0,1	7,9 ± 0,2	20,4 ± 0,7	7,90 ± 0,02	21,1 ± 0,1
8	8,3 ± 0,2	20,6 ± 0,1	8,09 ± 0,05	21,4 ± 0,1	7,75 ± 0,04	21,1 ± 0,1
9	8,2 ± 0,1	20,3 ± 0,3	8,08 ± 0,01	22,5 ± 0,3	7,84 ± 0,07	21,7 ± 0,4
10	8,2 ± 0,1	19,4 ± 0,5	8,10 ± 0,01	22,3 ± 0,3	7,78 ± 0,04	22,2 ± 0,3
11	8,3 ± 0,2	19,4 ± 0,1	8,16 ± 0,02	21,9 ± 0,1	7,90 ± 0,04	21,1 ± 0,1

Tabela A.1: 2 – Valores de temperatura e pH da *T. obliquus* para os ensaios com diferentes comprimentos de onda

Tempo (d)	Luz branca		Luz vermelha		Luz azul	
	pH	T	pH	T	pH	T
0	7,0 ± 0,1	21,1 ± 0,2	6,88 ± 0,08	23,9 ± 0,1	7,25 ± 0,02	20,9 ± 0,2
1	7,80 ± 0,03	20 ± 2	7,66 ± 0,08	20,9 ± 0,2	7,58 ± 0,01	25 ± 1
2	7,72 ± 0,04	21 ± 2	7,60 ± 0,04	19,7 ± 0,1	7,77 ± 0,08	25 ± 2
3	7,84 ± 0,01	20,1 ± 0,4	7,6 ± 0,2	18,3 ± 0,1	7,70 ± 0,04	22,2 ± 0,2
4	8,11 ± 0,09	21,6 ± 0,4	7,7 ± 0,1	17,2 ± 0,1	7,70 ± 0,07	23,1 ± 0,1
7	8,5 ± 0,2	21,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	20,4 ± 0,5	7,81 ± 0,01	21,1 ± 0,2
8	8,5 ± 0,3	20,7 ± 0,3	8,79 ± 0,04	21,1 ± 0,1	7,87 ± 0,06	21,1 ± 0,9
9	8,6 ± 0,4	18,3 ± 0,1	7,80 ± 0,06	22,3 ± 0,1	7,82 ± 0,09	21,2 ± 0,1
10	8,6 ± 0,6	17,3 ± 0,1	7,86 ± 0,09	22,1 ± 0,1	7,82 ± 0,07	21,6 ± 0,4
11	8,9 ± 0,7	16,4 ± 0,3	7,87 ± 0,02	21,6 ± 0,1	7,73 ± 0,04	21,0 ± 0,1

Tabela A.1: 3 – Valores de temperatura e pH da *N. oleoabundans* para os ensaios com diferentes comprimentos de onda

Tempo (d)	Luz branca		Luz vermelha		Luz azul	
	pH	T	pH	T	pH	T
0	6,87	21,4	6,9 ± 0,1	18,1 ± 0,1	6,79 ± 0,08	18,1 ± 0,2
1	7,85	21,1	7,57 ± 0,03	20,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2	17,5 ± 0,1
2	7,82	21,0	7,63 ± 0,01	22,1 ± 0,2	7,7 ± 0,2	22 ± 1
3	8,00	21,0	7,67 ± 0,01	21,8 ± 0,1	7,8 ± 0,2	20,6 ± 0,7
4	8,29	22,6	7,64 ± 0,06	21,3 ± 0,1	7,8 ± 0,1	21,1 ± 0,8
7	8,25	21,0	7,67 ± 0,08	23,7 ± 0,1	7,7 ± 0,2	21,5 ± 0,4
8	8,24	20,4	7,61 ± 0,08	22,8 ± 0,2	7,6 ± 0,2	21,2 ± 0,2
9	8,26	18,1	7,64 ± 0,03	24,3 ± 0,1	7,7 ± 0,2	18,9 ± 0,1
10	8,28	17,7	7,61 ± 0,03	25,6 ± 0,4	7,7 ± 0,1	17,9 ± 0,1
11	8,48	17,6	7,6 ± 0,2	23,4 ± 0,4	7,6 ± 0,2	18,8 ± 0,1

Anexo A.2. Reta de calibração da densidade ótica *versus* concentração de biomassa

As retas de calibração de DO₆₈₀ *versus* concentração de biomassa para *C. vulgaris*, *T. obliquus* e *N. oleoabundans* estão representadas na Figura A.2: 1.

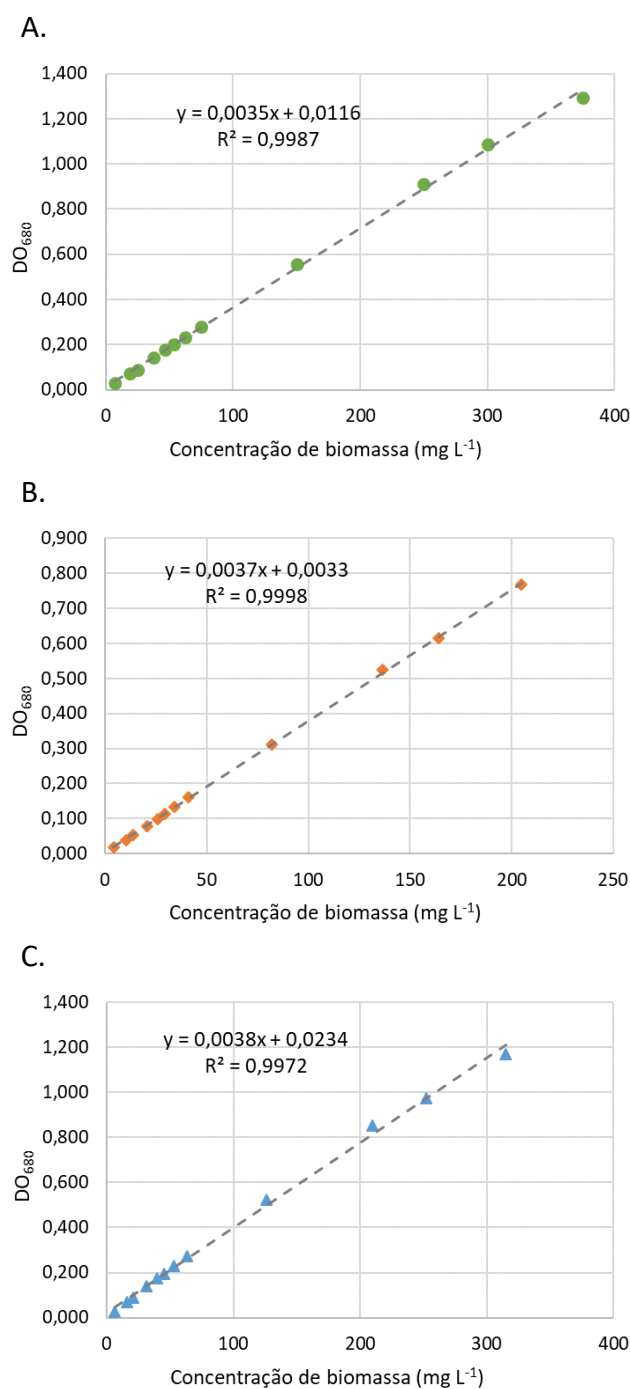


Figura A.2: 1 – Retas de calibração da concentração da biomassa para as espécies *C. vulgaris* (A), *T. obliquus* (B) e *N. oleoabundans* (C).

Anexo A.3. Retas de calibração usadas nas medições de cromatografia iônica

Tabela A.3: 1 – Curvas de calibração usadas para cálculo da concentração dos iões analisados

Ião	Gama de aplicação (µS min)	Reta de calibração	R ²
NO ₃ ⁻	0 – 0,07	y = 0,0685x + 0,0013	0,9976
	0,01 – 4,63	y = 0,0933x - 0,0934	0,9989
PO ₄ ³⁻	0 – 0,15	y = 0,0334x - 0,0144	0,9971
	0 – 2,50	y = 0,0507x - 0,0966	0,9967
Cl ⁻	0 – 0,11	y = 0,1085x - 0,0003	0,9973
	0,11 – 8,40	y = 0,1701x - 0,1555	0,9995
SO ₄ ²⁻	0 – 0,08	y = 0,0796x - 0,0053	0,9969
	0,08 – 6,10	y = 0,1234x - 0,1379	0,9992
NO ₂ ⁻	0,03 – 0,11	y = 0,0910x + 0,0220	0,9970
	0,06 – 5,25	y = 0,1061x + 0,0021	0,9997

Anexo A.4. Reta de calibração da concentração de açúcares

Na Figura A.4: 1 está apresentada a reta de calibração de absorvância a 490 nm *versus* concentração de glicose.

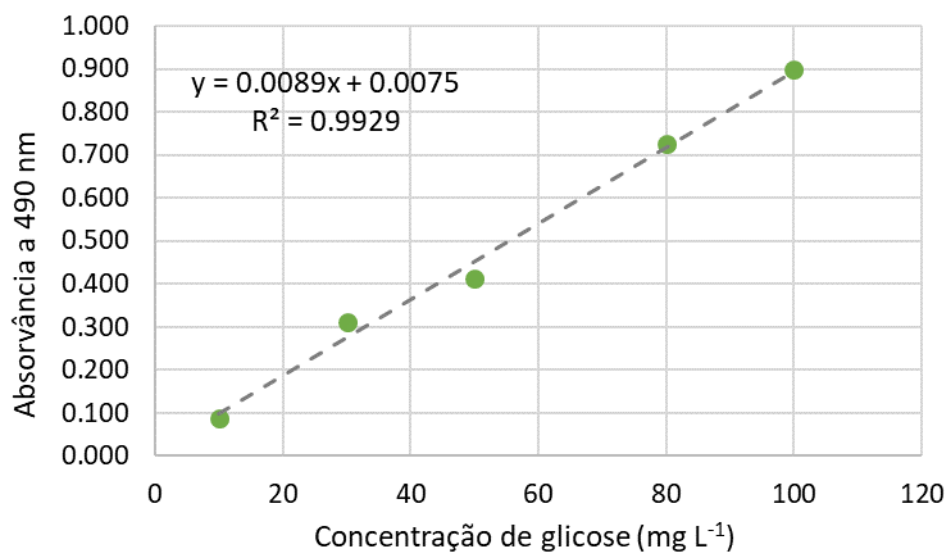
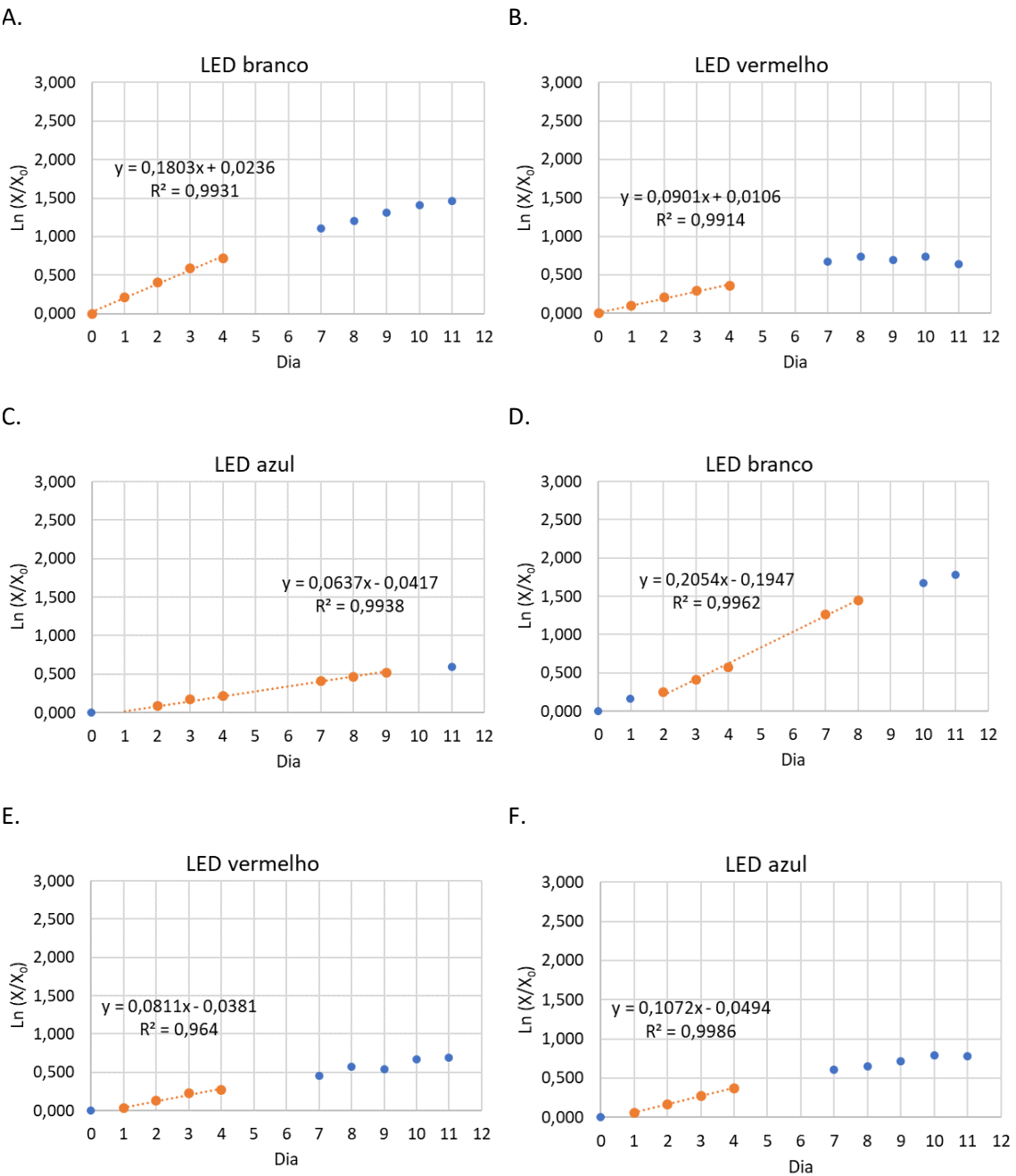
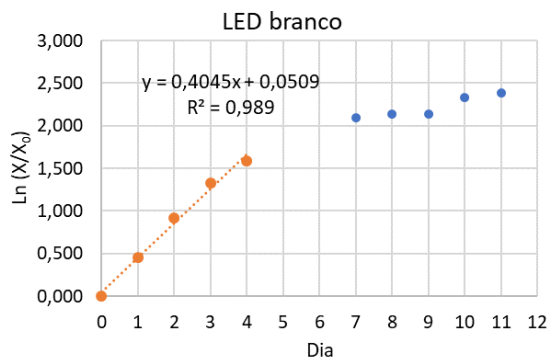


Figura A.4: 1 – Reta de calibração de absorvância a 490 nm *versus* concentração de glicose.

Anexo A.5. Representação gráfica de $\ln(X)$ em função do tempo para as diferentes condições de luz



G.



H.

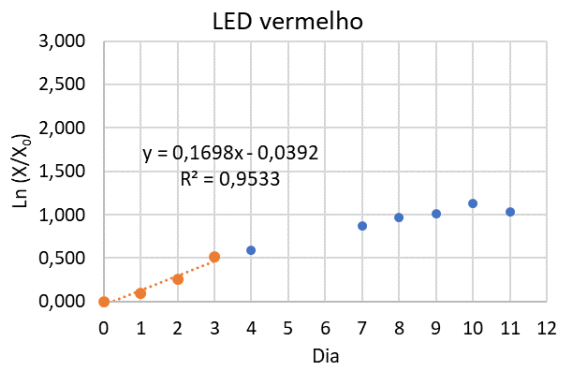
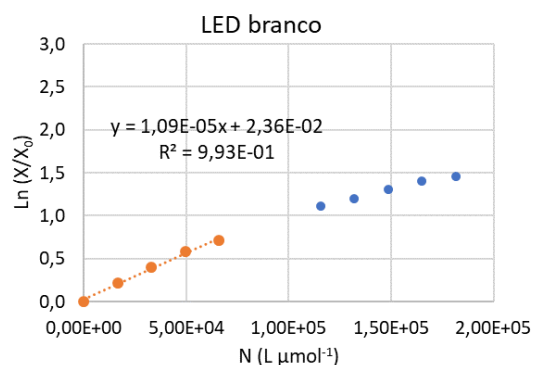


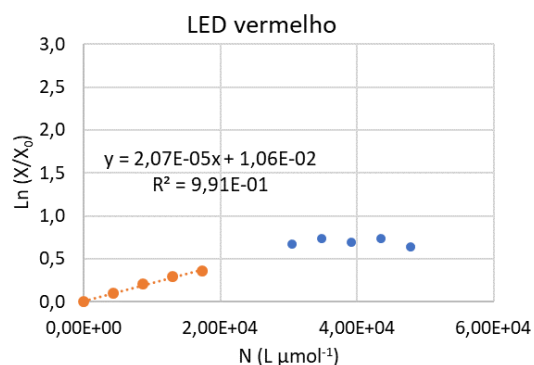
Figura A.5: 1 – Representação gráfica de $\ln(X)$ em função do tempo para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C e F) para as espécies *C. vulgaris* (A, B, C), *T. obliquus* (D, E, F) e *N. oleoabundans* (G e H). O gráfico relativo à *N. oleoabundans* nas condições de luz azul não está representado porque a microalga não cresceu nessas condições. Os pontos a laranja representam a fase exponencial de crescimento.

Anexo A.6. Representação gráfica de $\ln(X)$ em função da quantidade de fótons acumulada para as diferentes condições de luz

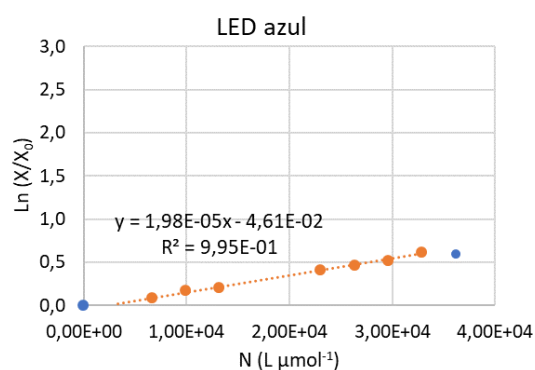
A.



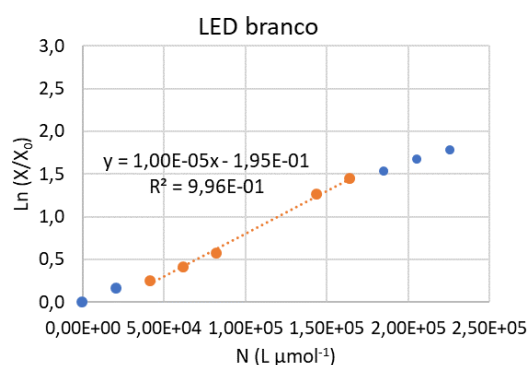
B.



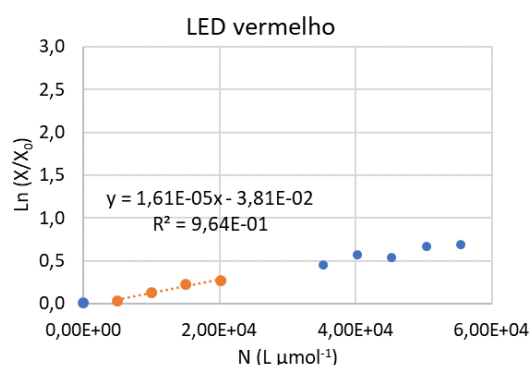
C.



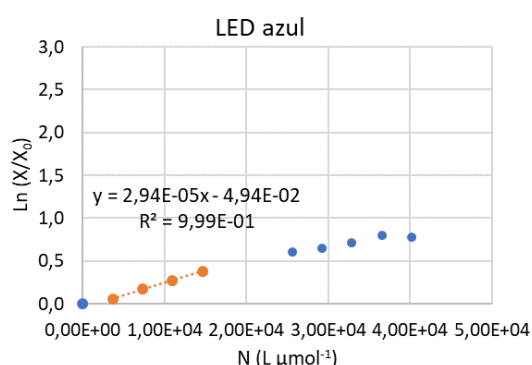
D.



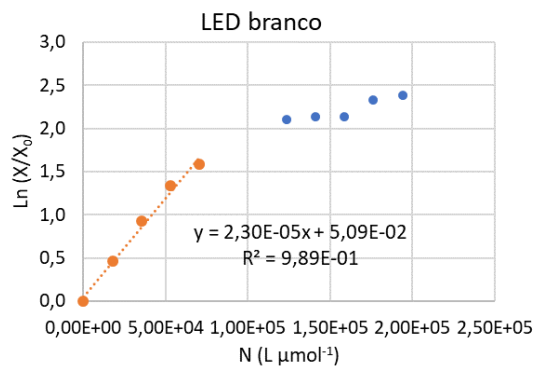
E.



F.



G.



H.

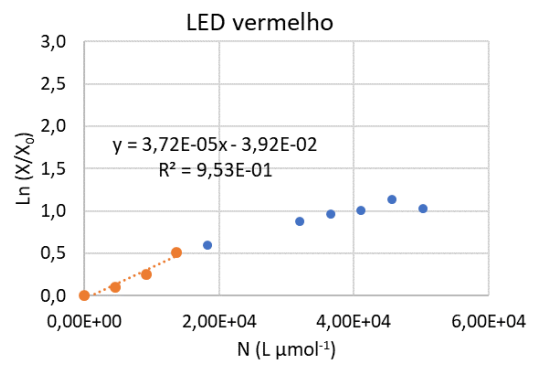


Figura A.6: 1– Representação gráfica de $\ln(X)$ em função da quantidade de fótons acumulada para as diferentes condições: LED branco (A, D, G), LED vermelho (B, E, H) e LED azul (C e F) para as espécies *C. vulgaris* (A, B, C), *T. obliquus* (D, E, F) e *N. oleoabundans* (G e H). O gráfico relativo à *N. oleoabundans* nas condições de luz azul não está representado porque a microalga não cresceu nessas condições. Os pontos a laranja representam a fase exponencial de crescimento.