



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE *Chlorella kessleri* LEB 113 E  
*Chlamydomonas reinhardtii*

LENON MEDEIROS BAUER

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS

Orientador

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE *Chlorella kessleri* LEB 113 E  
*Chlamydomonas reinhardtii*

LENON MEDEIROS BAUER

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia e Ciência de  
Alimentos.

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS

Orientador

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANA PRISCILA CENTENO DA ROSA

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

B344a Bauer, Lenon Medeiros.

Ação de campos magnéticos no cultivo de *Chlorella kessleri* LEB 113 e *Chlamydomonas reinhardtii* / Lenon Medeiros Bauer. – 2016.  
119 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,  
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,  
Rio Grande/RS, 2016.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lucielen Oliveira dos Santos.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Priscila Centeno da Rosa.

1. Atividade antioxidante 2. Bioestimulação 3. Carotenóides  
4. Clorofilas I. Santos, Lucielen Oliveira dos II. Rosa, Ana Priscila Centeno da  
II. Título.

CDU 639.64

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Lenon Medeiros Bauer e aprovada em 28 de março de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

---

(orientador)  
(Origem)

---

(coorientador)  
(Origem)

---

(membro)  
(Origem)

---

(membro)  
(Origem)

---

(membro)  
(Origem)



*Dedico este trabalho aos meus amados pais*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar capacidade para vencer cada obstáculo em minha caminhada, me dando oportunidade para crescer a cada desafio.

Aos meus pais, Claudiomar Bauer e Roseli Medeiros Bauer, pelo amor, amizade e compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora, Professora Lucielen Oliveira dos Santos, pelos ensinamentos, contribuições para o meu crescimento profissional, paciência e pela oportunidade de trabalhar com algo tão encantador.

À minha co-orientadora, Professora Ana Priscila Centeno da Rosa, pelo carinho, amizade, disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

Aos Professores da banca Elisangela M. Radmann, Michele G. de Moraes e Paulo F. M. Duarte Filho pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Professor Jorge Alberto Vieira Costa, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À querida Professora Eliana Badiale Furlong, pela carinhosa disponibilidade de sanar as dúvidas recorrentes durante a execução deste trabalho.

À Professora Maria da Glória Calado Inglês Esquível pela gentileza de doar as cepas de *Chlamydomonas* para a realização deste estudo.

À minha iniciante científica, Ana Luiza Terra, pela amizade, dedicação e grande ajuda na realização prática deste trabalho.

Aos meus queridos amigos, Aline Massia, Douglas Timm e Fatiele Bonow, pela valiosa amizade que levaremos para a vida, companheirismo nos momentos de dificuldades e pela alegria persistente em todos os dias. Vocês tornaram mais leve e gratificante essa jornada.

À querida amiga Denise Prates, pela amizade, apoio, conselhos, risadas e pela colaboração fundamental na etapa inicial desta dissertação, responsável por me ensinar tudo sobre os cultivos de microalgas.

À querida amiga Thaisa Santos, pela amizade, paciência, conselhos e apoio durante a realização prática deste trabalho.

À minha amiga Juliana Moreira, pela amizade e apoio dentro e fora do laboratório.

Aos queridos amigos e integrantes do LEB/MIB/BIOTEC, Aline Massia, Bárbara Freitas, Cristiane Lisboa, Denise Prates, Etiele Moraes, Fatiele Bonow, Gabriel Rosa, Gisele Moro, Jessica Duarte, Juliana Moreira, Kricelle Deamici, Luiza Moraes, Milene Barcia e Thaisa Santos, pela amizade, convivência, alegrias e risadas, mas principalmente por me receberem de braços abertos no laboratório e estarem sempre dispostos a me ajudar.

À toda equipe LEB/MIB/BIOTEC que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À FURG, por disponibilizar ensino gratuito e de qualidade.

*Tudo começa a partir de um SIM. SIM eu quero, SIM eu faço, SIM eu vou, SIM eu acredito, SIM eu consigo! Então SIM, você pode!*

*Fran Ximenes*



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1** - Efeitos de diferentes intensidades de CM e tempos de exposição sobre diversos organismos.....33

### CAPÍTULO III

#### ARTIGO I – INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM CULTIVOS DE *Chlorella kessleri*: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PROXIMAL, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E ANTIOXIDANTE

**Tabela 1** - Concentração de biomassa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ), produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) obtidos nos cultivos de *Chlorella kessleri* LEB 113 com aplicação de 30 mT, 60 mT, em diferentes tempos e do cultivo controle. ....63

**Tabela 2** - Relação entre os valores dos parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. kessleri* LEB 113.....64

**Tabela 3** - Teor de proteínas, carboidratos, lipídios, em base seca, da biomassa de LEB 113 cultivada com 30 mT e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e por 1 h d<sup>-1</sup> e do cultivo controle.....63

**Tabela 4** - Relação entre os valores de composição proximal obtidos nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. kessleri* LEB 113.....66

**Tabela 5** - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS<sup>+</sup>. ....71

#### ARTIGO II – AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* COM E SEM PAREDE CELULAR

**Tabela 1** - Concentração de biomassa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ) e produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ ) obtidos nos cultivos de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1 com aplicação de 11 mT, 20 mT, e do cultivo controle. ....91

**Tabela 2** - Teor de proteínas, carboidratos, lipídios, em base seca, da biomassa de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1 cultivada com 11 e 20 mT e dos cultivos controle. ....93

**Tabela 3** - Relação entre a composição proximal obtidas nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1.....94

**Tabela 4** - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS<sup>+</sup>. ....100

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1</b> - Microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 2137 (aumento de 50X).....	29
<b>Figura 2</b> - Microalga <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113 (aumento de 40X).....	31
<b>Figura 3</b> - Formação de pares radicais em estados singleto e tripleto. ....	38
<b>Figura 4</b> - Representação da estrutura do $\beta$ -caroteno.....	39
<b>Figura 5</b> - Ação dos carotenoides na presença de $^1\text{O}_2$ e frente a um radical livre. ....	40
<b>Figura 6</b> - Estabilização do radical DPPH. ....	42
<b>Figura 7</b> - Estabilização do radical ABTS <sup>+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	43

### CAPÍTULO III

#### ARTIGO I - INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM CULTIVOS DE *Chlorella kessleri*: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PROXIMAL, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E ANTIOXIDANTE

<b>Figura 1</b> – Fotobiorreatores com ímãs de ferrite adaptados (a) e moldes do cultivo controle (b).....	53
<b>Figura 2</b> - Concentração de biomassa de <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113 cultivada com intensidade de 30 mT e 60 mT, em diferentes tempos de aplicação, 24 h d <sup>-1</sup> (□), 1 h d <sup>-1</sup> (▲) e o cultivo controle (●). ....	66
<b>Figura 3</b> – Concentração de clorofila <i>a</i> ao longo do tempo dos cultivos de <i>C. kessleri</i> LEB 113 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	68
<b>Figura 4</b> - Concentração de clorofila <i>b</i> ao longo do tempo dos cultivos de <i>C. kessleri</i> LEB 113 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	69
<b>Figura 5</b> - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo dos cultivos de <i>C. kessleri</i> LEB 113 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	70

#### ARTIGO II – AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE *Chlamydomonas reinhardtii* COM E SEM PAREDE CELULAR

<b>Figura 1</b> - Preparo dos pré-inóculos.....	82
<b>Figura 2</b> - Esquema da aplicação dos ímãs no biorreator.....	83

<b>Figura 3</b> - Concentração de biomassa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 2137 (a) e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Wt-S1 (b) cultivadas com intensidades de 11 mT (□) e 20 mT (▲) expostos por 1 h d <sup>-1</sup> , e do cultivo controle (●).....	89
<b>Figura 4</b> - Concentração de clorofila <i>a</i> ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle. ....	95
<b>Figura 5</b> - Concentração de clorofila <i>b</i> ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle. ....	96
<b>Figura 6</b> - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	96
<b>Figura 7</b> - Concentração de clorofila <i>a</i> ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	97
<b>Figura 8</b> - Concentração de clorofila <i>b</i> ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.....	98
<b>Figura 9</b> - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo, dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle. ....	98



## NOMENCLATURA

ANOVA	Análise de variância
% m.m <sup>-1</sup>	Concentração percentual em massa
% v.v <sup>-1</sup>	Concentração percentual em volume
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Cultivo controle
CM	Campos magnéticos
FBRTv	Fotobiorreator tubular vertical
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
p	Nível de significância
ppm	Parte por milhão
P <sub>máx</sub>	Máximo valor de produtividade volumétrica de biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
P <sub>x</sub>	Produtividade volumétrica de biomassa (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
t	Tempo (d)
t <sub>0</sub>	Tempo inicial (d)
t <sub>g</sub>	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular (d)
TAP	Tris-Acetato-Fosfato
TCA	Ácido tricloroacético
vvm	Volume da corrente gasosa por volume de meio por minuto
X	Concentração celular (g L <sup>-1</sup> )
X <sub>máx</sub>	Máxima concentração celular (g L <sup>-1</sup> )
X <sub>0</sub>	Concentração celular inicial (g L <sup>-1</sup> )
X <sub>t</sub>	Concentração celular no tempo t (g L <sup>-1</sup> )
μ <sub>máx</sub>	Velocidade específica máxima de crescimento (d <sup>-1</sup> )
μ	Velocidade específica de crescimento (d <sup>-1</sup> )



## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	20
RESUMO .....	21
ABSTRACT .....	22
1 INTRODUÇÃO .....	23
2 OBJETIVOS .....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
CAPÍTULO II.....	27
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	28
3.1 MICROALGAS.....	28
3.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	29
3.1.2 <i>Chlorella kessleri</i> .....	31
3.2 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOTECNOLOGIA .....	33
3.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM MICROALGAS.....	35
3.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES POR CAMPOS MAGNÉTICOS.....	37
3.5 CAROTENOIDES .....	38
3.5.1 Atividade antioxidante dos carotenoides.....	40
3.6 MEDIDA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
3.6.1 Método de sequestro do radical DPPH.....	41
3.6.2 Sequestro do radical ABTS .....	42
3.6.3 Poder redutor .....	43
CAPÍTULO III .....	44
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO .....	45
ARTIGO I - INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM CULTIVOS DE <i>Chlorella kessleri</i> : AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PROXIMAL, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E ANTIOXIDANTES .....	46
RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	48
1 INTRODUÇÃO .....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	50
2.1 MICRO-ORGANISMO .....	50
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	50
2.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NOS CULTIVOS .....	51
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	52

2.4.1	Determinação da concentração de biomassa .....	52
2.4.2	Determinação de pH .....	52
2.4.3	Determinação da concentração de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides totais.....	52
2.5	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO .....	53
2.6	COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA .....	53
2.6.1	Determinação do teor de proteínas .....	53
2.6.2	Determinação do teor de carboidratos .....	54
2.6.3	Determinação do teor de lipídios .....	54
2.7	RESPOSTAS ESTUDADAS .....	55
2.7.1	Comparação entre os ensaios com CM e os ensaios controle.....	55
2.7.2	Avaliação dos parâmetros de crescimento.....	55
2.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	56
2.8.1	Poder Redutor .....	56
2.8.2	Capacidade de sequestro da radical livre DPPH.....	56
2.8.3	Captura do radical livre ABTS .....	57
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
3.1	EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113.....	57
3.2	EFEITO DO CM NO PH DOS CULTIVOS DE <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113.....	63
3.3	EFEITO DO CM NA COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA DE <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113.....	63
3.4	EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113.....	65
3.5	EFEITO DOS CM SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA DE <i>Chlorella kessleri</i> LEB 113.....	68
4	CONCLUSÃO .....	70
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71
	ARTIGO II - AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE CEPAS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> COM E SEM PAREDE CELULAR.....	76
	RESUMO.....	77
	ABSTRACT.....	78
1	INTRODUÇÃO .....	79
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	79
2.1	MICROALGA .....	79
2.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	80

2.3	APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NOS CULTIVOS .....	80
2.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	81
2.4.1	Determinação da concentração de biomassa .....	81
2.4.2	Determinação de pH .....	82
2.4.3	Determinação da concentração de clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides totais .....	82
2.5	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO .....	82
2.6	COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS .....	83
2.6.1	Determinação do teor de proteínas .....	83
2.6.2	Determinação do teor de carboidratos .....	83
2.6.3	Determinação do teor de lipídios .....	84
2.7	RESPOSTAS ESTUDADAS .....	84
2.7.1	Comparação entre os ensaios com CM e os ensaios controle .....	84
2.7.2	Avaliação dos parâmetros de crescimento .....	85
2.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	85
2.8.1	Poder Redutor .....	85
2.8.2	Capacidade de sequestro da radical livre DPPH .....	85
2.8.3	Captura do radical livre ABTS .....	86
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
3.1	EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DE CEPAS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	87
3.2	EFEITO DO CM NO PH DOS CULTIVOS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	90
3.3	EFEITO DO CM NA COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA DE CEPAS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	90
3.4	EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE CEPAS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	93
3.5	EFEITO DOS CM SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA DE CEPAS DE <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	97
4	CONCLUSÃO .....	99
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99
CAPÍTULO IV .....		102
5	CONCLUSÃO GERAL .....	103
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	104
CAPÍTULO V .....		105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		106

## **CAPÍTULO I**

## RESUMO

As microalgas apresentam potencial biotecnológico e sua biomassa pode ser empregada para melhorar o valor nutricional de produtos alimentícios e rações para animais. Além disso, podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis e na diminuição do efeito estufa a partir da mitigação de CO<sub>2</sub>. Nos últimos anos, houve crescente atenção sobre os efeitos biológicos que os campos magnéticos (CM) são capazes de promover, tais como estimular o crescimento microalgal, e assim, tornar viável economicamente a sua produção. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da aplicação de CM no crescimento de *Chlorella kessleri* LEB 113 e em cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (selvagem) e Wt-S1 (geneticamente modificada). Além disso, as biomassas destas microalgas foram avaliadas quanto a composição proximal, parâmetros cinéticos, produção de pigmentos e antioxidantes pela célula, e estes resultados foram comparados com os respectivos cultivos controle (CC) (sem aplicação de CM). O trabalho foi dividido em duas etapas: na primeira foram feitos ensaios com *Chlorella kessleri* e na segunda, os ensaios com as duas cepas de *Chlamydomonas*. Desta forma, na primeira etapa *C. kessleri* LEB 113 foi exposta a ação de CM de 30 e 60 mT durante 24 h d<sup>-1</sup> ou 1 h d<sup>-1</sup>, e os cultivos foram realizados em fotobiorreator tubular vertical (2 L) em meio BG-11, durante 10 d a 30°C, iluminância de 42,6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Na segunda etapa, CM de 11 e 20 mT foram aplicados durante 1 h d<sup>-1</sup> em cultivos de duas cepas de *C. reinhardtii* em reatores tipo Erlenmeyer (2 L), a 28°C, 125 rpm, 41,6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, durante 10 d. Ambas as condições de CM estudadas estimularam a concentração máxima de biomassa (X<sub>máx</sub>) nos cultivos de *C. kessleri*, porém o CM de 60 mT aplicado por 1 h d<sup>-1</sup> apresentou maiores valores de X<sub>máx</sub> (1,39 ± 0,07 g L<sup>-1</sup>), produtividade volumétrica máxima (P<sub>máx</sub>) (132,5 ± 10,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) e velocidade específica máxima de crescimento (μ<sub>máx</sub>) (0,34 ± 0,01 d<sup>-1</sup>), comparados com o CC. Esta condição também estimulou a síntese de lipídios (23,8 ± 1,1 % m m<sup>-1</sup>), clorofila *a* (8,87 ± 1,77 mg L<sup>-1</sup>), carotenoides totais (2,23 ± 0,02 mg L<sup>-1</sup>), e a atividade antioxidante da biomassa, em relação ao CC. O cultivo com aplicação de CM de 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup> apresentou X<sub>máx</sub> 36,0 % maior que o CC (0,76 ± 0,06 g L<sup>-1</sup>), e estimulou a produção de proteínas (58,6 ± 0,2 % m m<sup>-1</sup>), lipídios (23,6 ± 0,7 % m m<sup>-1</sup>), clorofila *a* (7,85 ± 0,66 mg L<sup>-1</sup>), clorofila *b* (3,35 ± 0,22 mg L<sup>-1</sup>) e carotenoides totais (2,34 ± 0,08 mg L<sup>-1</sup>). Os cultivos de *C. reinhardtii* não apresentaram aumento na concentração de biomassa quando expostos aos CM, sendo que a cepa sem parede celular mostrou-se mais sensível aos CM, apresentando menores valores de X<sub>máx</sub> e P<sub>máx</sub> em relação ao CC. Entretanto, a aplicação de CM de 20 mT nesta cepa aumentou a produção de lipídios em 31,6 %, em relação ao CC (16,0 ± 0,5 % m m<sup>-1</sup>). O CM de 11 mT estimulou a produção de lipídios (19,2 ± 0,5 % m m<sup>-1</sup>), carboidratos (20,7 ± 0,7 % m m<sup>-1</sup>), clorofilas *a* (7,74 ± 0,41 mg L<sup>-1</sup>), clorofilas *b* (4,59 ± 0,23 mg L<sup>-1</sup>) e carotenoides totais (2,71 ± 0,21 mg L<sup>-1</sup>), além de aumentar a atividade antioxidante na biomassa. Os resultados obtidos neste estudo comprovaram a eficiência dos CM durante os cultivos microalgais, promovendo a estimulação do crescimento celular, contribuindo com a diminuição de custos na produção de biomassa, bem como na estimulação da síntese de biocompostos de interesse biotecnológico.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante, bioestimulação, carotenoides, clorofilas.

# ACTION OF MAGNETIC FIELDS ON THE CULTIVATION OF *Chlorella kessleri* LEB 113 AND *Chlamydomonas reinhardtii*

## ABSTRACT

Microalgae have biotechnological potential since their biomass can be used for improving the nutritional value of food products and animal feed. Furthermore, their biomass can be used for producing biofuels and reducing greenhouse effects with CO<sub>2</sub> mitigation. Attention has lately been drawn to the biological effects, such as the stimulation of microalgal growth, which magnetic fields (MF) are able to promote so as to make the production of microalgae become economically viable. Therefore, this study aimed at evaluating the effects of MF application on the growth of *Chlorella kessleri* LEB 113, *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (wild type) and *Chlamydomonas reinhardtii* Wt-S1 (genetically modified type). Moreover, the proximal composition, kinetic parameters and the production of pigments and antioxidants by the cell were evaluated; afterwards, these results were compared with respective control cultures (CC) (without MF application). This study was divided into two parts: firstly, tests were carried out with *Chlorella kessleri* and then assays were conducted with both strains of *Chlamydomonas*. Thus, in the first part of the study, *Chlorella kessleri* LEB 113 was exposed to MF action of 30 and 60 mT for 24 h d<sup>-1</sup> or 1 h d<sup>-1</sup>, cultures were performed in a vertical tubular photobioreactor (2 L) in medium BG-11 for 10 d, at 30°C, 42.6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and photoperiod 12 h light/dark. In the second part, MF of 11 and 20 mT were applied for 1 h d<sup>-1</sup> to cultures of two strains of *C. reinhardtii* in an Erlenmeyer reactor (2 L) at 28°C, 125 rpm, 41.6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and photoperiod of 12 h light/dark for 10 d. Both MF applications stimulated the maximum biomass concentration (X<sub>max</sub>) in *C. kessleri* cultivations. However, MF of 60 mT applied for 1 h d<sup>-1</sup> had higher X<sub>max</sub> values (1.39 ± 0.07 g L<sup>-1</sup>), maximum volumetric productivity (P<sub>max</sub>) (132.5 ± 10.1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) and maximum specific growth rate (μ<sub>max</sub>) (0.34 ± 0.01 d<sup>-1</sup>) by comparison with CC. This condition also stimulated synthesis of lipids (23.8 ± 1.1 % m m<sup>-1</sup>), chlorophyll *a* (8.87 ± 1.77 mg L<sup>-1</sup>), total carotenoids (2.23 ± 0.02 mg L<sup>-1</sup>) and the antioxidant activity of the biomass, by comparison with CC. The application of 30 mT for 1 h d<sup>-1</sup> had X<sub>max</sub> 36.0 % higher than in CC (0.76 ± 0.06 g L<sup>-1</sup>), and stimulated the production of proteins (58.6 ± 0.2 % m m<sup>-1</sup>), lipids (23.6 ± 0.7 % m m<sup>-1</sup>), chlorophyll *a* (7.85 ± 0.66 mg L<sup>-1</sup>), chlorophyll *b* (3.35 ± 0.22 mg L<sup>-1</sup>) and total carotenoids (2.34 ± 0.08 mg L<sup>-1</sup>). *C. reinhardtii* cultivations showed increase in biomass concentration when exposed to MF, whereas the strain without a cell wall was more sensitive to MF, with lower values of X<sub>max</sub> and P<sub>max</sub> than CC. However, the application of 20 mT increased the production of lipids in 31.6 % by comparison with CC (16.0 ± 0.5 % m m<sup>-1</sup>). MF of 11 mT stimulated the production of lipids (19.2 ± 0.5 % m m<sup>-1</sup>), carbohydrates (20.7 ± 0.7 % m m<sup>-1</sup>), chlorophyll *a* (7.74 ± 0.41 mg L<sup>-1</sup>), chlorophyll *b* (4.59 ± 0.23 mg L<sup>-1</sup>) and total carotenoids (2.71 ± 0.21 mg L<sup>-1</sup>), besides increasing antioxidant activity in the biomass. Results of this study confirm the efficiency of MF in microalga cultivation, since it triggers cell growth, contributes to cost reduction in the production of biomass and enables the synthesis of biocompounds of biotechnological interest.

**Key words:** Antioxidant activity, biostimulation, carotenoids, chlorophylls.

## 1 INTRODUÇÃO

Microalgas são normalmente encontradas em sistemas de água doce e marinhos, possuindo em sua maioria hábitos planctônicos. A biodiversidade de microalgas é elevada e representam recurso quase inexplorado (JOHANSEN, 2012; LOURENÇO, 2006). As microalgas realizam fotossíntese e produzem cerca de 40-50 % do oxigênio atmosférico, usando simultaneamente o dióxido carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico para crescer fotoautotroficamente, desempenhando papel importante no ciclo do carbono na terra (MARQUES et al., 2012).

As microalgas possuem grande potencial biotecnológico. A sua biomassa pode ser utilizada para melhorar o valor nutricional de produtos alimentares e rações para animais (BEZERRA et al., 2010; FIGUEIRA et al., 2011; MORAIS et al., 2006), além de poder conter moléculas biologicamente ativas (BIERHALS et al., 2009; JAYAPPRIYANA et al., 2013; PRAKASH et al., 2011; PRIETO et al., 2011; SHANAB et al., 2012).

Nos últimos anos houve aumento nas pesquisas voltadas a questões ambientais envolvendo a biomassa microalgal, como a produção de biocombustíveis (CHEN et al., 2014; MUSSGUG et al., 2010), tratamento de águas residuárias (KIM et al., 2014; RASOUL-AMINI et al., 2014) e na mitigação de CO<sub>2</sub> (CHENG et al., 2014; RADMANN et al., 2011).

Dentre a grande variedade de microalgas, algumas ganham destaque devido ao seu potencial biotecnológico, como por exemplo, a clorófito *Chlamydomonas reinhardtii*, considerada modelo para o estudo da fotossíntese, das vias que controlam o crescimento celular e recentemente para a produção de biocombustíveis (CHEN et al., 2014; MERCHANT et al., 2007; MUSSGUG et al., 2010). A microalga *Chlorella kessleri*, é outra clorófito com grande potencial, a qual apresenta grande quantidade de ácidos graxos em sua biomassa, os quais podem ser destinados tanto para alimentação, quanto para produção de biocombustíveis (MORAIS; COSTA, 2008). Essas microalgas vêm chamando a atenção de pesquisadores por ser importante fonte de biomassa com composição química de interesse industrial. Por este motivo, faz-se necessário estudar alternativas para o aumento da produção das suas biomassas a fim de viabilizar o processo de produção.

A composição da biomassa microalgal é composta basicamente por proteínas, carboidratos, lipídios e minerais. Sua utilização em processos biotecnológicos é dependente desses compostos presentes na biomassa. Por exemplo, biomassas ricas em carboidratos são preferíveis para a produção de bioetanol (HO et al., 2013), os polissacarídeos também são utilizados na produção de gomas com aplicação na indústria de alimentos (YALCIN et al.,

1994), biomassas ricas em ácidos graxos poli-insaturados são desejáveis para utilização em alimentos funcionais (PULZ; GROSS, 2004), já com altos teores proteicos são requeridas para o enriquecimento nutricional de produtos alimentícios (MOREIRA et al., 2013).

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande estuda o cultivo de microalgas desde 1996, onde já foram realizados diferentes estudos visando a estimulação do crescimento microalgal, tais como, iluminância, temperatura, composição dos nutrientes e utilização de substratos alternativos na suplementação do meio de cultivo (ANDRADE; COSTA, 2007), tipos de fotobiorreatores (HENRARD, 2009), difusores (MORAES, 2014), além da aplicação de campos magnéticos (CM) nos cultivos microalgais (DEAMICI, 2015; MENESTRINO; PINTOS, 2015). O Laboratório de Biotecnologia desde 2015 vem trabalhando em parceria com o LEB, principalmente na aplicação de campos magnéticos em processos biotecnológicos envolvendo microalgas e leveduras.

A influência da exposição de CM sobre as microalgas vem sendo realizada visando entender quais os seus efeitos no metabolismo destas células. Estes estudos procuram mostrar a possibilidade de interação dos CM, nas diferentes aplicações biotecnológicas, na tentativa de identificar quais os parâmetros mais favoráveis ao processo, como intensidades, tempos de exposição e tipos de campo (LI et al., 2007; SMALL; HÜNER; WAN, 2012; WANG et al., 2008b). Havendo estudos que comprovam sua capacidade em estimular tanto o crescimento celular, quanto a produção de biocompostos pela célula. A aplicação de CM surge como alternativa viável para melhorar a eficiência dos processos biotecnológicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da aplicação de campos magnéticos no cultivo das microalgas *Chlorella kessleri* LEB 113 e em cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* com e sem parede celular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a aplicação de diferentes intensidades e tempos de exposição aos campos magnéticos nos cultivos de *Chlorella kessleri* LEB 113;
- Avaliar a ação de campos magnéticos de diferentes intensidades em cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (selvagem) e *Chlamydomonas reinhardtii* Wt-S1 (sem parede celular);
- Determinar o efeito do campo magnético na concentração de biomassa, conteúdo de clorofila *a* e clorofila *b*, carotenoides totais, composição proximal e atividade antioxidante da biomassa dos cultivos das diferentes microalgas, comparando-os com os respectivos cultivos controle.



## **CAPÍTULO II**

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MICROALGAS

As microalgas pertencem a um grande e diversificado grupo de micro-organismos fotossintéticos, os quais podem ser classificados como unicelulares e multicelulares. Compreendem nesta definição os procarióticos (cianobactérias) e os eucarióticos (LI et al., 2008). Sua importância na natureza refere-se principalmente a elevada participação no balanço global da fotossíntese, contribuindo com grande parcela da produção primária do planeta. No mar, cerca de 90 % da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fitoplâncton (LOURENÇO, 2006).

As algas verdes (filo Clorófitas) incluem pelo menos 17.000 espécies descritas. Destas, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo, apenas algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e, somente pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Por serem pouco exploradas, representam rica oportunidade para novas descobertas (OLAIZOLA, 2003).

Embora a maioria seja aquática, elas são encontradas em uma variedade de *habitats*, tais como, troncos de árvores, solo e em associações simbióticas com fungos (líquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. Possuem 4% clorofila *a* quando cultivadas em condições normais, podendo chegar até 10 % do seu peso seco dependendo das condições de cultivo, além de pigmentos acessórios como clorofila *b*, *c*, *d* e carotenoides (HARUN et al., 2010).

O cultivo de microalgas apresenta várias vantagens em relação ao cultivo de plantas, no que se refere a produção de biomassa e suas inúmeras aplicações. As microalgas possuem maior eficiência fotossintética (WANG et al., 2008a), necessitam de menor área de cultivo (TABATABAEI et al., 2011), menores gastos de água. Além disso, podem se desenvolver em meios salinos, alcalinos ou águas residuais (CHINNASAMY et al., 2010), não competindo pelo uso de água doce necessária para uso doméstico, industrial e agrícola, nem por áreas destinadas a agricultura.

Em relação a utilização comercial das microalgas, essa envolve formas simples e convencionais na obtenção de biomassa, a sua produção pode ser influenciada por diversos fatores, como, disponibilidade de nutrientes (carbono, nitrogênio, potássio, fósforo e enxofre), temperatura, luminosidade, agitação e dos sistemas de cultivo, como os fotobiorreatores abertos e fechados (LOURENÇO, 2006).

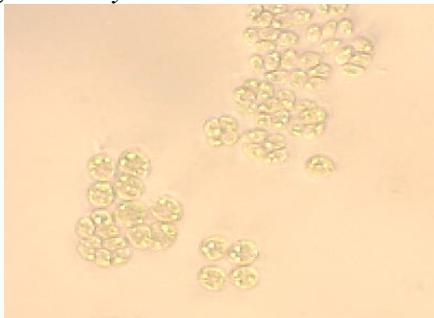
As microalgas fornecem grande diversidade de biomoléculas, o que tem interessado vários setores industriais nos últimos anos, e, como consequência são cultivadas com o propósito de extraí-las (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Aproximadamente 90 a 95 % da biomassa microalgal seca é constituída por proteínas, carboidratos, lipídios e minerais, podendo variar sua composição de acordo com as condições de cultivo, e assim determinar o seu potencial de aplicação biotecnológica (BROWN; JEFFREY; GARLAND, 1989).

Os pigmentos sintetizados pelas microalgas, tais como, clorofilas e carotenoides, possuem alto valor de mercado. Estes pigmentos, assim como outros corantes naturais, são mais seguros e saudáveis do que as alternativas sintéticas, o que é importante para a indústria de alimentos (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). De acordo com Li et al. (2015), a clorofilina, derivado da clorofila, possui preço de mercado de 150 €/kg e, portanto, é capaz de compensar quantidade considerável do custo de produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

### 3.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* é uma microalga eucariota, unicelular, haploide, pertencente a divisão das clorófitas (algas verdes), possui formato oval, com cerca de 10 µm de diâmetro em seu maior eixo (Figura 1), sendo constituída de mitocôndrias, dois flagelos para motilidade e reprodução sexuada, um cloroplasto em forma de taça que abriga o aparato fotossintético e vias metabólicas, um ou mais pirenoides tipicamente envoltos por amido e dois vacúolos contráteis (GOFF et al., 2013; MERCHANT et al., 2007).

**Figura 1** - Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (aumento de 50X)



Em 2007, o genoma da *C. reinhardtii* foi completamente decodificado, a análise da sequência, de cerca de 120 milhões de pares de bases do DNA, revelou aproximadamente 15.000 genes (MERCHANT et al., 2007). Esta microalga é usada há mais de 50 anos como

padrão do estudo da fotossíntese e do movimento dos flagelos, pois ao contrário de angiospérmicas, crescem no escuro sobre uma fonte de carbono orgânico, mantendo um aparelho fotossintético funcional (HARRIS, 2001).

A composição da biomassa de *C. reinhardtii* expressa em base seca apresenta 48 % de proteínas, 21 % de lipídios e 17 % de carboidratos (BECKER, 2007). Na maioria das algas verdes unicelulares, incluindo *C. reinhardtii*, o único cloroplasto na célula ocupa cerca de 70 % do seu volume, sendo provavelmente a razão para as altas taxas de fotossíntese e de crescimento destes organismos, podendo atingir ou exceder o dobro da biomassa em 24 h (JANSSEN et al., 2003; REDDY et al., 2004).

Mussnug et al. (2010) determinaram o potencial da biomassa de seis espécies de microalgas como substrato para a produção de biogás. Dentre elas, o maior rendimento de biogás foi 587 mL g SV<sup>-1</sup> (sólidos voláteis), obtido para a biomassa de *C. reinhardtii* CC124, além de apresentar a maior produtividade de metano (387 mL g SV<sup>-1</sup>). Todas as microalgas testadas apresentaram maiores teores de metano (que variaram de 61 a 67 %) em comparação com a silagem de milho que é usada como substrato padrão (54 %), indicando o potencial das microalgas como substrato para produção de biogás, pois possui qualidade superior em comparação com as plantas superiores, tradicionalmente utilizadas.

Kightlinger et al. (2014) investigaram o potencial da utilização de extrato de microalgas a partir de *C. reinhardtii* 137c (mt+) como suplemento em meios microbiológicos. Os autores cultivaram cepas de *Escherichia coli* DH5α e de *S. cerevisiae* YSG50 contendo extrato de levedura ou microalgas. O estudo demonstrou que o extrato de *C. reinhardtii* atua melhor como suplemento em relação ao extrato de levedura, proporcionando maior crescimento das cepas em 20 % e 120 % respectivamente. Esse resultado pode ser explicado pelo fato do extrato microalgal apresentar quantidade superior de carboidratos (2,2 %) em relação ao extrato de levedura, além de possuir 3 % de proteína, o qual estava ausente no extrato de levedura.

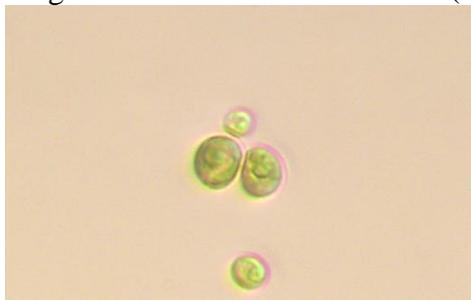
Chen et al. (2014) estudaram o crescimento celular e a produção H<sub>2</sub> a partir de *C. reinhardtii* CC503 cultivadas em águas residuárias provenientes da etapa de prensagem de talos de sorgo sacarino fermentado. As microalgas cultivadas com efluente foram comparadas com os cultivos mixotróficos em meio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) sob as mesmas condições. *C. reinhardtii* cultivada em águas residuárias apresentaram concentração celular máxima de  $8,9 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> com velocidade de crescimento de  $0,19 \times 10^6$  células h<sup>-1</sup>, em comparação a  $18,2 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> e  $0,36 \times 10^6$  células h<sup>-1</sup> em meio TAP, respectivamente. No entanto, o cultivo em águas residuárias proporcionou produção fotossintética de H<sub>2</sub> 700 % maior em

comparação com os cultivos em meio TAP, demonstrando que o sistema é uma boa estratégia econômica para o desenvolvimento de um método de produção de H<sub>2</sub> microalgal.

### 3.1.2 *Chlorella kessleri*

A clorófito *Chlorella kessleri* é uma microalga unicelular, eucariótica, esférica, com diâmetro variando entre 5-10 µm (Figura 2) (ILLMAN et al., 2000). Possui grande capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos. Sua biomassa contém aproximadamente 39 % de carboidratos, 30 % de proteínas e 24 % de lipídios (SMALL; HÜNER; WAN, 2012). Além disso, a microalga *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana. Sua alta concentração de clorofila indica que possui capacidade antioxidante (ALVAREZ-PARRILLA et al., 2011), desintoxicante, anti-inflamatórias e preventivas sobre o câncer (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007).

**Figura 2** - Microalga *Chlorella kessleri* LEB 113 (aumento de 40X)



Em 2006, mais de setenta companhias produziam *Chlorella*, sendo a japonesa Nihon *Chlorella* Inc. a precursora em 1961. Inicialmente, foi comercializada como suplemento alimentar, e depois como alimento para a aquicultura marinha, podendo ser também utilizada como aditivo alimentar devido aos seus pigmentos. O principal componente para a saúde humana presente na *Chlorella* é o  $\beta$ -1,3-glicano, que é um ativo imunoestimulador e que reduz radicais livres e a quantidade de lipídios no sangue (SPOLAORE et al., 2006).

Os estudos com essa microalga vêm sendo realizados com intuito de obter maiores teores de ácidos graxos em sua biomassa (WANG; CHEN; QIN, 2012). A quantidade de ácidos graxos saturados ou insaturados define a aplicação da biomassa. Assim, para a produção de biodiesel, são desejáveis altas concentrações de ácidos graxos saturados. Já para utilização da microalga na alimentação, altos teores de ácidos graxos insaturados são requeridos (MORAIS; COSTA, 2008).

A biomassa de *C. kessleri* apresenta grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, tais como, ácido linoleico (C18:2n-6), ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3n-3) e ácido  $\gamma$ -linolênico (C18:3n-6) (AMBROZOVA et al., 2014). A partir dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico, o organismo humano é capaz de sintetizar os ácidos docosahexaenoico (C22:6n-3) e eicosapentaenoico (C20:5n-3) (MARTIN et al., 2006), os quais podem prevenir várias doenças, tais como aterosclerose, doença cardíaca coronária, doença inflamatória, disfunção imune, e desordens cognitivas (FETTERMAN; ZDANOWICZ, 2009). Ao encontro disto vem sendo desenvolvido métodos de incorporar esses ácidos graxos poli-insaturados em produtos alimentícios funcionais (WANG et al., 2014).

Wang, Chen e Qin (2013) investigaram o potencial de *C. kessleri* para produzir ácidos graxos a partir de diferentes concentrações de glicose, glicerol e etanol em condições mixotróficas, a fim de avaliar o potencial desta microalga no tratamento de águas residuárias. A maior produção de ácidos graxos totais (7,11 g L<sup>-1</sup>) foi obtida com concentrações de glicose de 300 mmol L<sup>-1</sup>, 37 vezes superior ao controle autotrófico. A análise da composição dos ácidos graxos da *C. kessleri* em cultivo mixotrófico revelou predominantemente a presença de C:16 e C:18, representando mais de 95 % do total de ácidos graxos. Além disso, exibiram baixos níveis de ácidos graxos insaturados (1,5 %). Esses resultados indicaram o potencial desta microalga na produção de biodiesel rentável através da utilização de efluentes orgânicos.

Juárez (2003) estudou a atividade antimicrobiana de extratos preparados a partir de *C. kessleri*, detectando atividade antimicrobiana frente a onze cepas de micro-organismos patogênicos, dentre eles, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*. A composição do extrato apresentou grande quantidade de ácidos graxos insaturados, peróxidos de lipídios e terpenoides, o que de acordo com o autor, estão associados a atividade antimicrobiana do extrato. O potencial antimicrobiano natural da microalga *C. kessleri* pode ser aplicado, tanto para a indústria alimentícia, quanto para a farmacêutica.

Morais e Costa (2007) avaliaram os efeitos de diferentes fotobiorreatores nas características cinéticas de *C. kessleri* LEB 15. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) nos cultivos em fotobiorreator tubular foi 0,39 d<sup>-1</sup> sendo superior aos cultivos realizados em fotobiorreator tipo Erlenmeyer (0,27 d<sup>-1</sup>). No mesmo estudo, foi avaliada a capacidade de fixação de CO<sub>2</sub> a partir de diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>. A microalga foi capaz de crescer em concentração de 18 % de CO<sub>2</sub>, o que demonstra que poderia ser utilizada na mitigação de CO<sub>2</sub>, reduzindo as emissões de efluentes de combustão.

### 3.2 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM BIOTECNOLOGIA

A capacidade de responder a campos magnéticos (CM) se faz presente entre todos os organismos, porém os mecanismos de atuação dos CM ainda não estão completamente entendidos em termos de seus princípios físicos. Nos últimos anos, houve crescente atenção sobre os efeitos biológicos que os CM são capazes de promover, podendo esses efeitos serem nulos, estimulantes ou inibitórios (HUNT et al., 2009).

Os efeitos biológicos são dependentes de diversos fatores, como intensidade do CM, frequência, intensidade da força magnética e tempo de exposição (RAY, 1997). Além disso, o tipo de célula, a temperatura de exposição e estado biológico das células também podem influenciar os possíveis efeitos dos CM em sistemas biológicos (RUIZ-GOMEZ et al., 2004).

A Tabela 1 apresenta os efeitos de diferentes intensidades de CM e tempos de exposição sobre diversos organismos.

**Tabela 1** - Efeitos de diferentes intensidades de CM e tempos de exposição sobre diversos organismos.

Organismos	Intensidade CM	Tempo de exposição	Efeito	Referências
<i>Flavobacterium</i>	0,0001 mT	5 h	Aumento de 4 vezes na $X_{m\acute{a}x}$ , e redução da DBO, DQO, lignina, fenol e teor proteico do efluente utilizando as células tratadas	Aarhi et al. (2004)
<i>Vigna radiata</i>	87 a 226 mT	1 h 30 min.	Aumento linear da germinação com o aumento do CM	Mahajan e Pandey (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	220 mT	24 h	Produção de etanol e de biomassa foram 3,4 e 3,0 vezes maior, respectivamente	Motta et al. (2004)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,025 mT	24 h	Aumento de 14,4 % na concentração celular	Zapata et al. (2005)
<i>Escherichia coli</i>	0 a 200 mT	20 h	Inibição do crescimento com o aumento do CM	Zhang et al. (2002)
<i>Monascus purpureus</i>	0,4 mT	24 h	Aumento de 65,4 e 59,2 % na produção de pigmentos amarelos e vermelhos, respectivamente	Zhang et al. (2015)

Mehedintu e Berg (1997) mencionaram sobre o efeito “janela eletromagnética” que ocorre em sistemas biológicos quando expostos a um CM, no qual somente para alguns valores de frequências e induções magnéticas específicas ocorre uma “janela” onde uma resposta significativa pode ser observada.

Zhang et al. (2010) estudaram os efeitos de CM de baixa frequência sobre a concentração de cálcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  através da utilização de osteoblastos. Os autores utilizaram um par de bobinas Helmholtz (8 cm de diâmetro) para combinar diferentes frequências (5, 20, 50, 60, 75 e 100 Hz) e intensidades de CM (0,1; 0,5; 0,8; 1,1 e 1,4 mT) a fim de encontrar o efeito "janela" sobre a  $[Ca^{2+}]_i$ . Esta janela foi encontrada quando utilizaram 50 Hz combinada com 0,8 mT, ocorrendo aumento dos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  em osteoblastos.

Justo et al. (2006) estudaram a influência de CM de frequência extremamente baixa (ELF) em culturas de *Escherichia coli* ATCC 25922 em fermentação submersa. Os processos de fermentação foram realizados reciclando externamente o meio de cultura por tubo de aço inoxidável inserido em um gerador de CM (solenóide). O tempo de exposição e indução eletromagnética variaram de 1 a 12 h e 0,010 - 0,10 T, respectivamente, de acordo com delineamento composto central. Os autores observaram que o crescimento de *E. coli* pode ser alterado (estimulado ou inibido) sob efeitos do CM. As culturas expostas a 0,055 T por 12 h obtiveram 19,83 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e 49,20 % de rendimento ( $Y_{x/s}$ ), sendo superiores ao controle, 7,71 g.L<sup>-1</sup> e 18,69 %, respectivamente. Quando expostas a 0,1 T durante 6,5 h houve alterações na viabilidade em comparação com células não expostas, sendo 100 vezes mais elevadas do que o controle. Porém quando as bactérias foram expostas a 0,055 T por 6,5 h a concentração de biomassa e o rendimento foram menores em relação ao controle (3,06 g.L<sup>-1</sup> e 6,72 % respectivamente).

Lebkowska et al. (2011) observaram que a aplicação de 7 mT aumentou a eficiência da biodegradação de formaldeído em águas residuárias sintéticas tratadas por lodo ativado. O CM aumentou em 30 % a biodegradação de formaldeídos, além de diminuir em 26 % a DQO em relação as amostras controle (sem aplicação de CM). A ecotoxicidade da água residual bruta e tratada foi avaliada através de crustáceos bioindicadores (*Daphnia magna*), a concentração foi 3,7 % maior quando aplicado os CM, indicando menor toxicidade da água tratada.

Santos et al. (2012) avaliaram a produção de glutathiona (GSH) por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, em fermentador (5 L), utilizando sistema de reciclo de células com ímãs. Os tempos de aplicação do CM foram de 24, 48 ou 72 h. Os melhores resultados foram obtidos com a aplicação de CM por 72 h, sendo que a concentração celular e de GSH aumentaram 2,63 e 32,1 % em comparação com o ensaio controle, respectivamente. Os autores citaram que a aplicação de CM é interpretada como um estresse pela célula, ocorrendo a produção de GSH (antioxidante intracelular) em resposta das células ao estresse ocasionado pelo CM.

Outro emprego de CM em tratamento de águas residuais foi estudado por Křiklavová et al. (2014), através da biodegradação de fenol por *Rhodococcus erythropolis*. O experimento foi realizado em biorreator com sistema de reciclo celular com ímãs acoplados (370 mT). Diferentes velocidades de reciclo (20, 40, 80 e 170 mL h<sup>-1</sup>) foram avaliadas, sendo que a velocidade de 170 mL h<sup>-1</sup> estimulou a oxidação do fenol em 35 %, promovendo aumento do crescimento celular de *R. erythropolis* em 28 %, e redução da fase *lag* (50 %) e exponencial (33 %) em relação ao controle (sem aplicação de CM). Em velocidades de circulação menores que 40 mL h<sup>-1</sup>, o CM causou efeito negativo sobre a biodegradação de fenol, o crescimento celular e a taxa de respiração, com nível de inibição de 15 % para todas os experimentos. Os autores citaram que o CM pode afetar a permeabilidade da membrana resultando em alterações no transporte de íons do substrato. Como consequência, o metabolismo celular foi estimulado para aumentar a absorção de fenol.

### 3.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM MICROALGAS

Yamaoka et al. (1992) investigaram a influência de CM no crescimento da microalga *Dunaliella salina* 19/30. Os autores utilizaram um ímã permanente variando a intensidade do CM entre 0 (cultivo controle) e 230 mT. A concentração de massa seca no cultivo controle chegou a 0,05 g L<sup>-1</sup>, enquanto que com a aplicação do CM de 10 mT a concentração celular chegou a 0,11 g L<sup>-1</sup>. Demonstrando que o CM influenciou o crescimento desta microalga.

Hirano, Hota e Abe (1998) investigaram a influência de CM de diferentes intensidades (0,05 – 70 mT) sobre o crescimento, a atividade fotossintética e as concentrações de várias biomoléculas na *Spirulina platensis* IAM M-135, a fim de obter mais detalhes sobre os efeitos destes CM sobre esta microalga. A  $\mu_{\text{máx}}$  (0,22 d<sup>-1</sup>) com 10 mT foi superior a  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,14 d<sup>-1</sup>, quando aplicado 0,05 mT (controle). Os CM entre 40 e 70 mT ocasionaram inibição no crescimento microalgal. Os autores relataram que o CM aumenta a síntese de ficocianina, a qual desempenha papel importante na ativação do fotossistema II, sendo uma das causas para a ativação de reações de transferência de elétrons durante a fotossíntese. Além disso, os CM não tiveram influência sobre o crescimento de *S. platensis* quando cultivadas heterotroficamente.

Li et al. (2007) avaliaram os efeitos dos CM sobre o crescimento e componentes nutricionais da *S. platensis* cultivadas em fotobiorreator *air-lift* (3,5 L) com circuito externo. O CM foi gerado por solenoide fixado em torno do tubo de retorno do fotobiorreator e variou entre 0 - 550 mT. Os autores observaram que CM maiores que 400 mT inibiram o crescimento,

enquanto que CM menores que 400 mT estimularam, sendo que o crescimento máximo ocorreu com 250 mT, sendo este valor 47 % maior em relação ao controle (0 mT). O conteúdo de aminoácidos essenciais e minerais também foram melhorados, havendo aumento no teor de histidina (59,3 %), Ni (512 %), Sr (494 %), Cu (102 %), Mg (47 %), Fe (42 %), Mn (36 %), Ca (21 %), além de Co (0,25 mg kg<sup>-1</sup>) e V (0,42 mg kg<sup>-1</sup>) os quais não foram encontrados na amostra controle. A concentração de clorofilas no cultivo submetido ao CM (13,5 g L<sup>-1</sup>) foi superior ao cultivo controle (10,3 g L<sup>-1</sup>), o que segundo o autor, auxiliou no crescimento da microalga.

Wang et al. (2008b) utilizaram CM gerados por bobinas em cultivos com sistema de reciclo de células e observaram que o CM ajudou a regular o sistema de defesa antioxidante de *Chlorella vulgaris* com intensidades entre 10 e 35 mT. Conforme os autores, os íons hidroxila aumentaram no meio tratado magneticamente, sugerindo alteração dos níveis de radicais livres no meio, o que pode ocasionar hiperativação do sistema antioxidante de defesa da microalga. Esta situação também afeta a permeabilidade da membrana e o processo de transporte de íons, podendo ser responsável pela aceleração da excitação dos elétrons com a luz nas clorofilas. A  $\mu_{\text{máx}}$  da *C. vulgaris* aumentou de 0,07 para 0,12 d<sup>-1</sup> quando submetida a CM de 10 mT.

Luna, Alvarez e Rivero (2011) estudaram o efeito de CM de 30 mT sobre o cultivo de *Chlorella vulgaris* utilizando água da etapa de maceração de extrato de soja como substrato. A aplicação dos CM ocorreu de forma permanente ou no início da fase exponencial durante 1 h. As culturas expostas ao CM durante 1 h (430,62 x 10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup>) obtiveram crescimento maior comparadas à exposição permanente (330,75 x 10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup>) e ao controle (332,50 x 10<sup>6</sup> cél mL<sup>-1</sup>). Porém os cultivos com exposição permanente apresentaram maiores teores de proteína (5,35 pg cél.<sup>-1</sup>), lipídios (3,48 pg cél.<sup>-1</sup>) e carboidratos (0,48 pg cél.<sup>-1</sup>) em relação ao cultivo exposto por 1 h (5,03; 1,71; 0,43 pg cél.<sup>-1</sup> respectivamente) e ao controle (4,99; 3,22; 0,44 pg cél.<sup>-1</sup>, respectivamente).

Small, Hüner e Wan (2012) avaliaram o efeito de CM na produção de biomassa e nas mudanças fisiológicas de *Chlorella kessleri* UTEX 398 cultivadas em Erlenmeyer (2 L) e em fotobiorreator aberto tipo *raceway*. Os cultivos em Erlenmeyer foram submetidos a CM entre 0 e 15 mT, sendo que com 10 mT a  $\mu_{\text{máx}}$  aumentou de 0,39 d<sup>-1</sup> (controle) para 0,88 d<sup>-1</sup>. Após, a microalga *C. kessleri* foi cultivada em *raceway* com CM de 10 mT. A  $\mu_{\text{máx}}$  foi 0,45 d<sup>-1</sup>, quase 2 vezes maior que o controle (0,24 d<sup>-1</sup>), a produtividade máxima de biomassa foi 0,38 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, enquanto que o controle atingiu 0,11 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. As culturas expostas ao CM

aumentaram o seu teor de proteínas (8 %), carboidratos (7,8 %), clorofila *a* (13,2 %) e clorofila *b* (39 %), Ca (53,7 %), Zn (53,4 %), Mn (46,8 %) e Ni (70,7 %). O aumento do estresse oxidativo foi medido indiretamente, através da diminuição da capacidade antioxidante de  $26 \pm 2$  para  $17 \pm 1$   $\mu\text{mol}$  antioxidante/ $\text{g}_{\text{biomassa}}$ . Os autores observaram que os CM alteraram as concentrações ou as velocidades das reações envolvendo os radicais livres, podendo ser o mecanismo mais provável para o efeito no crescimento das microalgas.

Menestrino e Pintos (2015) avaliaram a ação de CM (80 mT) em cultivos de *Chlorella minutissima* com e sem privação de 50 % de nitrogênio e adição de 5 % pentoses, durante 12 d. Os autores constataram que as maiores concentrações celulares foram atingidas nos cultivos com aplicação de CM redução de nitrogênio, com adição de 5% de pentose ( $1,32 \pm 0,11$   $\text{g L}^{-1}$ ) e sem adição de pentose ( $1,39 \pm 0,17$   $\text{g L}^{-1}$ ). No entanto, o cultivo com aplicação de CM, redução de nitrogênio e adição de pentose apresentou a maior concentração de carboidratos ( $67,73 \pm 10,45$  %  $\text{m m}^{-1}$ ).

Deamici (2015) avaliou o efeito de CM com intensidades de 30 e 60 mT em cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Spirulina* sp. LEB 18, expostos durante 24 h  $\text{d}^{-1}$  e 1 h  $\text{d}^{-1}$ . O CM de 60 mT por 24 h  $\text{d}^{-1}$  estimulou a  $X_{\text{máx}}$  de *C. fusca* em 20,5 %, em relação ao cultivo controle ( $1,61 \pm 0,05$   $\text{g L}^{-1}$ ), além de aumentar a produção de carboidratos em 24,8 %. Os cultivos de *Spirulina* sp. apresentaram estímulo na  $X_{\text{máx}}$  quando expostos ao CM de 30 mT por 1 h  $\text{d}^{-1}$  (94,3 %), e 60 mT por 24 h  $\text{d}^{-1}$  (89,3 %) e 1 h  $\text{d}^{-1}$  (95,1 %), em relação ao cultivo controle ( $1,22 \pm 0,03$   $\text{g L}^{-1}$ ). A aplicação de 30 mT por 24 h  $\text{d}^{-1}$  aumentou a produção de carotenoides em 133,2 %. Enquanto que no ensaio com 60 mT no mesmo tempo de exposição, aumentou a produção de carotenoides e proteínas em 13,7 % e 16,6 %, respectivamente.

### 3.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES POR CAMPOS MAGNÉTICOS

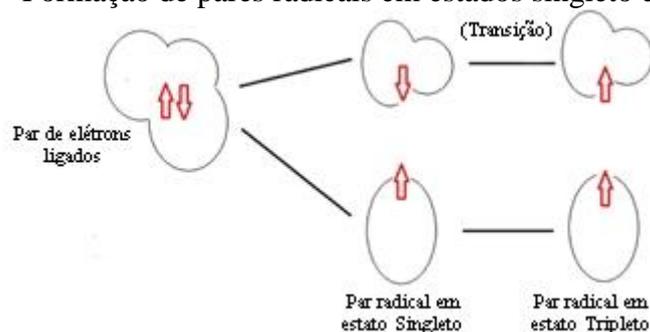
Na literatura ainda há poucos estudos científicos que demonstram como os CM atuam sobre sistemas biológicos. Alguns dos mecanismos de ação desta interação vêm sendo estudados, dentre eles, o mecanismo capaz de modificar a taxa de recombinação de pares radicais, os quais alternam entre os estados de *spin* singleto e tripleto, resultando em aumento ou diminuição das taxas de recombinação e alterando a concentração de radicais livres, podendo aumentar a atividade oxidativa da célula (BARNES; GREENEBAUM, 2015).

A diminuição da alternância entre os estados *spin* singleto e tripleto, os quais se encontram em concentrações de 75 % e 25%, respectivamente, pode ocasionar aumento na concentração de radicais livres. O estado singleto possui reação atrativa entre os pares radicais,

enquanto que o estado tripleto possui reação dissociativa. Se o par radical for produzido em um estado tripleto, a diminuição de alternância entre estados singleto e tripleto diminuiria a concentração do estado singleto e aumentaria a concentração do estado tripleto. Consequentemente, aumentaria a separação dos pares radicais, e então, produzindo mais radicais livres (GRISSOM, 1995; TIMMEL et al., 2001;).

Em uma molécula típica existe um número par de elétrons nas órbitas externas, quando eles são divididos, um dos fragmentos apresenta um elétron com *spin* para cima e outro com *spin* para baixo (Figura 3). Estes dois fragmentos recombinam-se frequentemente em aproximadamente  $10^{-10}$  s. No entanto, se um dos spins vira, então a recombinação do par é proibida pelo princípio de Exclusão de Pauli, e os fragmentos normalmente sobrevivem por cerca de  $10^{-5}$  s. O que aumenta a probabilidade de que os fragmentos possam se separar e se difundir através da solução como radicais, e assim desencadear a formação de radicais livres (BARNES; GREENEBAUM, 2015).

**Figura 3** - Formação de pares radicais em estados singleto e tripleto.



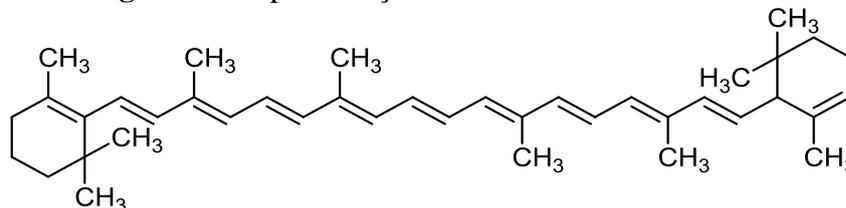
Fonte: BARNES; GREENEBAUM (2015).

### 3.5 CAROTENOIDES

Os carotenoides são tetraterpenoides ( $C_{40}$ ) formados pela união de oito unidades isoprenoides ( $C_5$ ), ligados de tal forma que a molécula é linear com simetria invertida no centro, conforme mostra a Figura 4, que apresenta a estrutura do  $\beta$ -caroteno (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). Todos os carotenoides apresentam como característica comum a cadeia poliênica, um longo sistema de duplas ligações conjugadas, rico em elétrons, o qual é responsável pela atividade antioxidante destes compostos (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009). A alternância de ligações duplas e simples presentes na estrutura dos carotenoides gera um sistema de elétrons  $\pi$  que se desloca sobre toda a cadeia poliênica,

proporcionando a absorção do oxigênio singleto e radicais livres, interrompendo as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (MCNULTY, 2008; SILVA; 2010).

**Figura 4** - Representação da estrutura do  $\beta$ -caroteno.



Os carotenoides, da mesma forma que as clorofilas *b*, *c* e *d* são pigmentos acessórios da fotossíntese, mas também possuem a função de proteger os fotossistemas quando há luz em excesso, funcionando como uma espécie de filtro (LOURENÇO, 2006).

De acordo com sua composição química são classificados em carotenos ou xantofilas. Os carotenoides que compõe o grupo dos carotenos são aqueles formados apenas por carbono e átomos de hidrogênio, como o  $\beta$ -caroteno, o  $\alpha$ -caroteno e o licopeno. O grupo das xantofilas, entretanto, carregam pelo menos um átomo de oxigênio. Zeaxantina, luteína,  $\alpha$  e  $\beta$ -riptoxantina, a cantaxantina e astaxantina são exemplos deste grupo (MASOJÍDEK; TORZILLO; MICHAL KOBLÍŽEK, 2004).

As clorofíceas, tais como, *Chlorella* e *Chlamydomonas*, apresentam majoritariamente em sua composição os seguintes carotenoides: luteína, zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, cantaxantina, violaxantina e neoxantina (GOUVEIA, 1996; INBARAJ; CHIEN; CHEN, 2006; MULDER et al., 2014).

Devido a sua estrutura, os carotenoides podem sofrer isomerização geométrica e oxidação, acarretando perda do poder corante e diminuição da atividade antioxidante. Contudo, a oxidação ou quebra da cadeia de carotenoides ocorre em condições extremas de temperatura ou na presença de enzimas, de oxigênio singleto, de radicais livres ou alta concentração de oxigênio (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009).

Cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos, o que influencia diretamente na sua coloração. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Segundo Ajayan, Selvaraju e Thirugnanamoorthy (2011) é possível incrementar a síntese destes compostos através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum estresse.

### 3.5.1 Atividade antioxidante dos carotenoides

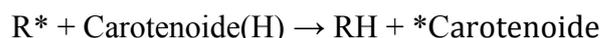
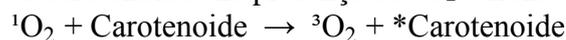
Todas as células possuem sistema de defesa enzimático e não enzimático para proteger os constituintes celulares dos radicais livres, das espécies reativas do oxigênio (ERO) e manter o potencial redox da célula (STEPHEN; JAMIESON, 1996). Enzimas como a superóxido dismutase, catalase e peroxidases fazem parte deste sistema enzimático. No sistema de defesa não enzimático estão incluídos compostos de baixo peso molecular, tais como, vitaminas A, C e, compostos fenólicos, flavonoides, glutatona e os carotenoides (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008).

Dentre os compostos naturais, os carotenoides podem atuar na desativação de espécies reativas, evitando assim a iniciação de cadeias de oxidação em nível celular, os quais podem ocasionar danos ao organismo (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009).

O oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) pode ser formado pela transferência de energia eletrônica de um composto em estado excitado para o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Em sistemas biológicos, moléculas como porfirinas, clorofilas e riboflavina podem levar à formação de  $^1\text{O}_2$ , acarretando efeitos deletérios como alteração do ácido desoxiribonucléico (DNA) e a peroxidação lipídica (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

Os carotenoides são eficientes em quelar  $^1\text{O}_2$ , e sua capacidade para tal está relacionada com o número de duplas ligações conjugadas e aos grupos ligados às extremidades da cadeia (SEDOUD et al., 2014). Uma vez formado, o carotenoide no estado excitado (\*Carotenoide) pode facilmente retornar ao estado fundamental, dissipando energia na forma de calor (Figura 5). Além disto, as reações dos carotenoides com radicais livres levam à transferência de elétrons ou possíveis reações adicionais. A Figura 5 mostra a ação do carotenoide frente à presença do  $^1\text{O}_2$  e o seu modo de ação frente a um radical livre (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

**Figura 5** - Ação dos carotenoides na presença de  $^1\text{O}_2$  e frente a um radical livre.



Fonte: UENOJO; JUNIOR; PASTORE (2007).

## 3.6 MEDIDA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente não existe um método padrão para determinação da atividade antioxidante de compostos. Os radicais livres, por apresentarem diferentes tipos e formas de

atuação nos organismos vivos, tornam difícil a existência de um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente. Assim, a busca por testes mais eficientes vem gerando grande número de métodos para avaliar a atividade antioxidante pelo uso de grande variedade de sistemas geradores de radicais livres (ALVES et al., 2010).

Devido a isso vários métodos vêm sendo usados para quantificar a capacidade antioxidante, muitas vezes sendo utilizados em conjunto. Alguns métodos avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, ou medindo a inibição da oxidação, e outros métodos determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

Dentre os diversos métodos utilizados pode-se citar aqueles que medem a habilidade de um antioxidante de reduzir um radical livre por doação de hidrogênio ou elétron: ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio), TRAP (capacidade antioxidante total), ensaio com ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio), e ensaio do DPPH (1,1- difenil -2- picrilhidrazil). Esses métodos baseiam-se na habilidade do antioxidante de sequestrar o radical escolhido e impedir a reação do radical com o substrato (CAMPOS et al., 2008).

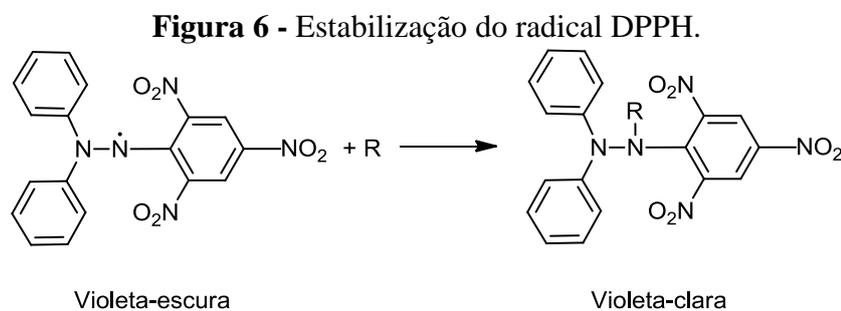
A avaliação da reação é feita por meio da medida da variação da absorbância. Pode ser medida a alteração da absorbância característica do próprio radical (como é o caso de ABTS e DPPH, cuja absorbância reduz à medida que vão sendo reduzidos) ou por meio da escolha de um padrão (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005).

Para os testes de poder redutor e capacidade quelante de íons ferrosos é utilizado como parâmetro de avaliação a medida da absorbância. O método do poder redutor avalia a capacidade do antioxidante de reduzir íon ferricianeto a ferrocianeto (maior a absorbância, maior a capacidade antioxidante). Já a capacidade quelante de íons ferrosos baseia-se na medida da quelação do ferro disponível pelo antioxidante (maior a quantidade de ferro quelado, menor o número de íons disponíveis e maior a absorbância) (SANTOS et al., 2007).

### **3.6.1 Método de sequestro do radical DPPH**

O método de DPPH baseia-se na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes, produzindo redução da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. A Figura

6 apresenta a estabilização do radical, em solução, com a adição do antioxidante (RUFINO et al., 2007a).



Fonte: RUFINO et al., (2007b).

Uma vantagem deste método é que o radical livre é estável (em virtude do deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula) e está disponível comercialmente, o que evita sua geração por distintas formas (como ocorre com o método ABTS), além de facilitar seu uso (RUFINO et al., 2007a).

O método DPPH vem sendo empregado na análise de mecanismos de reação de carotenoides com radicais livres (AHMED et al., 2014; MAADANE et al., 2015). Além disto, o teste determina o potencial antioxidante de compostos presentes em alimentos e outras amostras biológicas. O método do DPPH avalia a capacidade do radical livre estável em reagir com compostos doadores de H<sup>+</sup>, o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia (SANTOS et al., 2007).

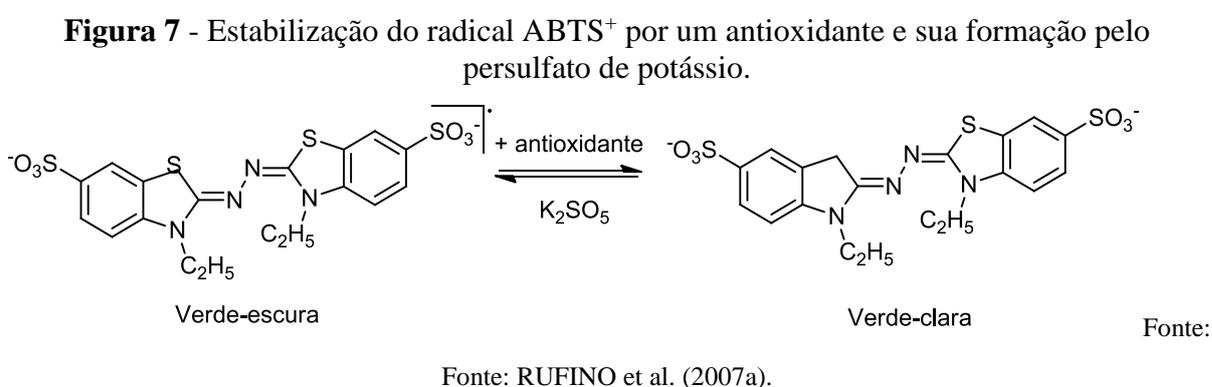
### 3.6.2 Sequestro do radical ABTS

O método de captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), é um dos mais utilizados para medir a atividade antioxidante, o qual pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (SALCEDO et al., 2014)

Assim como o radical DPPH, o radical ABTS<sup>+</sup> apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análise, além de ser capaz de medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, o que lhe confere vantagens em relação a outros métodos (KUSKOSKI et al., 2005). Porém, estes radicais apresentam algumas diferenças importantes. O radical ABTS necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e, é insolúvel tanto em água como em solventes orgânicos. Enquanto

que o radical DPPH já vem pronto para o uso e é solúvel em solventes orgânicos (ARNAO, 2001).

Por meio da adição de persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do  $ABTS^+$  a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional (KUSKOSKI et al., 2005). Os resultados são expressos em função do Trolox, um padrão antioxidante submetido às mesmas condições de análise. A Figura 7 apresenta a reação de redução do radical  $ABTS^+$  para ABTS em presença de um antioxidante.



O radical  $ABTS^+$  apresenta forte absorção no intervalo de 600-750 nm, o que permite sua determinação por espectrofotometria, sem a presença de antioxidante é um radical estável. Esse método tem sido muito aplicado a amostras biológicas (plasma), carotenoides e compostos fenólicos (KAULMANN et al., 2014; SOGI; SIDDIQ; DOLAN, 2015).

### 3.6.3 Poder redutor

Os métodos baseados na redução do  $Fe^{+3}$ , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos reduzirem o  $Fe^{+3}$ , com conseqüente formação de um complexo colorido com  $Fe^{+2}$  (ROGINSKY; LISSI, 2005).

É um método baseado na transferência de elétrons e mede a habilidade de um potencial antioxidante transferir um elétron a fim de reduzir radicais, metais ou carbonilas, o qual usa como indicativo a mudança de cor do oxidante (SUN; TANUMIHARDJO, 2007).

Conforme aumenta a capacidade dos compostos em doar elétrons para que a reação de redução ocorra, a solução fica mais escura. Portanto o aumento da absorbância indica maior potencial redutor da amostra (YEN; CHEN, 1995).

### **CAPÍTULO III**

#### 4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi realizado em duas etapas, na primeira avaliou-se a aplicação de CM de diferentes intensidade e tempos de exposição no cultivo da microalga *Chlorella kessleri* LEB 113. Na segunda, aplicou-se CM de diferentes intensidades no cultivo de cepas de *Chlamydomonas reinhardtii*, a fim de avaliar a ação dos CM em uma cepa sem parede celular, sendo que cada uma destas etapas correspondeu a um artigo científico, distribuídos do seguinte modo:

Artigo I – INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM CULTIVOS DE *Chlorella kessleri*: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PROXIMAL, PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E ANTIOXIDANTE.

Artigo II – AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* COM E SEM PAREDE CELULAR

**ARTIGO I - INFLUÊNCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EM CULTIVOS DE  
*Chlorella kessleri*: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO, COMPOSIÇÃO PROXIMAL,  
PRODUÇÃO DE PIGMENTOS E ANTIOXIDANTES**

## RESUMO

As microalgas possuem grande aplicação biotecnológica, como na produção de biocombustíveis e compostos de alto valor agregado. A aplicação de campos magnéticos (CM) é uma alternativa eficiente na estimulação da biomassa microalgal e na síntese de biocompostos, viabilizando economicamente a sua produção. Contudo, é necessário estudar os parâmetros de aplicação (intensidade e tempo de exposição) para obter as condições que promovem a estimulação. Diante disto, este trabalho teve como objetivo, aplicar diferentes intensidades e tempos de exposição de CM nos cultivos de *Chlorella kessleri* LEB 113 e avaliar os efeitos no crescimento celular, composição proximal da biomassa, produção de pigmentos e atividade antioxidante. Para isto, os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubular de 2 L, em meio BG-11, durante 10 d a 30°C, 42,6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12 h claro/escuro. A concentração máxima de biomassa ( $X_{\text{máx}}$ ), a produtividade volumétrica máxima ( $P_{\text{máx}}$ ) e a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foram estimuladas em relação ao cultivo controle (sem aplicação de CM) em 83,2; 59,0 e 76,7 %, respectivamente, quando aplicado 60 mT durante 1 h  $\text{d}^{-1}$ . Esta condição estimulou também a síntese de lipídios ( $23,8 \pm 1,1 \text{ \% m m}^{-1}$ ), clorofila *a* ( $8,87 \pm 1,77 \text{ mg L}^{-1}$ ) e carotenóides totais ( $2,23 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ), além da sua biomassa apresentar maior atividade antioxidante em relação ao cultivo controle, sendo esta avaliada por diferentes métodos. Com a aplicação de 30 mT por 1 h  $\text{d}^{-1}$ , além de apresentar  $X_{\text{máx}}$  36,0 % maior que o cultivo controle ( $0,76 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ ), estimulou a produção de proteínas ( $58,6 \pm 0,2 \text{ \% m m}^{-1}$ ), lipídios ( $23,6 \pm 0,7 \text{ \% m m}^{-1}$ ), clorofila *a* ( $7,85 \pm 0,66 \text{ mg L}^{-1}$ ), clorofila *b* ( $3,35 \pm 0,22 \text{ mg L}^{-1}$ ) e carotenóides totais ( $2,34 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$ ). Logo, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a aplicação de CM é uma excelente alternativa na estimulação do crescimento celular e de biocompostos de elevado interesse biotecnológico. Podendo a sua biomassa ser destinada, tanto para produção de biocombustíveis, quanto no enriquecimento nutricional de alimentos, bem como, na produção de pigmentos e compostos com atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante, bioestimulação, carotenóides, clorofilas, microalgas.

**INFLUENCE OF MAGNETIC FIELDS ON *Chlorella kessleri* CULTIVATION:  
EVALUATION OF GROWTH, PROXIMAL COMPOSITION, PIGMENT  
PRODUCTION AND ANTIOXIDANTS**

**ABSTRACT**

Microalgae have several biotechnological applications such as the production of biofuels and high value-added compounds. The application of magnetic fields (MF) has been an efficient alternative to stimulate microalgal biomass and to synthesize biocompounds in order to enable their production in terms of costs. However, application parameters (intensity and exposure time) must be further studied to obtain conditions that may trigger production. Therefore, this study aimed at applying different intensities and exposure times of MF to cultures of *Chlorella kessleri* LEB 113 and at evaluating their effects on cell growth, proximate composition of biomass, pigment production and antioxidant activity. Cultivations were carried in tubular photobioreactors 2 L in BG-11 medium, for 10 d at 30°C, 42.6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and photoperiod 12 h light/dark. The maximum biomass concentration ( $X_{\text{max}}$ ), maximum biomass volumetric productivity ( $P_{\text{max}}$ ) and maximum specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) were stimulated and compared with the control cultivation (without MF application) in 83.2%; 59.0% and 76.7% respectively, when 60 mT was applied for 1 h  $\text{d}^{-1}$ . This condition also stimulated the synthesis of lipids ( $23.8 \pm 1.1 \text{ \% m m}^{-1}$ ), chlorophyll *a* ( $8.87 \pm 1.77 \text{ mg L}^{-1}$ ) and total carotenoids ( $2.23 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ ). Moreover, the microalgal biomass, which was evaluated by different methods, had higher antioxidant activity than the control cultivation. In assays with the application of 30 mT for 1 h  $\text{d}^{-1}$  the  $X_{\text{max}}$  was 36.0 % higher than the one in the control cultivation ( $0.76 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ ). It also stimulated the production of proteins ( $58.6 \pm 0.2 \text{ \% m m}^{-1}$ ), lipids ( $23.6 \pm 0.7 \text{ \% m m}^{-1}$ ), chlorophyll *a* ( $7.85 \pm 0.66 \text{ mg L}^{-1}$ ), chlorophyll *b* ( $3.35 \pm 0.22 \text{ mg L}^{-1}$ ) and total carotenoids ( $2.34 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$ ). Results of this study showed that the MF application is an excellent alternative to stimulate the growth of cells and biocompounds of high biotechnological interest. Therefore, microalgal biomass can be used both for yielding biofuels and for enriching foods, besides the production of pigments and compounds with antioxidant activity.

**Key word:** Antioxidant activity, biostimulation, carotenoids, chlorophylls, microalgae.

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação biotecnológica de microalgas vem crescendo nos últimos anos, por serem fonte potencial de grande variedade de moléculas com alto valor agregado, e com usos diversificados. Sua biomassa é rica em macromoléculas e compostos biologicamente ativos, tais como, ácidos graxos, carotenoides, vitaminas, aminoácidos, peptídeos e polissacarídeos (ADARME-VEGA et al., 2012; LISBOA et al., 2014; MAADANE et al., 2015). Com isso a biomassa microalgal tem sido utilizada na suplementação de alimentos (DRAAISMA et al., 2013), na indústria farmacêutica (MAKI et al., 2014), na aquicultura (LIU et al., 2016; TAELEMAN et al., 2013), assim como na produção de biocombustíveis (LIU et al., 2013; PIEMONTE et al., 2015).

No entanto, a implementação biotecnológica de microalgas apresenta altos custos de produção. Isto torna viável economicamente apenas a produção de nutrientes e produtos de alto valor, quando não empregada a biorrefinaria de microalgas (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Buscando viabilizar economicamente a aplicação microalgal, estudos vêm sendo realizados a fim de estimular o crescimento e o comportamento metabólico destes micro-organismos, para que haja maior produtividade e síntese de biocompostos (HENRARD et al., 2015; HERRERO et al., 2015; HIDALGO; CIUDAD; NAVIA, 2015; SINGH et al., 2016).

Os campos magnéticos (CM) são uma forma alternativa viável para estimular processos biotecnológicos. Alguns estudos foram realizados em cultivos microalgais e constataram que é possível estimular, tanto o crescimento celular, quanto a síntese de macromoléculas e de biocompostos como ácidos graxos e pigmentos (LI et al., 2007; SMALL; HÜNER; WAN, 2012; WANG et al., 2008). Entretanto, os mecanismos de ação dos CM sobre sistemas biológicos ainda não foram totalmente elucidados, e as respostas dos seus efeitos não são lineares, variando com os parâmetros empregados durante o cultivo, como intensidade e tempo de exposição.

A clorófito *Chlorella kessleri* é grande produtora de ácidos graxos, os quais podem ser utilizados, tanto na produção de biodiesel, quanto para enriquecimento nutricional (AMBROZOVA et al., 2014). *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo aplicar campos magnéticos de diferentes intensidades e tempos de exposição nos cultivos de *Chlorella kessleri* LEB 113 e

avaliar os efeitos no crescimento celular, composição proximal da biomassa, produção de pigmentos e atividade antioxidante.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO

Neste estudo foi utilizada a microalga *Chlorella kessleri* LEB 113, a qual pertence à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Esta cepa foi isolada de lagoas de estabilização de cinzas, próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici, e foi mantida e cultivada em meio BG-11, o qual continha ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaNO}_3$  (1,5);  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,04);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,075);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,036);  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$  (0,006);  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}$  (0,001);  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,02);  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (0,006) e solução A5+Co ( $1 \text{ mL L}^{-1}$ ). A solução A5+Co continha ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2,86),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,81),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,222),  $\text{NaMoO}_4$  (0,015),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,079) e  $\text{Co}(\text{NO}_3) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,0494) (RIPPKA et al., 1979).

### 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

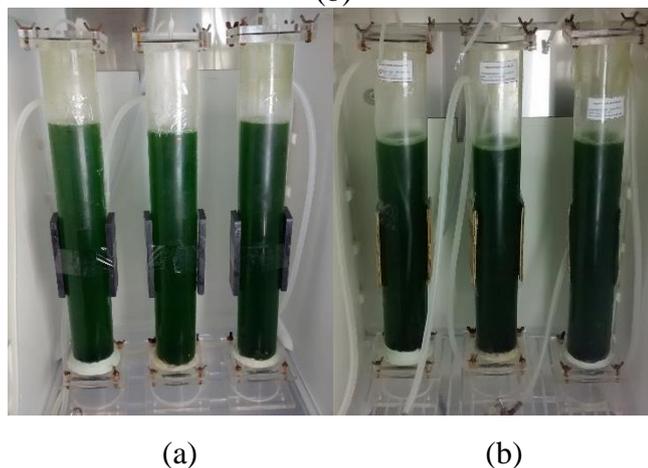
Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais (FTV) de acrílico, com volume total de 2 L, volume útil de 1,8 L, de modo descontínuo e mantidos em estufa termostaticada a  $30^\circ\text{C}$ , iluminância de  $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, durante 10 d (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006). A iluminância foi medida por meio de luxímetro (Instrutherm, LD-209, Brasil). A agitação dos cultivos foi realizada através de injeção de ar comprimido filtrado em lã de vidro estéril, sendo utilizado difusor de pedra sinterizada.

De acordo com estudos prévios, a vazão de ar utilizada foi 0,3 vvm (volume de ar volume de meio $^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) e concentração celular inicial de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  (MORAIS; COSTA, 2007). A evaporação da água durante o cultivo foi controlada por meio da manutenção do volume das culturas com reposição diária de água destilada estéril. Os cultivos foram realizados em triplicata e diariamente foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada fotobiorreator para medida da concentração de biomassa, pH e conteúdo de pigmentos.

### 2.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NOS CULTIVOS

Os CM nos cultivos nos FTV foram aplicados mediante adaptações de ímãs de ferrite com intensidade média de 30 mT (dimensões: 150 x 50 x 10 mm) ou 60 mT (dimensões: 50 x 50 x 25 mm) (DEAMICI, 2015). Em cada fotobiorreator tubular foram utilizados dois ímãs, os quais foram acoplados na parte externa do fotobiorreator tubular, dispostos a 180° de distância um do outro (Figura 1a). Dessa forma, o CM gerado se concentrou na parte interna, onde as microalgas foram cultivadas, e as intensidades de CM foram medidas por medidor de CM (Global Mag, TLMP-HALL 05k, Brasil). Estas medições foram realizadas em vários pontos dos fotobiorreatores, sendo obtida a média da intensidade dos CM.

**Figura 1** – Fotobiorreatores com ímãs de ferrite adaptados (a) e moldes do cultivo controle (b)



A fim de avaliar a influência do tempo de aplicação do CM nos cultivos, os ímãs foram aplicados de duas formas: durante todo o período de cultivo de forma permanente (24 h d<sup>-1</sup>) e durante 1 h d<sup>-1</sup> no período claro de cultivo. Quando o CM foi aplicado por 1 h d<sup>-1</sup>, as alíquotas diárias para realização das análises foram retiradas após 1 h de aplicação do CM, sempre no mesmo período do dia.

Com o objetivo de avaliar apenas a influência dos CM nas respostas avaliadas, se fez necessário realizar cultivos controle (CC). Esses cultivos foram realizados nas mesmas condições de temperatura, luminosidade, aeração e nutrientes, porém sem exposição aos CM. Nestes cultivos, o CM presente foi 0,005 mT (campo magnético terrestre).

Nos locais em que foram adaptados os ímãs nos fotobiorreatores, ocorria a indisponibilidade da luz para as microalgas. Dessa forma, no CC foi utilizado moldes de papelão do mesmo formato e local dos ímãs, a fim de manter a uniformidade da intensidade luminosa recebida pelas microalgas (Figura 1b).

## 2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.4.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada diariamente mediante a leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão), no comprimento de onda de 670 nm. A partir de uma curva padrão, que relaciona a densidade ótica e a massa seca de biomassa foi determinada a concentração de biomassa (COSTA et al., 2002).

### 2.4.2 Determinação de pH

O pH dos cultivos foi avaliado diariamente por meio da leitura direta em pHmetro digital (Quimis, Q400MT, Brasil).

### 2.4.3 Determinação da concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais

As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais foram determinadas por espectrofotometria a 663, 645 e 480 nm, respectivamente. A extração destes compostos foi realizada com acetona 90 % (v v<sup>-1</sup>) segundo a metodologia desenvolvida por Scor-Unesco (1966).

O extrato foi obtido a partir de alíquotas diárias dos cultivos, em que 1,5 mL de cultura foi centrifugado a 6000 rpm por 15 min. Após, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao tubo 0,5 cm de esferas de vidro e 5 gotas de acetona 90 %. Em seguida, agitou-se em vortex, por 3 min para que ocorresse a lise celular. Adicionou-se pequeno volume de acetona 90 % e com o auxílio de pipeta de Pasteur de vidro transferiu-se o extrato para balão de 10 mL e avolumou-se o balão com acetona 90 %. O extrato foi novamente centrifugado a 6000 rpm por 5 min e posteriormente realizou-se as leituras utilizando como branco acetona 90%. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais foram calculadas segundo as Equações 1, 2 e 3, respectivamente (PARSONS; STRICKLAND, 1963).

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 11,64 (\text{Abs}_{663} - \text{Abs}_{750}) - 2,16 (\text{Abs}_{645} - \text{Abs}_{750}) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 20,97 (\text{Abs}_{645} - \text{Abs}_{750}) - 3,94 (\text{Abs}_{663} - \text{Abs}_{750}) \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides totais (mg L}^{-1}\text{)} = 4 (\text{Abs}_{480} - \text{Abs}_{750}) \quad (3)$$

As leituras das absorvâncias foram subtraídas da absorvância a 750 nm para correção da turbidez. A concentração de cada pigmento nos cultivos foi determinada através da Equação 4 (SCOR-UNESCO, 1966), em que PE é a concentração dos pigmentos obtidos nas Equações 1, 2 e 3.

$$\text{Pigmento (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{\text{PE (mg L}^{-1}\text{)} \cdot \text{volume do extrato (L)}}{\text{volume da amostra (L)}} \quad (4)$$

## 2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI, himac CR-GIII, Japão) (9690 g; 20°C; 20 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada (9690 g; 20°C; 10 min) para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada em ultrafreezer (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) por 48 h a - 80°C e posteriormente liofilizada (LABCONCO, EUA). As amostras liofilizadas foram mantidas em freezer a - 20°C para posterior determinação da composição proximal e atividade antioxidante.

## 2.6 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA

As biomassas obtidas após os cultivos foram analisadas quanto ao teor de proteínas, carboidratos e lipídios. Para realização das análises de proteínas e carboidratos foi necessário preparar extratos não clarificados de biomassa. Estes extratos foram obtidos a partir de 10 mg de biomassa microalgal liofilizada e 20 mL de água destilada, que foram sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER, CPX 130, EUA) por 10 min, em ciclos de 59 s (59 s ligada e 59 s desligada). Este procedimento foi realizado com intuito de liberar o material intracelular das microalgas no meio líquido. A análise de lipídios foi realizada diretamente na biomassa liofilizada.

### 2.6.1 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. Para realização desta

metodologia foram adicionados 0,5 mL do extrato da biomassa e 0,5 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> em tubos de ensaios, e estes tubos foram aquecidos a 100°C por 5 min em banho-maria e após foram resfriados.

Em seguida, foram adicionados 2,5 mL da solução que continha Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 % (m v<sup>-1</sup>), tartarato de sódio e potássio 1 % (m v<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,5 % (m v<sup>-1</sup>), e 0,5 mL de Follin-Ciocalteau 1 mol L<sup>-1</sup>. Os tubos foram mantidos por 30 min no escuro e transcorrido este tempo, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 750 nm.

### **2.6.2 Determinação do teor de carboidratos**

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose. Para realização deste método foram adicionados 1 mL do extrato da biomassa e 1 mL da solução fenol 5 % (v v<sup>-1</sup>) em tubos de ensaio, sendo estes agitados, adicionados de 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 % P.A e após foram novamente agitados. Os tubos permaneceram em repouso por 10 min e após foram resfriados. Transcorrido este tempo, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 488 nm.

### **2.6.3 Determinação do teor de lipídios**

O conteúdo de lipídios das amostras foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Marsh e Weinstein (1966). A extração foi realizada através do rompimento celular por agitação em vortex (3 min) de tubos contendo 10 mg de biomassa, 10 esferas de vidro e 5 gotas da mistura clorofórmio-metanol (1:2). Em seguida, 1 mL de clorofórmio- metanol foi adicionado aos tubos e levado ao banho a 60°C por 3 min.

Em seguida o extrato foi transferido para tubos de centrifuga (15 mL) e as esferas foram lavadas com 3,5 mL de clorofórmio-metanol (1:2). Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. A etapa de extração foi realizada até obter-se o sobrenadante incolor.

Os extratos foram coletados em tubos de centrifuga (50 mL) e adicionados 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, centrifugando a 3000 rpm por 10 min, para facilitar a separação das fases. A fase apolar foi transferida para tubos de fundo chato 125 mL, após posterior filtração em papel filtro.

O extrato lipídico foi evaporado em rotaevaporador e ressuspendido em 5 mL de clorofórmio. Em seguida, alíquotas de 200  $\mu$ L do extrato foram adicionadas a tubos HACH (10 mL) e evaporados em banho a 60°C e vácuo. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 % P.A aos tubos, agitou-se em vortex e colocou-se em termobloco a 200°C por 15 min, resfriou-se em banho de gelo (5 min), adicionou-se 3 mL de água destilada, e novamente os tubos foram agitados e resfriados em banho de gelo (10 min). As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 375 nm.

## 2.7 RESPOSTAS ESTUDADAS

### 2.7.1 Comparação entre os ensaios com CM e os ensaios controle

Para comparar os resultados da caracterização da biomassa e dos parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos com aplicação de CM em relação aos CC, foi utilizada a Equação 5 (SANTOS, 2008), em que o valor da relação (%) corresponde a porcentagem de diferença da resposta avaliada com a aplicação de CM, em relação as respostas obtidas nos CC; C<sub>CM</sub> é o valor da resposta do cultivo com CM e C<sub>controle</sub> é o valor correspondente a resposta obtida no CC.

$$\text{Relação (\%)} = \left( \frac{C_{\text{CM}} - C_{\text{controle}}}{C_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

### 2.7.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento

A partir das concentrações de biomassa foram obtidas as concentrações máximas de biomassa (X<sub>máx</sub>, g L<sup>-1</sup>) e avaliados os parâmetros cinéticos. A produtividade volumétrica de biomassa (P, mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi calculada segundo a Equação 6, em que X<sub>t</sub> (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração celular no tempo t (d) e X<sub>0</sub> (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração celular no tempo t<sub>0</sub> (d). A produtividade volumétrica máxima de biomassa (P<sub>máx</sub>, mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi o máximo valor de produtividade obtida por cada ensaio em cada cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ , d<sup>-1</sup>) foi obtida pela regressão exponencial da fase logarítmica de crescimento da microalga, através da Equação 7. O tempo de geração (t<sub>g</sub>, d) de células foi calculado conforme a Equação 8 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_X = \left( \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (6)$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{x} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad (8)$$

## 2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para as análises de atividade antioxidante foram obtidos extratos metanólicos da biomassa de cada ensaio, a partir da metodologia proposta por Lichtenthaler (1987). Misturou-se 10 mL de metanol 99 % com 25 mg de biomassa em tubos de centrifuga (10 mL) homogeneizou-se e manteve-se os tubos a  $-4^\circ\text{C}$  durante 24 h, para posterior análise.

### 2.8.1 Poder Redutor

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Poder Redutor de acordo com Oyaizu (1986), para esta determinação uma amostra de 0,25 mL de extrato metanólico ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foi misturada com 2 mL de tampão fosfato se sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1 %. Essa mistura foi incubada a  $50^\circ\text{C}$  em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de ácido tricloroacético TCA 10 %. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1 %. Após 10 min a absorbância da solução foi lida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento da absorbância da mistura da reação indica aumento do poder redutor.

### 2.8.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido conforme descrito por Rufino et al. (2007b) com modificações. Amostras de 0,1 mL de extrato metanólico ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram adicionadas em 3,9 mL de DPPH  $0,06 \text{ mmol L}^{-1}$  em álcool metílico, em ambiente escuro. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 60 min. A solução controle foi preparada com 0,1 mL de metanol 99 % em substituição ao extrato metanólico. As absorbâncias resultantes das soluções foram medidas a

517 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão). A menor absorbância representa maior capacidade de sequestro do radical DPPH o qual foi calculado de acordo com a Equação 9.

$$\text{Inibição (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

### 2.8.3 Captura do radical livre ABTS

A capacidade de captura do radical livre ABTS foi determinada conforme Rufino et al. (2007a), com modificações. Uma solução de ABTS (7 mmol L<sup>-1</sup>), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi preparada, sendo esta a solução estoque. O cátion radical (ABTS<sup>+</sup>) foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL de solução de persulfato de potássio 140 mM, deixando a mistura em repouso no escuro, a temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter absorbância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm. Preparado e usado apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, transferiu-se alíquota de 30 µL de amostra (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical ABTS<sup>+</sup> e agitou-se. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro após 6 min. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do α-tocoferol), sendo os resultados expressos como µmol Trolox /g de amostra.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

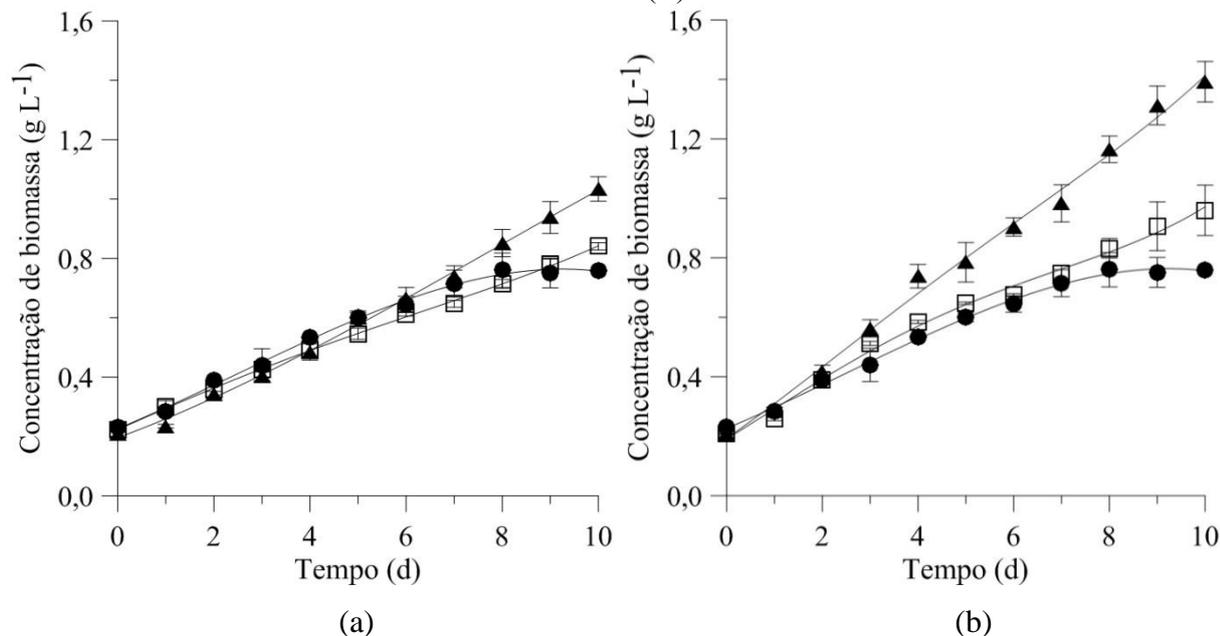
As respostas obtidas dos cultivos com aplicação de CM em diferentes tempos de aplicação e os CC foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % (p ≤ 0,05).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DE *Chlorella kessleri* LEB

A Figura 2 mostra a concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de cultivo (10 d) para a *Chlorella kessleri* LEB 113 cultivada sob aplicação de CM com intensidades de 30 mT (Figura 2 a) e 60 mT (Figura 2 b) e do cultivo controle.

**Figura 2** - Concentração de biomassa de *Chlorella kessleri* LEB 113 cultivada com aplicação de 30 mT e 60 mT, em diferentes tempos de aplicação, 24 h  $\text{d}^{-1}$  ( $\square$ ), 1 h  $\text{d}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) e o cultivo controle ( $\bullet$ ).



Os cultivos apresentaram crescimento para todas as condições experimentais avaliadas, não apresentando fase *lag* de crescimento, devido à prévia adaptação do inóculo em meio BG11 (Figura 2). O CC apresentou fase exponencial até o 5º d, e após o 8º d demonstrou tendência à fase estacionária através da desaceleração do crescimento. Os ensaios com aplicação de 30 mT e 60 mT apresentaram fase exponencial até 5º e 3º d de cultivo, respectivamente, para ambos os tempos de exposição aplicados (24 e 1 h  $\text{d}^{-1}$ ), porém não demonstraram desaceleração do crescimento até o último dia de cultivo (10 d).

A concentração de biomassa do CC no 10º d foi  $0,76 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ . Small, Hünner e Wan (2012) ao cultivarem *C. kessleri* UTEX 398, obtiveram  $0,88 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$  na concentração final de biomassa em 12 d de cultivos, corroborando com os resultados obtidos para o CC no presente trabalho.

Os efeitos do CM em sistemas biológicos podem ser classificados em estimulante, inibitório ou nulo (LI et al., 2007). Comparando os efeitos da aplicação de 30 mT em diferentes tempos de exposição, em relação ao CC, percebeu-se que tanto a exposição de 24 h  $\text{d}^{-1}$ , quanto a de 1 h  $\text{d}^{-1}$ , estimularam a produção de biomassa no 10 d de cultivo, obtendo-se  $0,84 \pm 0,01$  e  $1,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Contudo, a exposição aos CM por menor tempo (1 h  $\text{d}^{-1}$ )

demonstrou maior eficiência em estimular a produção de biomassa, atingindo concentração similar a  $X_{m\acute{a}x}$  do CC no 7º d de cultivo, momento em que a concentração começou a distanciar-se do CC e da condição de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup>. No 9º d a concentração celular desta condição foi estatisticamente superior ao CC.

A exposição de 1 h d<sup>-1</sup> estimulou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o crescimento celular, em relação ao CC e a exposição permanente (24 h d<sup>-1</sup>). O mesmo comportamento foi observado por Luna, Álvarez e Rivero (2011) que utilizaram 30 mT variando o tempo de exposição (24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>) em cultivos de *C. vulgaris*.

Os ensaios com 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup> apresentaram a mesma tendência que os ensaios com 30 mT em relação ao fator tempo de exposição. A exposição a 60 mT durante 24 h d<sup>-1</sup> estimulou a produção de biomassa em 23,6 %, na qual obteve-se  $0,96 \pm 0,08$  g L<sup>-1</sup> no 10 d de cultivo. Enquanto que com a exposição por 1 h d<sup>-1</sup> a produção de biomassa chegou a  $1,39 \pm 0,07$  g L<sup>-1</sup> em 10 d, mostrando-se novamente mais eficiente na estimulação do aumento da biomassa em relação a exposição por 24 h d<sup>-1</sup>. No 3º d de cultivo a aplicação de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> estimulou em 27,8 % a concentração de biomassa, em relação ao CC. Sendo que no 5º d de cultivo a concentração de biomassa foi superior a  $X_{m\acute{a}x}$  do CC.

De forma geral, entre todas as condições estudadas, o tempo de exposição mais eficiente na estimulação da produção de biomassa para ambas as intensidades testadas foi o de 1 h d<sup>-1</sup>. No entanto, a intensidade de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> foi a condição que apresentou maior aumento na concentração de biomassa, 83,2 % superior em relação ao CC no 10º d (Figura 2b).

De acordo com Luna, Álvarez e Rivero (2011) a exposição permanente do CM aos cultivos pode propiciar a adaptação das células ao estresse provocado pelo CM. Esta adaptação poderia explicar o menor estímulo na produção de biomassa proporcionado pela condição permanente (24 h d<sup>-1</sup>) em relação à de 1 h d<sup>-1</sup>.

Na literatura foi encontrado apenas um trabalho que estudou a aplicação de CM em cultivos de *C. kessleri*. Neste estudo, Small, Hüner e Wan (2012) cultivaram *C. kessleri* aplicando 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, e obtiveram estímulo significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) na concentração celular (77,3 %) em relação ao CC (0,88 g L<sup>-1</sup>). No presente estudo, utilizando intensidades 30 e 60 mT para o mesmo tempo de exposição, 24 h d<sup>-1</sup>, a produção de biomassa foi estimulada em 10,6 % e 23,6 %, respectivamente, em relação ao CC ( $0,76 \pm 0,06$  g L<sup>-1</sup>), no 10 d de cultivo. Associando estes resultados com os obtidos por Small, Hüner e Wan (2012), observa-se que a intensidade é um dos fatores que pode influenciar no crescimento celular de forma não linear.

Deamici (2015) cultivou *C. fusca* LEB 111 com aplicação de 30 mT e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>. Este autor observou que para 30 mT o menor tempo de exposição (1 h d<sup>-1</sup>) foi mais eficaz no estímulo da produção de biomassa, sendo 21,9 % maior que o CC no 8º d de cultivo. No entanto, a condição de 24 h d<sup>-1</sup> não mostrou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao CC. Quando aplicado o CM de 60 mT houve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da concentração celular em relação ao CC ( $1,61 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ ) em que ambos os tempos de exposição avaliados. Neste ensaio, o tempo de exposição permanente mostrou-se mais eficiente na produção de biomassa (20,5 %), do que o tempo de 1 h d<sup>-1</sup> (14,3 %).

A relação entre estes resultados corroboram com o efeito “janela” - tempo *versus* intensidade, em que o maior ou menor estímulo devido a aplicação de CM sob sistemas biológicos não ocorre de forma linear, apenas para intensidades e tempos de exposição específicos (MEHEDINTU; BERG, 1997). O que torna necessário o estudo de diferentes intensidades a fim de buscar a otimização de processos biotecnológicos.

Os efeitos que os CM exercem no crescimento celular foram estudados sob um ponto de vista biofísico, mas ainda não foram totalmente elucidados. Apenas nas últimas duas décadas a sua aplicação biotecnológica vem sendo estudada mais profundamente, e alguns estudos têm-se centrado sobre os micro-organismos de interesse biotecnológico (HIRANO; OHTA; ABE, 1998; PAZUR; SCHEER, 1992; SANTOS et al., 2012; SMALL; HÜNER; WAN, 2012; WANG et al., 2008).

Algumas teorias dos mecanismos de ação dos CM são citadas na literatura para tentar explicar sua influência no crescimento celular, tais como, a capacidade de causar alterações na síntese de DNA; na orientação de biomoléculas (proteínas) e alterações de biomembranas (lipídicas e plasmáticas) (MARET; DRANSFELD, 1977); e na alteração do fluxo de íons através da membrana plasmática (COLLIS; SEGAL, 1988), resultando na mudança da taxa de reprodução da célula.

De acordo com a Tabela 1, em relação ao CC ( $0,76 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$ ), os ensaios com 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup> e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup> apresentaram diferença significativa (95 % de confiança) para a  $X_{m\acute{a}x}$  ( $p \leq 0,05$ ), obtendo estímulo da produção de biomassa de 36,0; 23,6 e 83,2 %, respectivamente. Notou-se que para a mesma intensidade de CM (30 ou 60 mT), a exposição ao CM por 1 h d<sup>-1</sup> apresentou resultados significativamente melhores ( $p \leq 0,05$ ) comparando-se quando a exposição foi feita de maneira permanente. Estes resultados indicaram que o tempo de exposição menor é a melhor alternativa quando o objetivo é a produção de biomassa. Neste trabalho a condição que apresentou a maior  $X_{m\acute{a}x}$  foi 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, alcançando-se  $1,39 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ .

**Tabela 1** - Concentração de biomassa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ), produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ ), velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) e tempo de geração ( $t_g$ ) obtidos nos cultivos de *Chlorella kessleri* LEB 113 com aplicação de 30 mT, 60 mT, em diferentes tempos e do cultivo controle.

Parâmetros	Controle	30 mT		60 mT	
		24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>
$X_{m\acute{a}x}$ (g L <sup>-1</sup> )	0,76 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,84 ≤ 0,01 <sup>ab</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,96 ± 0,1 <sup>bc</sup>	1,39 ± 0,07 <sup>d</sup>
$P_{m\acute{a}x}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	83,3 ± 6,5 <sup>a</sup>	81,5 ± 15,9 <sup>a</sup>	82,6 ± 5,9 <sup>a</sup>	101,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	132,5 ± 10,1 <sup>b</sup>
$\mu_{m\acute{a}x}$ (d <sup>-1</sup> )	0,19 ≤ 0,01 <sup>a</sup>	0,17 ≤ 0,01 <sup>b</sup>	0,24 ≤ 0,01 <sup>c</sup>	0,30 ≤ 0,01 <sup>d</sup>	0,34 ≤ 0,01 <sup>e</sup>
$t_g$ (d)	3,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,9 ± 0,03 <sup>e</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), letras distintas indicam diferença estatística.

Morais e Costa (2007) cultivaram *C. kessleri* LEB 15 em fotobiorreator tubular vertical (2 L), nas mesmas condições de temperatura, iluminância e vazão de ar utilizadas no presente trabalho, e obtiveram  $X_{m\acute{a}x}$  de 0,9 g L<sup>-1</sup>. Resultado semelhante ao encontrado para o CC neste trabalho (0,76 ± 0,06 g L<sup>-1</sup>).

O resultado de produtividade ( $P_{m\acute{a}x}$ ) obtido no ensaio com aplicação de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> foi estatisticamente maior ( $p \leq 0,05$ ) que os resultados observados com 30 mT e o CC, atingindo 132,5 ± 10,1 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, 59 % maior que o CC.

Deamici (2015) não obteve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na  $P_{m\acute{a}x}$  quando aplicados CM de diferentes intensidades (30 e 60 mT) e tempos de exposição (24 e 1 h d<sup>-1</sup>) em cultivos de *C. fusca* LEB 111.

Todos os valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $t_g$  diferiram significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ), sendo a condição de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> a que apresentou a maior  $\mu_{m\acute{a}x}$  e o menor  $t_g$ , 0,34 ≤ 0,01 h<sup>-1</sup> e 0,89 ± 0,03 d, respectivamente. Nota-se que a  $\mu_{m\acute{a}x}$  do ensaio com 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> foi menor em relação ao CC, e conseqüentemente neste ensaio foi observado o maior valor de  $t_g$ , porém analisando a Figura 2a, percebesse que a partir do 8° d o CC tendia a entrar na fase estacionária, devido à queda da concentração de biomassa. Entretanto, a condição de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> não demonstrou essa tendência, sugerindo uma fase *log* maior. Com isso, seria necessário realizar os cultivos durante período de tempo maior, a fim de avaliar se essa condição continuaria a estimular a concentração de biomassa.

Deamici (2015) não observou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) na  $\mu_{m\acute{a}x}$  em cultivos de *C. fusca* LEB 111 com aplicação de CM de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>. Porém, nos cultivos

com 60 mT houve diminuição significativa ( $p \leq 0,05$ ) da  $\mu_{\text{máx}}$  para ambos os tempos de exposição em relação ao CC. Estes resultados divergiram com os encontrados no presente estudo, indicando que cada micro-organismo pode se comportar de modo diferente frente a aplicação de CM.

Wang et al. (2008) ao cultivarem *C. vulgaris* sob influência de CM de 10 mT, observaram que a  $\mu_{\text{máx}}$  aumentou de  $0,07 \text{ d}^{-1}$  (CC) para  $0,12 \text{ d}^{-1}$ . No entanto quando a intensidade aplicada foi 35 mT a  $\mu_{\text{máx}}$  foi  $0,09 \text{ d}^{-1}$ .

A relação entre os valores das respostas obtidas com aplicação de CM em relação ao CC estão apresentadas na Tabela 2.

Small, Hüner e Wan (2012) ao cultivarem *C. kessleri* sob aplicação de CM de 10 mT por  $24 \text{ h d}^{-1}$ , obtiveram o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  aproximadamente 95 % maior em relação ao CC. Comparando os resultados do presente trabalho, com os destes autores para o mesmo tempo de exposição ( $24 \text{ h d}^{-1}$ ), observa-se que não houve linearidade na resposta de  $\mu_{\text{máx}}$  em relação a intensidade de CM, pois com 30 mT houve declínio de 13,3 % da  $\mu_{\text{máx}}$ , enquanto que com 60 mT houve incremento de 58,5%.

**Tabela 2** – Relação entre os valores dos parâmetros cinéticos obtidos nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. kessleri* LEB 113.

Parâmetros	30 mT		60 mT	
	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>
$X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )	+ 10,7 %	+ 36,0 %	+ 23,6 %	+ 83,2 %
$P_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	-2,2 %	- 0,9 %	+ 21,9 %	+ 59,0 %
$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	- 13,3 %	+ 24,8 %	+ 58,5 %	+ 76,7 %
$t_g$ (d)	+ 15,3 %	- 20,0 %	- 37,0 %	- 75,4 %

(+) incremento da resposta avaliada referente ao cultivo controle; (-) decréscimo na resposta avaliada referente ao cultivo controle.

A partir dos parâmetros cinéticos avaliados (Tabela 2), a aplicação de 60 mT por  $1 \text{ h d}^{-1}$  mostrou-se como condição ideal quando almeja-se maior produção de biomassa em menor período de tempo, obtendo maiores valores de  $X_{\text{máx}}$  (83,2 %),  $P_{\text{máx}}$  (59,0 %) e  $\mu_{\text{máx}}$  (76,7 %), além do menor  $t_g$  (75,4 %), todos parâmetros comparados ao CC. Sendo capaz de viabilizar economicamente a produção de biomassa, visto que o valor do par de ímãs é de aproximadamente R\$ 22,00, podendo ser utilizado em biorreatores em larga escala através da recirculação do meio através dos ímãs.

### 3.2 EFEITO DO CM NO pH DOS CULTIVOS DE *Chlorella kessleri* LEB 113

Os valores de pH no CC de *C. kessleri* mantiveram-se no intervalo entre 8,7 e 10,7, o que estava dentro do esperado, visto que esta cepa foi isolada das lagoas de estabilização de cinzas, próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici, cujo pH é próximo de 9,8.

O pH dos cultivos com aplicação de CM de 30 mT (24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>) e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> permaneceram no intervalo entre 8,4 e 9,7. Enquanto que os cultivos com aplicação de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> mantiveram-se no intervalo entre 9,3 e 10,5, não apresentando diferenças em relação ao CC.

### 3.3 EFEITO DO CM NA COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA DE *Chlorella kessleri* LEB 113

A composição proximal da biomassa de *C. kessleri* obtida nos CC e com aplicação de CM com intensidade média de 30 mT e 60 mT estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Teor de proteínas, carboidratos, lipídios, em base seca, da biomassa de *Chlorella kessleri* LEB 113 cultivada com 30 mT e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e por 1 h d<sup>-1</sup> e do cultivo controle.

Determinações (% m m <sup>-1</sup> )	Controle	30 mT		60 mT	
		24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>
Proteínas	53,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	57,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	58,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	55,9 ± 2,0 <sup>a</sup>	52,3 ± 0,6 <sup>c</sup>
Carboidratos	18,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	21,4 ± 0,05 <sup>b</sup>	17,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,6 ± 0,4 <sup>d</sup>	16,3 ± 0,3 <sup>d</sup>
Lipídios	20,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	21,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	23,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	20,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	23,8 ± 1,1 <sup>b</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), letras distintas indicam diferença estatística.

Nos ensaios com 30 mT (24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>) foram observados significativamente maiores teores de proteínas ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao CC; este aumento foi 6,7 e 8,9 %, respectivamente.

Da mesma forma, Luna, Álvarez e Rivero (2011) ao utilizarem CM de 30 mT, obtiveram estímulo significativo ( $p \leq 0,05$ ) na síntese de proteínas de *C. vulgaris*, para o tempo de exposição de 24 h d<sup>-1</sup>, em relação ao CC.

O teor de carboidratos aumentou significativamente em 14,3 % na condição de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, em relação ao CC. Entretanto, para as outras condições estudadas, houve diminuição do teor de carboidratos ( $p \leq 0,05$ ), quando comparadas ao CC.

Hirano et al. (1998) estudaram a ação de CM (0 – 70 mT) em cultivos de *Spirulina platensis* e verificaram aumento na síntese de carboidratos quando submetido a CM de 10 mT. Porém, assim como no presente estudo, o teor de carboidratos foi inibido com o aumento da intensidade do CM. Small, Hüner e Wan (2012) ao cultivarem *C. kessleri* com CM de 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, obtiveram aumento de 8,48 e 8,75 % no conteúdo de carboidratos e proteínas, respectivamente, em relação ao CC.

Menestrino e Pintos (2015) aplicaram CM de 80 mT em cultivos autotróficos e mixotróficos (adição de 5 % de pentose) de *Chlorella minutíssima*. A aplicação de CM no cultivo autotrófico estimulou a produção de carboidratos e proteínas em 194,4 % e 187,4 %, respectivamente, em relação ao CC. Nos cultivos mixotróficos o estímulo destes compostos foi 205,4 % e 129,4 % maior quando aplicado o CM, respectivamente.

Deamici (2015) estudou a aplicação de diferentes tempos de exposição de CM de 30 e 60 mT no cultivo de *C. fusca* LEB 111. O ensaio com 30 mT aplicado por 24 h d<sup>-1</sup> estimulou a síntese de carboidratos em 12,7 % em relação ao CC. Este resultado foi semelhante ao encontrado no presente trabalho para a mesma condição.

A relação entre as respostas obtidas com aplicação de CM foram comparadas ao CC utilizando a Equação 7, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Relação entre os valores de composição proximal obtidos nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. kessleri* LEB 113.

Parâmetros	30 mT		60 mT	
	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>	24 h d <sup>-1</sup>	1 h d <sup>-1</sup>
Proteínas	+ 6,7 %	+ 8,9 %	+ 3,9 %	- 2,8 %
Carboidratos	+ 14,3 %	- 4,7 %	- 16,5 %	- 13,2 %
Lipídios	- 1,3 %	+ 13,1 %	+ 0,4 %	+ 13,7 %

(+) incremento da resposta avaliada referente ao cultivo controle; (-) decréscimo na resposta avaliada referente ao cultivo controle.

As intensidades de 30 e 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> não afetaram o teor de lipídios em relação ao CC. Poucos estudos avaliaram o efeito do CM sobre o teor de lipídios, porém na maioria destes trabalhos foram constatados que a aplicação de CM tende a inibir a síntese de lipídios (DEAMICI, 2015; LUNA; ÁLVAREZ; RIVERO, 2011; SMALL; HÜNER; WAN, 2012).

No presente trabalho o teor de lipídios aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao CC, quando aplicados 30 e 60 mT durante 1 h d<sup>-1</sup>, obtendo-se aumento de 13,1 e

13,7 %, respectivamente, demonstrando serem alternativas viáveis para o estímulo na síntese de lipídios no cultivo de *C. kessleri*.

Os CM influenciaram de diferentes maneiras a síntese de macromoléculas (Tabela 4). Relacionando aos valores de  $X_{\text{máx}}$  da condição de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> com o CC (Figura 2a), constatou-se que não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). Porém, quando CM foi aplicado nesta condição houve estímulo da produção de proteínas em 6,7 % e de carboidratos em 14,3 %.

Quando foram aplicados CM de 30 mT durante 1 h d<sup>-1</sup>, houve estímulo de 8,9 % de proteínas e 13,1 % de lipídios, além de estimular em 36,0 % a produção de biomassa (Tabela 2). De acordo com Suganya et al. (2016) a biomassa obtida nesta condição por ser rica em proteínas e lipídios pode ser utilizada no enriquecimento nutricional de alimentos.

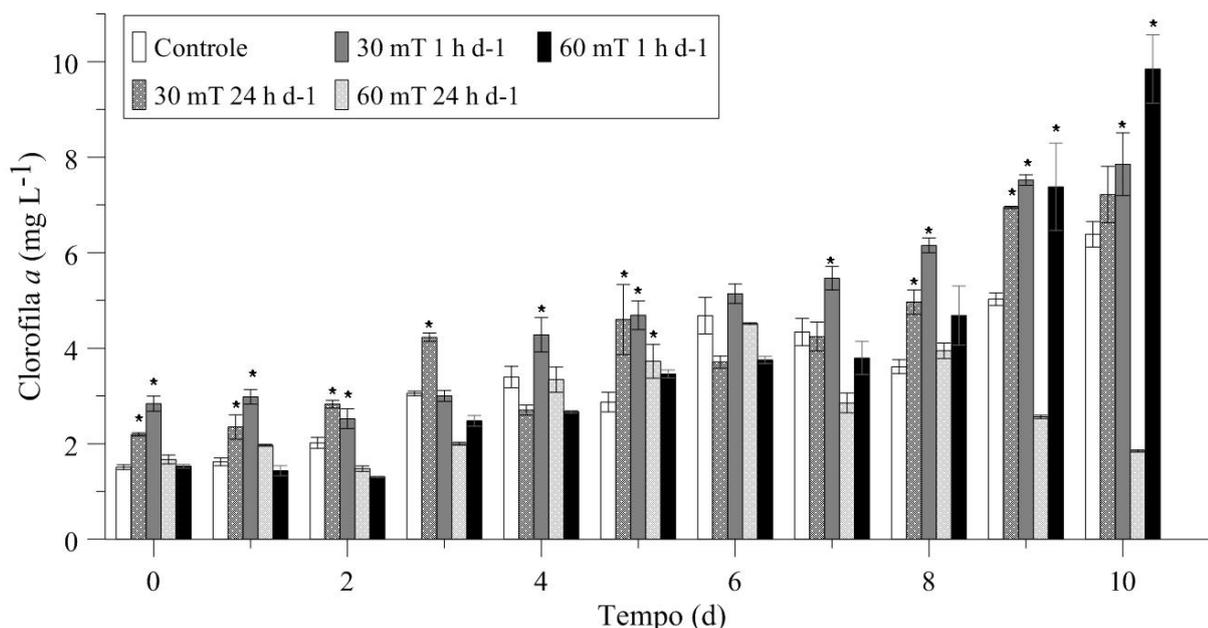
Quando se busca maior produção de biomassa e teor de lipídios, a condição ideal foi com 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, pois obteve-se, respectivamente, incremento de 82,3 % e 13,7 % em relação ao controle. Tal condição pode ser indicada para produção de biodiesel, tornando mais viável economicamente a produção deste combustível. De acordo com Ahmad, Khan e Yasar (2013) o rendimento de biodiesel a partir do óleo de *Chlorella vulgaris* pode chegar a 95 %.

#### 3.4 EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE *Chlorella kessleri* LEB 113

A Figura 3 mostra os resultados das concentrações de clorofila *a*, determinados ao longo dos 10 d de cultivos de *C. kessleri* sob a influência de CM de 30 e 60 mT, expostos durante 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>, e do CC.

A concentração de clorofila *a* obtida no CC ( $6,39 \pm 0,27$  mg L<sup>-1</sup>), assim como, nos ensaios com aplicação de CM com intensidades de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> ( $7,22 \pm 0,59$  mg L<sup>-1</sup>), 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup> ( $7,85 \pm 0,66$  mg L<sup>-1</sup>) e 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> ( $8,87 \pm 1,77$  mg L<sup>-1</sup>) obtiveram concentrações máximas de clorofila *a* no último dia de cultivo (10 d. Nestes ensaios, as concentrações de clorofila *a* aumentaram ao longo do tempo de cultivo (Figura 3). A concentração máxima de clorofila *a* para o ensaio com CM de 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> ocorreu no 6º d de cultivo ( $4,51 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup>), decaindo até o 10 d.

**Figura 3** – Concentração de clorofila *a* ao longo do tempo dos cultivos de *C. kessleri* LEB 113 com aplicação de CM e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

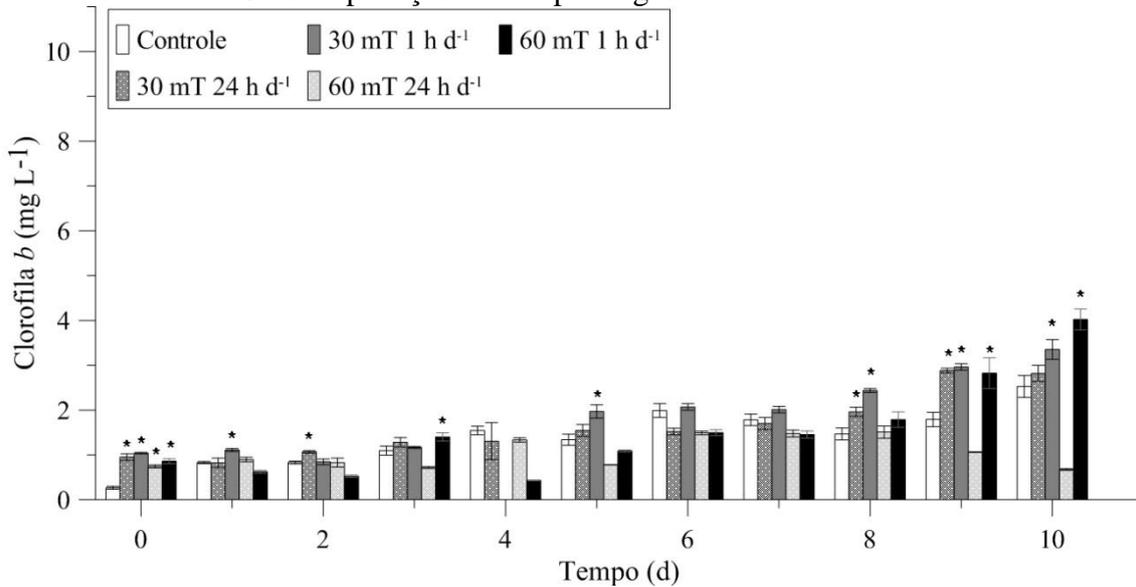
O CM de 30 mT quando exposto por 24 e 1 h d<sup>-1</sup>, estimulou a produção de clorofila *a* no 10<sup>o</sup> d de cultivo em 13,0 e 23,0 %, respectivamente, em relação ao CC. Enquanto que com CM de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> este estímulo foi 38,9 % no mesmo período de tempo.

Li et al. (2007) ao cultivarem *Spirulina platensis* sob influência de CM de 250 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, obtiveram aumento no teor de clorofilas de 31,1 % em relação ao controle. Estes autores mencionaram que o estímulo na síntese de clorofilas torna a absorção da luz mais eficiente, o que pode auxiliar no crescimento celular. Esta mesma hipótese foi levantada por Small, Hüner e Wan (2012) quando cultivaram *C. kessleri* com aplicação de 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, estimulando em 15,2 e 64,2 % os teores de clorofila *a* e *b*, respectivamente.

A Figura 4 apresenta os resultados das concentrações de clorofila *b*, determinados ao longo dos 10 d de cultivos de *C. kessleri* sob a influência de CM de 30 e 60 mT, expostos durante 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>, e do cultivo controle.

As concentrações máximas de clorofila *b* para o CC ( $2,53 \pm 0,24$  mg L<sup>-1</sup>) e com 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup> ( $3,35 \pm 0,22$  mg L<sup>-1</sup>) e 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> ( $4,02 \pm 0,23$  mg L<sup>-1</sup>) foram observadas no último dia de cultivo. Enquanto que no ensaio com CM de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> ( $2,82 \pm 0,34$  mg L<sup>-1</sup>) a concentração máxima ocorreu no 9<sup>o</sup> d. A maior concentração de clorofila *b* observada para o ensaio com aplicação de 60 mT por 24 h d<sup>-1</sup> ocorreu no 8<sup>o</sup> d de cultivo, atingindo  $1,51 \pm 0,14$  mg L<sup>-1</sup> (Figura 4). A clorofila *b* foi estimulada pela aplicação de 30 mT por 24 e 1 h d<sup>-1</sup>, em 11,6 e 32,7%, em relação ao CC, respectivamente. Enquanto que o CM de 60 mT o estímulo foi 59,1 %

**Figura 4** - Concentração de clorofila *b* ao longo do tempo dos cultivos de *C. kessleri* LEB 113 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A concentração de clorofila pode ser utilizada como uma medida indireta da concentração de biomassa de um cultivo, o que pode ser observado nas Figuras 3 e 4. As concentrações de clorofila tendem a aumentar conforme a concentração de biomassa aumenta. Porém, essa associação não ocorreu em todas as condições estudadas. Rial et al. (2013) relataram que o conteúdo celular de clorofila geralmente diminui entre o crescimento exponencial e a fase estacionária e explicariam essa diminuição por limitações de nutrientes, luz e envelhecimento celular.

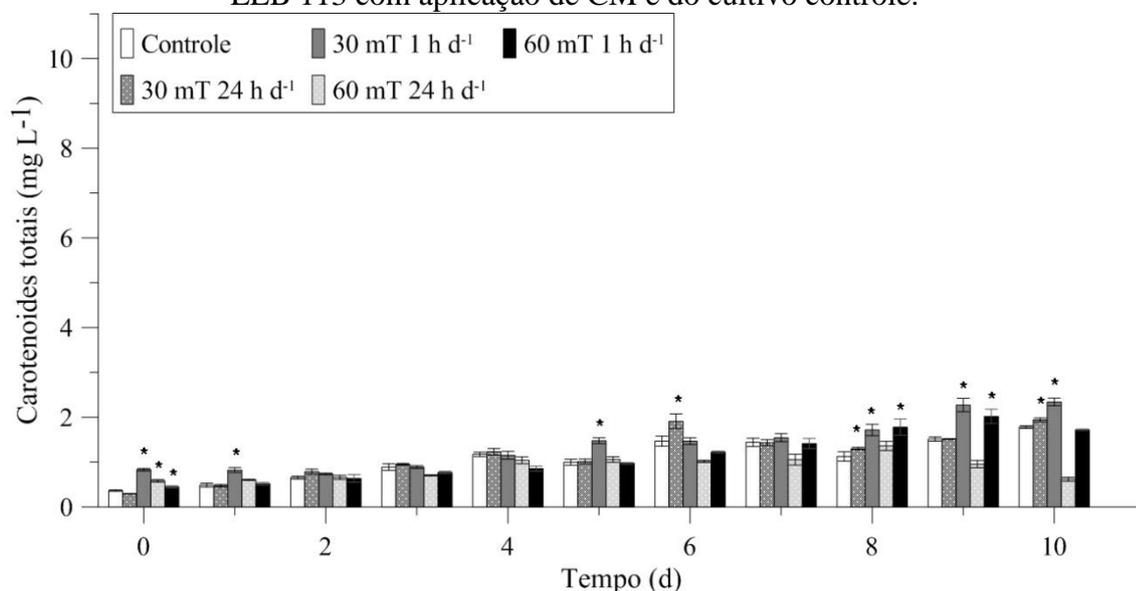
Do ponto de vista biotecnológico, as condições de 30 e 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> apresentaram-se como boa alternativa na estimulação do conteúdo de clorofilas (*a+b*), 25,7 e 44,6 %, respectivamente, em relação ao CC. De acordo com Koller, Muhr e Braunegg (2014) as clorofilas possuem grande aplicação na indústria farmacêutica, além de ser utilizada como aditivo alimentar, devido à sua forte pigmentação verde, aliada à demanda dos consumidores por alimentos naturais.

A Figura 5 ilustra os resultados das concentrações de carotenoides totais, determinados ao longo dos 10 d de cultivos para *C. kessleri* sob a influência de CM de 30 e 60 mT, expostos durante 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup>, e do cultivo controle.

As concentrações de carotenoides totais aumentaram com o tempo de cultivo e atingiram a concentração máxima no último dia (10 d). A concentração máxima determinada para o CC foi  $1,78 \pm 0,03$  mg L<sup>-1</sup>, enquanto que as condições de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 1 h d<sup>-1</sup> obtiveram  $1,94 \pm 0,05$  e  $2,34 \pm 0,08$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A aplicação de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> apresentou  $2,23 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 5), enquanto que no ensaio com exposição por 24 h d<sup>-1</sup>, apresentou  $1,36 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$  concentração máxima no 8º dia de cultivo.

**Figura 5** - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo dos cultivos de *C. kessleri* LEB 113 com aplicação de CM e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Os carotenoides (carotenos e xantofilas) são pigmentos acessórios da fotossíntese na função de capturar a energia da luz. Além disso, por possuírem potencial antioxidante, podem proteger as células em relação aos efeitos negativos do excesso de radiação solar. Os antioxidantes também são necessários para o metabolismo humano a fim de evitar os impactos negativos causados por radicais livres. Estes pigmentos são comercialmente atrativos, uma vez que podem ser utilizados como corantes naturais na produção de alimentos. Estas propriedades incentivam a utilização de carotenoides na produção de alimentos funcionais e na indústria farmacêutica (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014)

Neste contexto, as condições de 30 e 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> são boas alternativas para estimular a produção de carotenoides, conseguindo-se nestas condições incremento de 31,5 e 25,0 % em relação ao CC, respectivamente.

### 3.5 EFEITO DOS CM SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA DE *Chlorella kessleri* LEB 113

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a análise de atividade antioxidante dos extratos metanólicos da biomassa microalgal tratada magneticamente.

**Tabela 5** - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS<sup>+</sup>.

Extratos	Poder redutor (Abs 700 nm)	DPPH (% inibição)	ABTS <sup>+</sup> (μmol de Trolox/g de amostra)
Controle	0,266 ± 0,005 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	195,8 ± 6,9 <sup>a</sup>
30 mT 24 h d <sup>-1</sup>	0,306 ± 0,005 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	228,3 ± 16,7 <sup>b</sup>
30 mT 1 h d <sup>-1</sup>	0,359 ± 0,002 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	266,1 ± 10,2 <sup>c</sup>
60 mT 24 h d <sup>-1</sup>	0,406 ± 0,007 <sup>c</sup>	2,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	268,3 ± 3,3 <sup>c</sup>
60 mT 1 h d <sup>-1</sup>	0,473 ± 0,044 <sup>d</sup>	3,8 ± 0,3 <sup>d</sup>	346,1 ± 5,1 <sup>d</sup>

Para todos os ensaios realizados, nos valores de absorvância média, porcentagem de inibição e μmol de Trolox/g de amostra, letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa a 95% de confiança.

Os cultivos expostos a CM durante 1 h d<sup>-1</sup> apresentaram maiores atividades antioxidantes quando comparados com as exposições de 24 h d<sup>-1</sup> para mesma intensidade, sendo o ensaio com CM de 60 mT (1 h d<sup>-1</sup>), o que apresentou maior atividade antioxidante para as três metodologias usadas dentre todos os ensaios.

É possível observar na Tabela 5 que houve estímulo da produção de antioxidantes nos cultivos de *C. kessleri* quando expostos a CM de diferentes intensidades e tempos de exposição, o que indicou aumento de constituintes antioxidantes na célula. Apenas o ensaio com intensidade de 30 mT (24 h d<sup>-1</sup>) no método de poder redutor, não apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao CC.

Sabe-se que os CM podem exercer estresse oxidativo nos sistemas biológicos, devido a maior produção de estados tripleto nos elétrons, o que pode proporcionar a dissociação destes elétrons na forma de radicais livres através das células (BARNES; GREENEBAUM, 2015; TIMMEL et al., 2001). De acordo com Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), quando a célula é exposta a um estresse oxidativo, pode haver a ativação do seu sistema de defesa, o qual pode ser enzimático (dismutase, catalase e peroxidases) ou não enzimático, constituídos por compostos antioxidantes de baixo peso molecular, como, carotenoides, glutathiona, compostos fenólicos e vitaminas, conseguindo assim se proteger dos radicais livres.

Wang et al. (2008) avaliaram o efeito do CM (5 – 50 mT) no sistema de defesa antioxidante de *Chlorella vulgaris* e observaram aumento na produção de radicais hidroxilas (\*OH) proporcional ao aumento da intensidade do CM nos cultivos, indicando estresse oxidativo maior com o aumento da intensidade. CM entre 10 e 35 mT estimularam o

crescimento celular, além de apresentarem maior incidência de espécies reativas de oxigênio (ERO) que o CC. Porém, as concentrações de ERO foram maiores nos cultivos expostos a CM de 45 e 50 mT, atingindo concentrações próximas ao CC.

Small, Hüner e Wan, (2012) propuseram que o estresse oxidativo ocasionado pelo CM pode exercer efeito hormético nas microalgas, o qual ocorre quando há estimulação do crescimento por substâncias definidas como tóxicas para as células, porém aplicadas em baixas concentrações. O que poderia explicar os resultados encontrados no presente estudo.

A Tabela 5 mostra que houve maior estímulo do sistema de defesa das células quando expostas ao CM nas diferentes condições estudadas. Porém, neste estudo, não foi avaliado a composição do extrato metanólico, mas por ser lipossolúvel pode conter quantidades significativas de carotenoides e compostos fenólicos, duas substâncias com alto poder antioxidante, além de clorofilas.

A biomassa de *C. kessleri* é rica em ácidos graxos poli-insaturados (AMBROZOVA et al., 2014), os quais também podem apresentar atividade antioxidante. Estes podem ser estimulados pelos CM, o que ocasiona o aumento da atividade antioxidante da célula, como observado por Small, Hüner e Wan, (2012), que obtiveram maior produção de ácidos graxos monoinsaturados, por *Chlorella kessleri* quando cultivada sob CM de 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>.

Os carotenoides desempenham papel importante em extinguir espécies reativas de oxigênio (ERO) gerados durante a fotossíntese, especialmente oxigênio atômico (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA-FARFAN, 2008). No presente estudo a condição de 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup> apresentou maior conteúdo de carotenoides totais em relação a condição de 60 mT no mesmo tempo de exposição. O que não refletiu na atividade antioxidante, visto que esta última condição apresentou maior atividade. Porém, as diferentes condições de CM utilizadas neste estudo podem ter estimulado a síntese de carotenoides específicos, pois de acordo com Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), cada carotenoide possui um poder antioxidante diferente, sendo a astaxantina a que possui maior atividade dentre os carotenoides. Yamaoka et al. (1992) ao aplicar CM de 10 mT em cultivos de *Dunaliella salina*, obtiveram estímulo significativo na concentração de β-caroteno em relação ao CC.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho confirmaram que a aplicação de CM em cultivos de *Chlorella kessleri* é alternativa viável para estimular o crescimento celular, bem como a síntese de biocompostos.

Em todas as intensidades e tempos de exposição testadas, ocorreu o aumento da concentração de biomassa de *C. kessleri* LEB 113. Sendo que o maior valor de  $X_{\text{máx}}$  foi obtido com a aplicação de 60 mT durante 1 h d<sup>-1</sup>, sendo este valor 83,2 % superior ao cultivo controle. Em relação à composição da biomassa, quando houve a aplicação de 30 mT por 24 h d<sup>-1</sup> e 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, ocorreu incremento na síntese de carboidratos (14,3 %) e lipídios (13,1 %), respectivamente. Enquanto que com 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup> houve estímulo na síntese de lipídios em 13,7 %.

O aumento da produção de clorofila *a* nos cultivos com aplicação de 30 mT e 60 mT foi observado, o que pode estar relacionado ao estímulo do crescimento, pela aceleração da absorção da luz pela clorofila.

Os CM na maioria das condições avaliadas, mas principalmente com 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, estimularam a produção de antioxidantes, o que pode ser de grande interesse comercial, tornando mais acessível os compostos de alto valor agregado provenientes das microalgas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 96–105, 2012.

AHMAD, F.; KHAN, A. U.; YASAR, A. Transesterification of oil extracted from different species of algae for biodiesel production. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 6, p. 358–364, 2013.

AMBROZOVA, J.; MISURCOVA, L.; VICHA, R.; MACHU, L.; SAMEK, D.; BARON, M.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; JURIKOVA, T. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2344–2360, 2014.

BARNES, F. S.; GREENEBAUM, B. The effects of weak magnetic fields on radical pairs. **Bioelectromagnetics**, v. 36, n. 1, p. 45–54, 2015.

COLLIS, C. S.; SEGAL, M. B. Effects of pulsed electromagnetic fields on Na<sup>+</sup> fluxes across stripped rabbit colon epithelium. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, n. 1, p. 124–30, jul. 1988.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

- DEAMICI, K. M. **Microalgas cultivadas sob ação de campos magnéticos: efeito no crescimento e composição**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGGERS, P. M. E.; BRENTNER, L. B.; ROY, A.; BARBOSA, M. J. Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169–77, abr. 2013.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- HENRARD, A. A.; MARTINS, G.; ROSA, D.; MORAES, L.; GREQUE DE MORAIS, M.; VIEIRA COSTA, J. A. The cultivation of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture media and stirring setting. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 21, p. 1431–1439, 2015.
- HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26–38, set. 2015.
- HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 360–364, nov. 2015.
- HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313–316, 1998.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, out. 2014.
- LI, Z. Y.; GUO, S. Y.; LI, L.; CAI, M. Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700–705, 2007.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.
- LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.
- LIU, C.-H.; CHANG, C.-Y.; LIAO, Q.; ZHU, X.; LIAO, C.-F.; CHANG, J.-S. Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15807–15814, nov. 2013.

- LIU, W.; PEARCE, C. M.; MCKINLEY, R. S.; FORSTER, I. P. Nutritional value of selected species of microalgae for larvae and early post-set juveniles of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa*. **Aquaculture**, v. 452, p. 326–341, fev. 2016.
- LUNA, L. G.; ÁLVAREZ, I.; RIVERO, R. Cultivo de *chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 27–38, 2011.
- MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of biotechnology**, 22 jun. 2015.
- MAKI, K. C.; YURKO-MAURO, K.; DICKLIN, M. R.; SCHILD, A. L.; GEOHAS, J. G. A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 91, n. 4, p. 141–8, out. 2014.
- MARET, G.; DRANSFELD, K. Macromolecules and membranes in high magnetic fields. **Physica B+C**, v. 86-88, p. 1077–1083, jan. 1977.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.
- MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 67–70, jun. 1997.
- MENESTRINO, B. C.; PINTOS, T. E. C. **Produção de biomassa a partir da microalga *Chlorella minutissima* cultivada com aplicação de campos magnéticos visando a produção de bioetanol**. 2015. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349–1352, 2007.
- OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.
- PARSONS, T. R.; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. **Journal of Marine Research**, v. 21, n. 3, p. 155–163, 1963.
- PAZUR, A.; SCHEER, H. The growth of freshwater green algae in weak alternating magnetic fields of 7.8 Hz frequency. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 47, p. 690 – 694, 1992.
- PIEMONTE, V.; DI PAOLA, L.; IAQUANIELLO, G.; PRISCIANDARO, M. Biodiesel production from microalgae: ionic liquid process simulation. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 62–68, jul. 2015.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23–28, 2006.

RIAL, D.; MURADO, M. A.; MENDUIÑA, A.; FUCIÑOS, P.; GONZÁLEZ, P.; MIRÓN, J.; VÁZQUEZ, J. A. Effects of spill-treating agents on growth kinetics of marine microalgae. **Journal of Hazardous Materials**, v. 263, n. 2, p. 374–81, 15 dez. 2013.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides e alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98 p.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.

SANTOS, L. O.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 921–926, dez. 2012.

SCOR-UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in sea-water. **Monographs on Oceanographic Methodology**, v. 1, p. 1–69, 1966.

SINGH, P.; KUMARI, S.; GULDHE, A.; MISRA, R.; RAWAT, I.; BUX, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1–16, mar. 2016.

SMALL, D. P.; HÜNER, N. P. A.; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. **Bioelectromagnetics**, v. 33, n. 4, p. 298–308, 2012.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

TAELMAN, S. E.; DE MEESTER, S.; ROEF, L.; MICHIELS, M.; DEWULF, J. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. **Bioresource technology**, v. 150, p. 513–22, dez. 2013.

TIMMEL, C. R.; CINTOLESI, F.; BROCKLEHURST, B.; HORE, P. J. Model calculations of magnetic field effects on the recombination reactions of radicals with anisotropic hyperfine interactions. **Chemical Physics Letters**, v. 334, n. 4-6, p. 387–395, fev. 2001.

WANG, H.-Y.; ZENG, X.-B.; GUO, S.-Y.; LI, Z.-T. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. **Bioelectromagnetics**, v. 29, n. 1, p. 39–46, 2008.

**ARTIGO II - AÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NO CULTIVO DE CEPAS DE  
*Chlamydomonas reinhardtii* COM E SEM PAREDE CELULAR**

## RESUMO

A aplicação de campos magnéticos (CM) em processos biotecnológicos tem atraindo a atenção devido à eficiência comprovada para estimular o crescimento celular e a produção de biocompostos de alto valor agregado. No entanto, existem poucos estudos relacionados com microalgas, principalmente em cepas sem parede celular. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* é considerada modelo para estudo de fotossíntese. Esta microalga também é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) e, portanto, pode ser utilizada como alimento, sem oferecer risco à saúde humana. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar diferentes intensidades de campos magnéticos (CM) em cultivos de *C. reinhardtii* 2137 (selvagem) e *C. reinhardtii* Wt-S1 (sem parede celular), a fim de avaliar os efeitos no crescimento celular, composição proximal da biomassa, produção de pigmentos e de antioxidantes pela célula e compará-los com seus respectivos cultivos controle (CC) (sem aplicação de CM). Para isto, CM de 11 e 20 mT foram aplicados durante 1 h d<sup>-1</sup> nos cultivos realizados em reatores tipo Erlenmeyer (2 L), a 28°C, 125 rpm, 41,6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, durante 10 d. Com a aplicação dos CM não houve aumento da concentração de biomassa das cepas estudadas, além disto, a cepa sem parede celular mostrou-se mais sensível ao CM, apresentando menores valores de X<sub>máx</sub> e P<sub>máx</sub> em relação ao CC. No entanto, o CM de 20 mT estimulou a produção de proteínas (51,1 ± 0,3 % m m<sup>-1</sup>) e lipídios (19,0 ± 0,4 % m m<sup>-1</sup>) na cepa de *C. reinhardtii* 2137, além de estimular em 31,6 % a produção de lipídios na cepa sem parede celular. Enquanto que a aplicação do CM de 11 mT estimulou na cepa sem parede celular o teor de carboidratos (20,7 ± 0,7 % m m<sup>-1</sup>), lipídios (19,2 ± 0,5 % m m<sup>-1</sup>), a concentração de clorofilas *a* (7,74 ± 0,41 mg L<sup>-1</sup>), clorofilas *b* (4,59 ± 0,23 mg L<sup>-1</sup>) e carotenoides totais (2,71 ± 0,21 mg L<sup>-1</sup>), além da biomassa apresentar maior atividade antioxidante. O aumento da concentração de pigmentos e macromoléculas de interesse industrial devido a aplicação de CM, torna mais viável economicamente a obtenção destes produtos a partir de microalgas.

**Palavras-chave:** Bioestimulação, carotenoides, clorofilas, microalgas.

## ACTION OF MAGNETIC FIELDS ON THE CULTIVATION OF *Chlamydomonas reinhardtii* STRAINS WITH AND WITHOUT CELL WALLS

### ABSTRACT

The application of magnetic fields (MF) to biotechnological processes has drawn attention due to their efficiency to stimulate cell growth and the production of high value-added biocompounds. However, there are few studies of microalgal cultivation with strains without cell walls. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is considered a model for studies of photosynthesis, since it is GRAS (*Generally Recognized As Safe*) and certified by the FDA (*Food and Drug Administration*). Therefore, it can be used as food without any risks to human health. This study aimed at applying different intensities of MF to cultivations of *C. reinhardtii* 2137 (wild type) and *C. reinhardtii* Wt-S1 (without cell wall) in order to evaluate their effects on cell growth, proximate composition of biomass and pigment and antioxidant production. MF of 11 and 20 mT were applied for 1 h d<sup>-1</sup> to cultures in Erlenmeyer reactors (2 L) at 28°C, 125 rpm, 41.6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and photoperiod of 12 h light/dark for 10 d. MF did not stimulate cell growth of the strains under study. In addition, the strain without cell walls was more sensitive to the MF and had values of maximum biomass concentration ( $X_{\max}$ ) and maximum biomass volumetric productivity ( $P_{\max}$ ) lower than the ones of the control cultivation. Nonetheless, MF of 20 mT stimulated the production of proteins ( $51.1 \pm 0.3 \% \text{ m m}^{-1}$ ) and lipids ( $19.0 \pm 0.4 \% \text{ m m}^{-1}$ ) in *C. reinhardtii* 2137 and 31.6 % in the production of lipids in the strain without cell walls. The application of MF of 11 mT stimulated the contents of carbohydrate ( $20.7 \pm 0.7 \% \text{ m m}^{-1}$ ), lipids ( $19.2 \pm 0.5 \% \text{ m m}^{-1}$ ), chlorophyll *a* ( $7.74 \pm 0.41 \text{ mg L}^{-1}$ ), chlorophyll *b* ( $4.59 \pm 0.23 \text{ mg L}^{-1}$ ) and total carotenoids ( $2.71 \pm 0.21 \text{ mg L}^{-1}$ ) in the strain without cell walls. Besides the biomass had high antioxidant activity. Increase in the concentration of pigments and macromolecules of industrial interest due to the application of MF makes it economically feasible to obtain such products from microalgae.

**Key word:** Biostimulation, carotenoids, chlorophylls, microalgae.

## 1 INTRODUÇÃO

A estimulação ou inibição de sistemas biológicos por campos magnéticos (CM) têm despertado interesse nas áreas de biologia celular e biotecnologia para estabelecer os mecanismos básicos desta interação e determinar seu potencial em aplicações práticas, tornando-as mais viáveis (HUNT et al., 2009).

A aplicação de CM em processos biotecnológicos vem atraindo a atenção de pesquisadores devido a eficiência comprovada em estimular, tanto o crescimento celular, quanto a produção de biocompostos de elevado valor agregado, tais como, ácidos graxos, pigmentos (clorofilas, carotenoides, ficocianinas) e antioxidantes (LUNA; ÁLVAREZ; RIVERO, 2011; SANTOS et al., 2012; SMALL; HÜNER; WAN, 2012). Entretanto, é necessário avaliar quais parâmetros relacionados ao CM (tempo de exposição e intensidades) propiciam melhores resultados em relação aos estímulos nas células, o que pode diferir para cada tipo de micro-organismo.

A microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, pertence à classe das clorofíceas, possui formato oval com cerca de 10 µm de comprimento, é considerada modelo para o estudo da fotossíntese e das vias que controlam o crescimento celular. Além disso, essa microalga apresenta elevado potencial para produção de lipídios e, por isso, vem sendo utilizada em processos para produção de biocombustíveis (KARPAGAM et al., 2015). Considerada GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), a biomassa de *Chlamydomonas* pode ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana.

Estudos indicaram que os CM atuam primariamente na membrana plasmática das células (REPACHOLI; GREENBAUM, 1999). No entanto, até o momento nenhum estudo foi encontrado na literatura abordando a aplicação de CM em cepas de microalgas sem parede celular. Desta forma, este trabalho teve como objetivo aplicar diferentes intensidades de campos magnéticos em cultivos de *C. reinhardtii* 2137 (selvagem) e *C. reinhardtii* Wt-S1 (sem parede celular) a fim de avaliar os efeitos no crescimento celular, composição proximal da biomassa e na produção de pigmentos e antioxidantes pela célula.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICROALGA

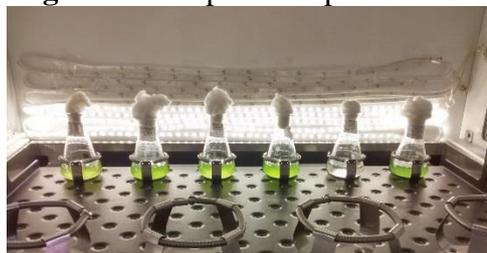
Nesse estudo foram utilizadas duas cepas de *C. reinhardtii*, sendo uma selvagem (2137) e uma geneticamente modificada sem parede celular (Wt-S1), pertencentes ao banco de

cepas do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, da Universidade Técnica de Lisboa, Portugal. As microalgas foram mantidas e cultivadas em meio TAP (Tris-acetato-fosfato) composto por ( $\text{mL L}^{-1}$ ): solução Beijerinck (50); solução tris (10); solução acetato (10); solução fosfato (10) e solução de oligoelementos (1). A solução Beijerinck continha ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8,0),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2,0) e  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,0). A solução Tris continha ( $\text{g L}^{-1}$ ): Tris (242,0) e HCl concentrado ( $149,0 \text{ mL L}^{-1}$ ). A solução fosfato continha ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (14,34) e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7,26). A solução acetato continha ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (136,0) e a solução de oligoelementos continha ( $\text{g mL}^{-1}$ ): EDTA (0,2),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,22),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,057),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,1012),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (0,0322),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,0314),  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,022) e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,0998).

## 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram realizados em reatores tipo Erlenmeyer de 2 L, com volume útil de 1,5 L e mantidos em câmara incubadora com agitação orbital de 125 rpm a  $28^\circ\text{C}$ , iluminância de  $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, durante 10 d. A iluminância foi medida por meio de luxímetro (Instrutherm, LD-209, Brasil). Os cultivos foram iniciados a partir da adição de 150 mL de pré-inóculo em 1350 mL de meio TAP. Os pré-inóculos foram preparados 7 d antes da realização de cada cultivo, nas mesmas condições de temperatura, iluminância e agitação, a partir da adição de 1 mL de inóculo em 150 mL de meio TAP (Figura 1). Os cultivos foram realizados em triplicata. Diariamente foram retiradas amostras de 5 mL de cada reator para determinação da concentração de biomassa, pH e conteúdo de pigmentos.

**Figura 1** – Preparo dos pré-inóculos

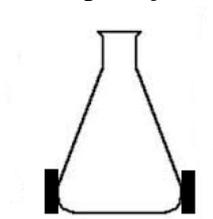


## 2.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS NOS CULTIVOS

A aplicação dos CM no cultivo das microalgas foi feita mediante adaptações de ímãs de ferrite com intensidade média de 11 mT (150 x 50 x 10 mm) e 20 mT (50 x 50 x 25 mm), estes ímãs foram os mesmos utilizados na primeira etapa do trabalho (Artigo I), porém, por estarem mais distantes um do outro devido as configurações do biorreator, as suas

intensidades conseqüentemente foram menores. Em cada fotobiorreator foram utilizados dois ímãs, os quais foram acoplados na base do fotobiorreator, dispostos a 180° de distância um do outro (Figura 2). Dessa forma, o CM gerado se concentrou na parte interna, onde as microalgas foram cultivadas, e as intensidades de CM geradas foram medidas por medidor de CM (Global Mag, TLMP-HALL 05k, Brasil). Estas medições foram realizadas em vários pontos dos fotobiorreatores, sendo obtida a média da intensidade dos CM. Os ímãs foram aplicados durante 1 h d<sup>-1</sup> e as amostras diárias para realização das análises foram retiradas após transcorrido 1 h de aplicação do CM.

**Figura 2** - Esquema da aplicação dos ímãs no biorreator



Com o objetivo de avaliar apenas a influência dos CM nas respostas, se fez necessário realizar o cultivo controle (CC), sem exposição das culturas ao CM, porém nas mesmas condições de temperatura, luminosidade, aeração e nutrientes. Nestes cultivos, o CM presente foi 0,005 mT (campo magnético terrestre).

Nos locais em que foram adaptados os ímãs nos fotobiorreatores, ocorre a indisponibilidade da luz para as microalgas. Dessa forma, no CC foi utilizado moldes de papelão do mesmo formato e local dos ímãs, a fim de manter a uniformidade da intensidade luminosa recebida pelas microalgas.

## 2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.4.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada diariamente mediante leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão), no comprimento de onda de 670 nm, a partir de uma curva padrão, que relaciona a densidade ótica e a massa seca de biomassa (COSTA et al., 2002).

### 2.4.2 Determinação de pH

O pH dos cultivos foi avaliado diariamente por meio da leitura direta em pHmetro digital (Quimis, Q400MT, Brasil).

### 2.4.3 Determinação da concentração de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides totais

As concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais foram determinadas por espectrofotometria (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 652,4, 665,2 e 470 nm mediante extração com metanol 99 %, segundo a metodologia desenvolvida por Lichtenthaler (1987).

O extrato foi obtido a partir de alíquotas diárias dos cultivos, dos quais 1 mL de cultura foi centrifugada a 10000 rpm por 5 min em tubos de Eppendorf (2 mL). Após, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se aos tubos 1 mL de metanol, seguida de agitação em vortex. A extração ocorreu a 4°C durante 24 h no escuro. O conteúdo total de clorofilas *a*, *b* e carotenoides totais foi calculado de acordo com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 16,72 (\text{Abs}_{665,2}) - 9,16 (\text{Abs}_{652,4}) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 34,09 (\text{Abs}_{652,4}) - 15,28 (\text{Abs}_{665,2}) \quad (2)$$

$$\text{Carotenoides totais (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{1000 (\text{Abs}_{470}) - 1,63 (\text{Chl}a) - 104,96 (\text{Chl}b)}{221} \quad (3)$$

## 2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO

Ao final dos cultivos, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI, HIMAC CR-GIII, Japão) (9690 g; 20°C; 20 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada (9690 g; 20°C; 10 min) para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi congelada em ultrafreezer (Eppendorf, New Brunswick Scientific Innova U535, Brasil) por 48 h a -80°C e posteriormente liofilizada (LABCONCO, EUA). As amostras liofilizadas foram mantidas em freezer a -20°C para posterior caracterização quanto ao teor de proteínas, lipídios, carboidratos e atividade antioxidante.

## 2.6 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BIOMASSAS

As biomassas obtidas após os cultivos foram analisadas quanto ao teor de proteínas, carboidratos e lipídios. Para realização das análises de proteínas e carboidratos foi necessário preparar extratos não clarificados de biomassa. Estes extratos foram obtidos a partir de 10 mg de biomassa microalgal liofilizada e 20 mL de água destilada, que foram sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER, CPX 130, EUA) por 10 min, em ciclos de 59 s (59 s ligada e 59 s desligada). Este procedimento foi realizado com intuito de liberar o material intracelular das microalgas no meio líquido. A análise de lipídios foi realizada diretamente na biomassa liofilizada.

### 2.6.1 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. Para tal foram adicionados 0,5 mL do extrato da biomassa, e 0,5 mL de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> em tubos de ensaios, e estes tubos foram aquecidos a 100°C por 5 min em banho-maria e após foram resfriados em banho de água fria por 10 min.

Em seguida, foram adicionados 2,5 mL da solução que continha Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 % (m v<sup>-1</sup>), tartarato de sódio e potássio 1 % (m v<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,5 % (m v<sup>-1</sup>), e 0,5 mL de Follin-Ciocalteu 1 mol L<sup>-1</sup>. Os tubos foram mantidos por 30 min no escuro e transcorrido este tempo, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 750 nm.

### 2.6.2 Determinação do teor de carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose. Para realização deste método foram adicionados 1 mL do extrato da biomassa e 1 mL da solução fenol 5 % (v v<sup>-1</sup>) em tubos de ensaio, sendo estes agitados, adicionados de 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 % P.A e após foram novamente agitados. Os tubos permaneceram em repouso por 10 min e após foram resfriados. Transcorrido este tempo, as absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 488 nm.

### 2.6.3 Determinação do teor de lipídios

O conteúdo de lipídios das amostras foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Marsh e Weinstein (1966). A extração foi realizada através do rompimento celular por agitação em vortex (3 min) de tubos contendo 10 mg de biomassa, 10 esferas de vidro e 5 gotas da mistura clorofórmio-metanol (1:2). Em seguida, 1 mL de clorofórmio- metanol foi adicionado aos tubos e levado ao banho a 60°C por 3 min.

Em seguida o extrato foi transferido para tubos de centrifuga (15 mL) e as esferas foram lavadas com 3,5 mL de clorofórmio-metanol (1:2). Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. A etapa de extração foi realizada até obter-se o sobrenadante incolor (em torno de 3 extrações).

Os extratos foram coletados em tubos de centrifuga (50 mL) e adicionados 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, centrifugando a 3000 rpm por 10 min, para facilitar a separação das fases. A fase apolar foi transferida para tubos de fundo chato 125 mL, após posterior filtração em papel filtro.

O extrato lipídico foi evaporado em rotaevaporador e ressuspendido em 5 mL de clorofórmio. Em seguida, alíquotas de 200 µL do extrato foram adicionadas a tubos HACH (10 mL) e evaporados em banho a 60°C e vácuo. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98 % P.A aos tubos, agitou-se em vortex e colocou-se em termobloco a 200°C por 15 min, resfriou-se em banho de gelo (5 min), adicionou-se 3 mL de água destilada, e novamente os tubos foram agitados e resfriados em banho de gelo (10 min). As absorbâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 375 nm.

## 2.7 RESPOSTAS ESTUDADAS

### 2.7.1 Comparação entre os ensaios com CM e os ensaios controle

Para comparar os resultados da caracterização da biomassa obtida dos cultivos com aplicação de CM em relação aos CC, foi utilizada a Equação 4 (SANTOS, 2008), em que o valor de relação (%) corresponde à diferença percentual da resposta avaliada com a aplicação de CM ( $C_{CM}$ ), em relação as respostas obtidas nos CC ( $C_{controle}$ ).

$$\text{Relação (\%)} = \left( \frac{C_{CM} - C_{controle}}{C_{controle}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

### 2.7.2 Avaliação dos parâmetros de crescimento

A partir das concentrações de biomassa foram obtidas as concentrações máximas de biomassa ( $X_{m\acute{a}x}$ , g L<sup>-1</sup>) e avaliados os parâmetros cinéticos. A produtividade volumétrica de biomassa (P, mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi calculada segundo a Equação 5 (SCHMIDELL et al., 2001), em que  $X_t$  (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração celular no tempo t (d) e  $X_0$  (mg L<sup>-1</sup>) é a concentração celular no tempo  $t_0$  (d). A produtividade volumétrica máxima de biomassa ( $P_{m\acute{a}x}$ , mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) foi o máximo valor de produtividade obtida por cada ensaio em cada cultivo.

$$P_X = \left( \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (5)$$

## 2.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para as análises de atividade antioxidante foram obtidos extratos metanólicos da biomassa de cada ensaio, a partir da metodologia proposta por Lichtenthaler (1987). Misturou-se 10 mL de metanol 99 % com 25 mg de biomassa em tubos de centrifuga (10 mL) homogeneizou-se e manteve-se os tubos a - 4°C durante 24 h, para posterior análise.

### 2.8.1 Poder Redutor

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Poder Redutor de acordo com Oyaizu (1986). Para esta determinação uma amostra de 0,25 mL de extrato metanólico (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) foi misturada com 2 mL de tampão fosfato se sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio 1 %. Essa mistura foi incubada a 50°C em banho-maria por 20 min. Em seguida foi adicionado 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 %. Alíquotas de 2 mL das amostras incubadas foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1 %. Após 10 min a absorbância da solução foi lida a 700 nm em espectrofotômetro. O aumento da absorbância da mistura da reação indica aumento do poder redutor.

### 2.8.2 Capacidade de sequestro da radical livre DPPH

O efeito sequestrador do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazol (DPPH) foi medido conforme descrito por Rufino et al. (2007b) com modificações. Amostras de 0,1 mL de extrato metanólico (2,5 mg mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas em 3,9 mL de DPPH 0,06 mmol L<sup>-1</sup> em

álcool metílico, em ambiente escuro. A mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 60 min. A solução controle foi preparada com 0,1 mL de metanol 99 % em substituição ao extrato metanólico. As absorvâncias resultantes das soluções foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão). A menor absorvância representa maior capacidade de sequestro do radical DPPH o qual foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$\text{Inibição (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (6)$$

### 2.8.3 Captura do radical livre ABTS

A capacidade de captura do radical livre ABTS foi determinada conforme Rufino et al. (2007a), com modificações. Uma solução de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi preparada, sendo esta a solução estoque. O cátion radical ( $\text{ABTS}^+$ ) foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88  $\mu\text{L}$  de solução de persulfato de potássio 140 mM, deixando a mistura em repouso no escuro, a temperatura ambiente, por 16 h. Em seguida, diluiu-se 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter absorvância de  $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$  a 734 nm, a qual foi usada apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, transferiu-se alíquota de 30  $\mu\text{L}$  de amostra ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para tubos de ensaio com 3,0 mL do radical  $\text{ABTS}^+$  e agitou-se. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro após 6 min. Como solução padrão, usou-se o antioxidante sintético Trolox (derivado hidrossolúvel do  $\alpha$ -tocoferol), sendo os resultados expressos como  $\mu\text{mol Trolox /g}$  de amostra.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

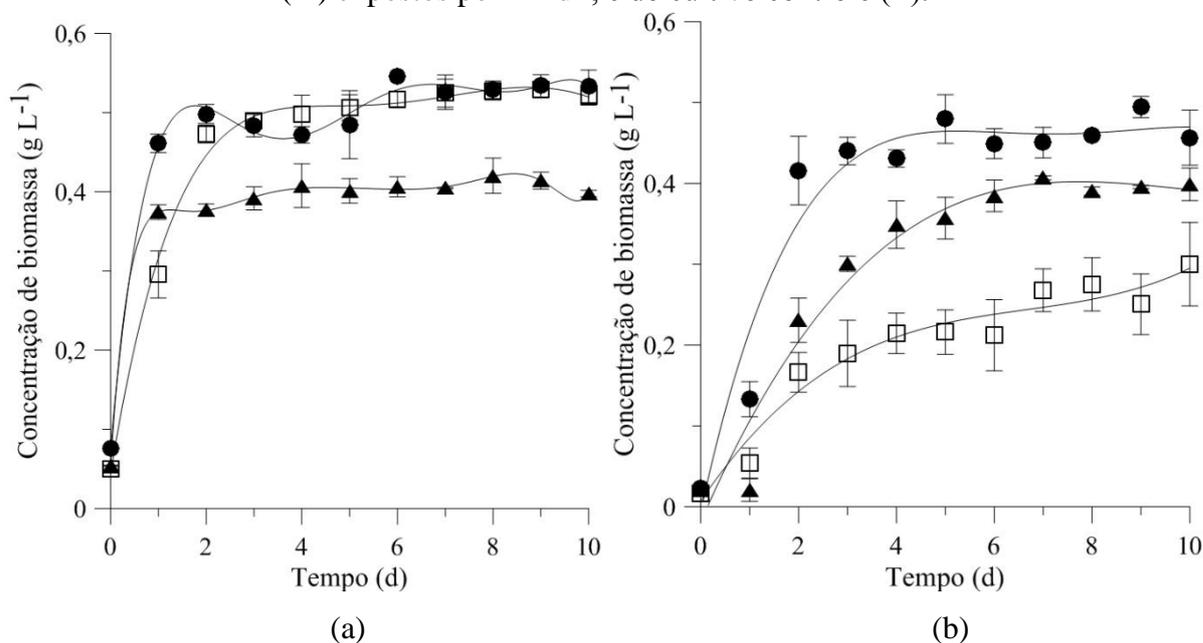
As respostas obtidas dos cultivos com aplicação de CM em diferentes tempos de aplicação e o CC foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii*

A Figura 3 mostra as concentrações de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de cultivo (10 d) para *C. reinhardtii* 2137 e *C. reinhardtii* Wt-S1, cultivadas sob aplicação de CM com intensidades de 11 e 20 mT, e o CC.

**Figura 3** - Concentração de biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* 2137 (a) e *Chlamydomonas reinhardtii* Wt-S1 (b) cultivadas com intensidades de 11 mT ( $\square$ ) e 20 mT ( $\blacktriangle$ ) expostos por 1 h  $\text{d}^{-1}$ , e do cultivo controle ( $\bullet$ ).



Os cultivos apresentaram crescimento para todas as condições experimentais adotadas no presente estudo. O ensaio com a cepa de *C. reinhardtii* Wt-s1 exposto ao CM de 20 mT apresentou fase *lag* até o 1° d de cultivo. Todos os ensaios para a cepa de *C. reinhardtii* 2137 apresentaram rápido crescimento até o 1° d de cultivo, não sendo possível visualizar na Figura 3 a fase exponencial. Os ensaios com a cepa de *C. reinhardtii* Wt-s1 apresentaram rápido crescimento até o 2° d de cultivo e após houve estabilização do crescimento. Assim como nos cultivos com a cepa de *C. reinhardtii* 2137, não foi possível visualizar graficamente a fase exponencial. Para tal, seria necessário realizar o acompanhamento da concentração de biomassa em intervalos menores de tempo. Ambos os cultivos entraram na fase estacionária entre o 1° e 2° d.

Os efeitos biológicos ocasionados por aplicação de CM ocorrem quando são utilizados tempos de exposição e intensidades de CM específicos, podendo variar de acordo

com o tipo de organismo e sua condição fisiológica, o que o torna um mecanismo físico não linear. Este efeito é denominado de “janela magnética”, a qual pode exercer efeitos estimulantes, inibitórios ou nulos em sistemas biológicos (AHMED et al., 2013; LI et al., 2007).

No presente estudo, o CM de 20 mT causou efeito inibitório para a cepa de *C. reinhardtii* 2137, em média de 21,6 % ao longo do cultivo, enquanto que a intensidade de 11 mT proporcionou efeito nulo na concentração de biomassa, quando comparados ao CC. Pazur e Scheer (1992) cultivaram *C. reinhardtii* (11-32B) expostas a diferentes intensidades de campos eletromagnéticos de frequência extremamente baixa (0,002 – 0,02 mT, 7,8 Hz), e observaram efeitos inibitórios conforme o aumento da intensidade. Resultados semelhantes aos cultivos realizados com a cepa de *C. reinhardtii* 2137 neste trabalho.

Ambas as intensidades testadas proporcionaram efeitos inibitórios na concentração de biomassa de *C. reinhardtii* Wt-S1, obtendo no último dia de cultivo (10 d) redução de 34,3 % (11 mT) e 12,6 % (20 mT), quando comparados ao CC. Isso sugere que a ausência da parede celular aumentou a sua sensibilidade à exposição do CM.

Além disso, foi possível observar que a inibição do crescimento em relação ao CC, ocorreu logo a partir do 1º d de cultivo após a exposição aos CM. Isso pode ser explicado pelo fato do CM ter provocado a morte celular de algumas células, enquanto que as demais continuaram a se desenvolver sem quaisquer perturbações. Hallmann (2011) mencionou que uma vez que a reprodução da microalga *C. reinhardtii* baseia-se na progressão geométrica, a pequena alteração do número de células no início do crescimento pode alterar consideravelmente toda a curva de crescimento.

Alguns dos efeitos de estímulo ou inibição dos CM são atribuídos a alterações do fluxo de íons através da membrana plasmática e/ou mudanças na estrutura das biomoléculas (proteínas), afetando a direção da migração e alterando o crescimento e a reprodução dos microorganismos, gerando modificação da velocidade de crescimento celular (LI et al., 2007; MARET; DRANSFELD, 1977). Os casos de inibição de crescimento neste trabalho podem estar relacionados a alterações prejudiciais ao desenvolvimento da célula, modificando negativamente alguma rota metabólica. Fator que pode ter sido amplificado na cepa mutante, devido à ausência da barreira física ao CM proporcionada pela parede celular.

A cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1 quando cultivada sem aplicação do CM, apresentou menor  $X_{máx}$  e  $P_{máx}$  quando comparado ao ensaio controle da cepa selvagem (2137) (Tabela 1). Este fato pode ter ocorrido devido à ausência da parede celular nesta cepa, que proporcionou decréscimo no crescimento. Segundo Macfie, Tarmohamed e Welbourn (1994), a parede celular, além da função estrutural nas microalgas, oferece proteção a concentrações

potencialmente tóxicas de certos metais, como, cobalto, cobre, entre outros, os quais compõem o meio de cultivo utilizado neste trabalho. Macfie e Welbourn (2000) relataram que essa proteção ocorre pela capacidade da parede celular de ligar íons metálicos em locais negativamente carregados.

**Tabela 1** - Concentração de biomassa máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ) e produtividade máxima ( $P_{m\acute{a}x}$ ) obtidos nos cultivos de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1 com aplicação de 11 mT, 20 mT, e do cultivo controle.

Parâmetros	Controle	<i>C. reinhardtii</i> 2137	
		11 mT	20 mT
$X_{m\acute{a}x}$ (g L <sup>-1</sup> )	0,55 ± 0,01 <sup>aA</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>aA</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>bA</sup>
$P_{m\acute{a}x}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	385,0 ± 8,9 <sup>aA</sup>	246,3 ± 31,0 <sup>bA</sup>	320,1 ± 27,6 <sup>cA</sup>
Parâmetros	Controle	<i>C. reinhardtii</i> Wt-S1	
		11 mT	20 mT
$X_{m\acute{a}x}$ (g L <sup>-1</sup> )	0,49 ± 0,01 <sup>aB</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>bB</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>cA</sup>
$P_{m\acute{a}x}$ (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	206,2 ± 37,0 <sup>aB</sup>	74,7 ± 12,9 <sup>bB</sup>	104,9 ± 13,9 <sup>bB</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para o mesmo parâmetro.

A  $X_{m\acute{a}x}$  para o CC de *C. reinhardtii* 2137 ocorreu no 6° d, enquanto que para os ensaios com CM de 11 e 20 mT ocorreram no 9° e 8° d de cultivo, respectivamente. Nos ensaios com a cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1, o CC apresentou valores de  $X_{m\acute{a}x}$  no 9° d de cultivo, enquanto que os ensaios com 11 e 20 mT apresentaram  $X_{m\acute{a}x}$  no 10° e 7° d, respectivamente. Apenas a condição de 11 mT aplicado à *C. reinhardtii* 2137 não apresentou diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) para a  $X_{m\acute{a}x}$ , em relação ao CC. As demais condições mostraram  $X_{m\acute{a}x}$  inferiores estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) ao seus respectivos CC para ambas as cepas avaliadas.

Os cultivos de *C. reinhardtii* 2137 apresentaram a  $P_{m\acute{a}x}$  no 1° d de cultivo, sendo o CC o que obteve  $P_{m\acute{a}x}$  significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ), 385,0 ± 8,9 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Nos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 os valores de  $P_{m\acute{a}x}$  ocorreram no 2° d de cultivo. Além disso, houve diminuição significativa ( $p \leq 0,05$ ) do valor de  $P_{m\acute{a}x}$  em relação ao CC nos ensaios com CM de 11 mT (63,8 %) e 20 mT (49,1 %).

A aplicação do CM neste estudo ocorreu durante 1 h d<sup>-1</sup>. Porém, seria interessante avaliar a aplicação dos CM por um tempo de exposição maior (24 h d<sup>-1</sup>), considerando que o cultivo das cepas de *C. reinhardtii* entraram na fase estacionária entre o 1° e o 2° d de cultivo, aumentando a concentração de biomassa em 600 % em relação a concentração inicial do

cultivo. Com isto, seria possível estimar a sua ação nas primeiras horas de cultivo, período em que a reprodução desta microalga está mais acelerada, e conseqüentemente os processos metabólicos que ocorrem na célula.

A cepa de *C. reinhardtii* 2137 mostrou-se mais sensível ao CM de 20 mT, o qual causou inibição de 23,9 % na  $X_{m\acute{a}x}$ , enquanto que a cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1 foi mais sensível ao CM de 11 mT, com inibição de 42,1 %

Os valores de  $X_{m\acute{a}x}$  e  $P_{m\acute{a}x}$  dos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 com aplicação de CM foram inferiores ao CC, o que pode ter ocorrido devido à ausência da parede celular nesta cepa. Segundo Macfie, Tarmohamed e Welbourn (1994), a concentração de íon Cu necessária para reduzir em 30 % a concentração de biomassa de uma cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* sem parede celular foi 1,3  $\mu\text{mol}$ . A concentração de Cu no meio de cultivo utilizado no presente estudo foi 18,3  $\mu\text{mol}$ , o que poderia justificar a maior inibição na cepa sem parede celular. Além disto, de acordo com Li et al. (2007) os CM aceleram a absorção de nutrientes pela célula. O conteúdo de Cu dobrou nas células magneticamente tratadas, enquanto que o teor de Co foi 0 (cultivo controle) para  $0,25 \pm 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  quando aplicado o CM. Fato este que não foi favorável para a cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1, pois a ausência da parede celular poderia aumentar a concentração de metais (Cu e Co) à níveis tóxicos por serem absorvidos mais rápidos pelas células.

### 3.2 EFEITO DO CM NO pH DOS CULTIVOS DE *Chlamydomonas reinhardtii*

Os valores de pH dos CC de *C. reinhardtii* 2137 e *C. reinhardtii* Wt-S1 permaneceram na faixa entre 7,5 - 8,3 e 7,5 - 8,0. Valores de pH semelhante ao encontrado por Saleem et al (2012) para a mesma espécie, o qual obteve valores entre 7,5 e 9.

Os cultivos com aplicação de CM de 11 e 20 mT em *C. reinhardtii* 2137 apresentaram valores de pH no intervalo entre 7,1 - 8,2 e 7,4 - 8,0, respectivamente. Enquanto que para cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1 o intervalo permaneceu entre 7,4 - 8,3 e 7,3 - 8,6, respectivamente. O que indica que o pH dos cultivos com aplicação de CM não sofreu influência, quando comparado aos CC.

### 3.3 EFEITO DO CM NA COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA BIOMASSA DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii*

A composição proximal da biomassa de *C. kessleri* obtida nos CC e com aplicação de CM com intensidade média de 30 mT e 60 mT estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Teor de proteínas, carboidratos, lipídios, em base seca, da biomassa de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1 cultivada com 11 e 20 mT e dos cultivos controle.

Determinações (% m m <sup>-1</sup> )	Controle	<i>C. reinhardtii</i> 2137	
		11 mT	20 mT
Proteínas	45,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	46,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	51,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
Carboidratos	34,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	31,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	28,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
Lipídios	15,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	11,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	19,0 ± 0,4 <sup>c</sup>
Determinações (% m m <sup>-1</sup> )	Controle	<i>C. reinhardtii</i> Wt-S1	
		11 mT	20 mT
Proteínas	54,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	55,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	51,1 ± 0,2 <sup>b</sup>
Carboidratos	18,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	20,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	16,0 ± 1,0 <sup>c</sup>
Lipídios	16,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	19,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	21,1 ± 1,0 <sup>c</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), letras distintas indicam diferença estatística.

Nos cultivos com *C. reinhardtii* 2137, o CM de 20 mT aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o teor de proteínas e lipídios, em relação ao CC. Porém, a aplicação de 11 mT não estimulou a produção destas macromoléculas, os valores de teor de proteínas foram estatisticamente iguais e houve diminuição do conteúdo de carboidratos (9,3 %) e lipídios (28,8 %) em relação ao CC (Tabela 2).

Os cultivos com *C. reinhardtii* Wt-S1 apresentaram estímulo no teor de lipídios de acordo com a intensidade empregada, pois quando o CM de 20 mT foi aplicado houve incremento de 31,6 % em relação ao CC, e com 11 mT houve aumento de 19,7 %. A intensidade de 11 mT também mostrou-se eficaz ao estimular significativamente a síntese de carboidratos em relação ao CC.

Outros autores obtiveram estímulo na síntese de lipídios utilizando CM em cultivos de clorófitas. Luna, Álvarez e Rivero (2011) cultivaram *Chlorella vulgaris* utilizando residual de soja como substrato e aplicação de 30 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, estimulando em 79,8% a produção de lipídios em relação ao cultivo controle. Small, Hüner e Wan (2012) ao cultivarem *C. kessleri* com CM de 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, obtiveram elevação de 8,48 e 8,75 % no conteúdo de carboidratos e proteínas, respectivamente, em relação ao CC.

As relações entre os valores da composição proximal para os ensaios obtidos com aplicação de CM em relação ao CC estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Relação entre a composição proximal obtidas nos cultivos com aplicação de CM e o CC de *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1

Determinações (% m m <sup>-1</sup> )	<i>C. reinhardtii</i> 2137	
	11 mT	20 mT
Proteínas	+ 2,9 %	+ 12,8 %
Carboidratos	- 9,3 %	- 16,4 %
Lipídios	- 28,8 %	+ 20,5 %
Determinações (% m m <sup>-1</sup> )	<i>C. reinhardtii</i> Wt-S1	
	11 mT	20 mT
Proteínas	+ 2,8 %	- 6,0 %
Carboidratos	+ 15,1 %	- 10,7 %
Lipídios	+ 19,7 %	+ 31,6 %

(+) incremento da resposta avaliada referente ao cultivo controle; (-) decréscimo na resposta avaliada referente ao cultivo controle.

A aplicação de CM no cultivo de *C. reinhardtii* demonstrou ser eficiente alternativa na estimulação da produção de macromoléculas. A intensidade de 20 mT propiciou maior estímulo de proteínas (12,8 %) e lipídios (20,5 %) para a cepa de *C. reinhardtii* 2137. O que de acordo com Mata, Martins e Caetano (2010) poderia ser empregada no enriquecimento nutricional de alimentos destinado tanto para humanos, quanto para animais.

Acionar a síntese de lipídios e assim aumentar o seu teor em *C. reinhardtii* vem sendo abordado por muitos pesquisadores, principalmente para produção de biodiesel (CAKMAK et al., 2012; KARPAGAM et al., 2015; SIAUT et al., 2011). A aplicação de CM em ambas as cepas estudadas demonstrou potencial no estímulo da síntese de lipídios, principalmente para a cepa sem parede celular com aplicação de CM de 20 mT, a qual obteve aumento de 31,6 %.

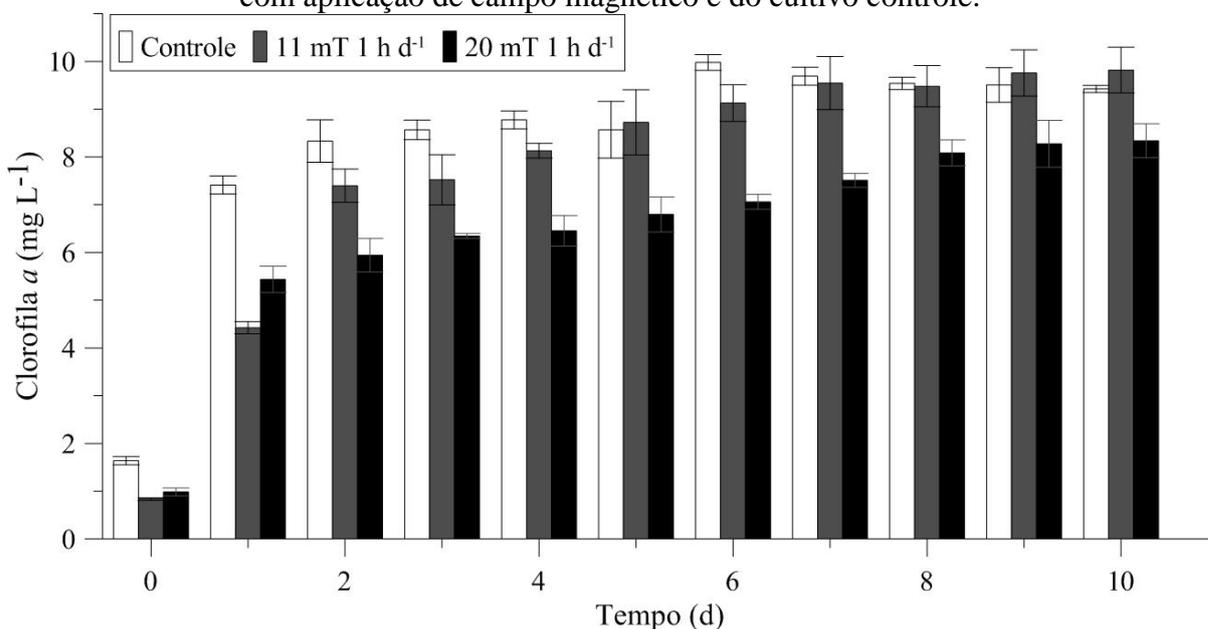
Trabalhos vem relatando sobre a capacidade de elevada produção lipídica por *Chlamydomonas reinhardtii* sem parede celular, quando comparada a cepas selvagens, produzindo até 10 vezes mais lipídios (LI et al., 2010; SIAUT et al., 2011). Para isto, utiliza-se da privação de alguns nutrientes, principalmente nitrogênio, causando algum tipo de estresse na célula responsável pelo estímulo da produção de lipídios. Este estímulo também foi notado quando foram aplicados CM em *C. reinhardtii* Wt-S1 neste estudo, proveniente do estresse ocasionado pelo CM. Para aumentar a viabilidade da produção de biodiesel a partir de microalgas é necessário buscar alternativas que estimulem a síntese de lipídios. Portanto, seria

de grande interesse avaliar a aplicação de CM em conjunto com a técnica de redução de nutrientes, no intuito de estimular ainda mais a síntese lipídica nesta cepa.

#### 3.4 EFEITO DO CM NA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii*

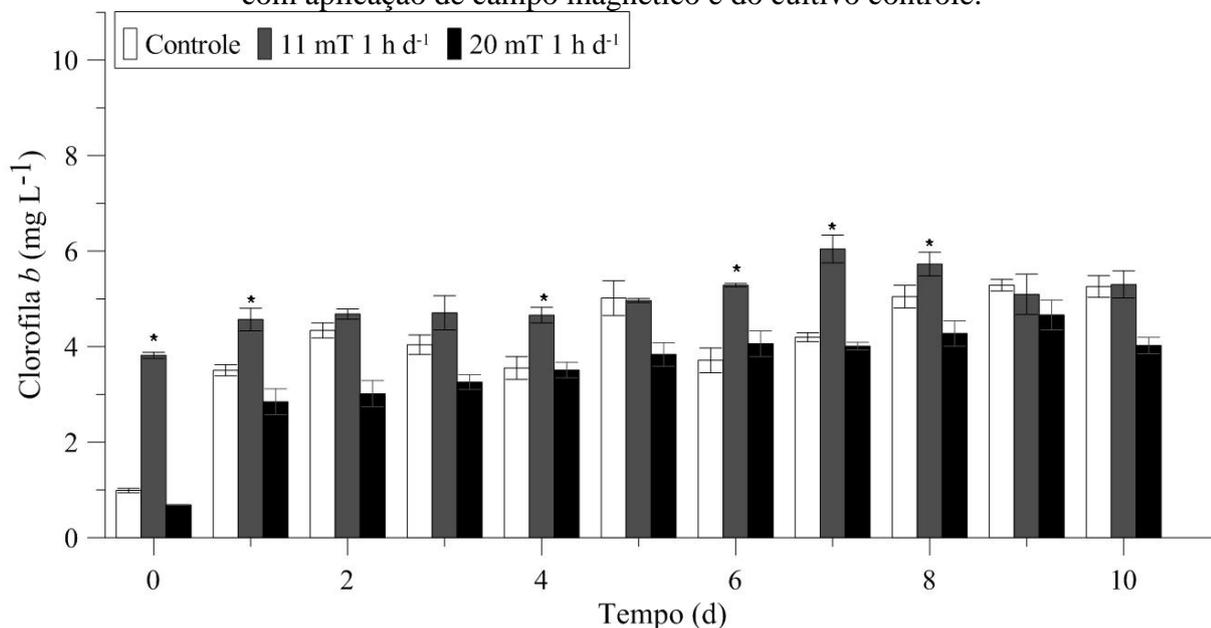
A Figura 4 apresenta os resultados das concentrações de clorofila *a*, determinados ao longo dos cultivos de *C. reinhardtii* 2137, sob a influência de CM de 11 e 20 mT, e do CC. A concentração de clorofila *a* para *C. reinhardtii* 2137 em ambas as condições testadas aumentou em torno de 4,6 – 5,5 vezes no 1º d de cultivo em relação à concentração inicial (Figura 4). A concentração máxima foi alcançada no 6º dia para o CC ( $9,98 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ ) e no último dia de cultivo (10 d) para a os ensaios com aplicação de CM, 11 mT ( $8,34 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 20 mT ( $9,82 \pm 0,48 \text{ mg L}^{-1}$ ).

**Figura 4** - Concentração de clorofila *a* ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



As concentrações máximas de clorofila *b* para os diferentes ensaios de *C. reinhardtii* 2137 foram,  $5,29 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$  (CC) e  $4,66 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$  (20 mT) no 9º d de cultivo (Figura 5). A condição de 11 mT obteve  $5,90 \pm 0,30 \text{ mg L}^{-1}$  no 7º d, estímulo 44,0 % maior ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao CC no mesmo período, o que mostrou-se favorável quando busca-se maior produção de pigmentos em menor período de tempo.

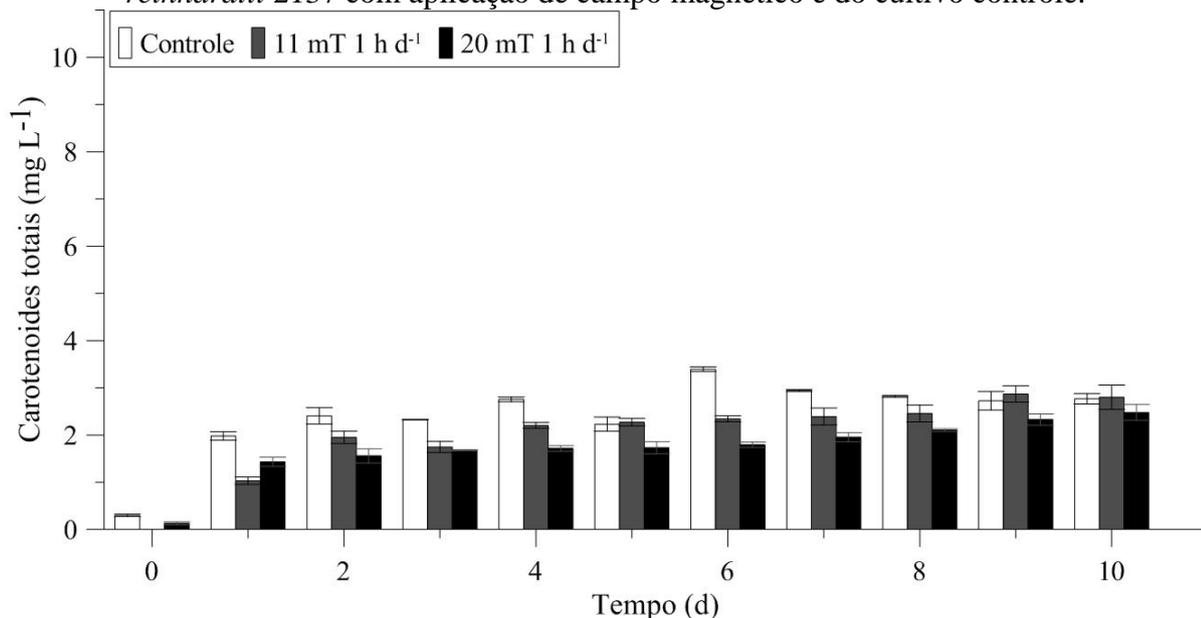
**Figura 5** - Concentração de clorofila *b* ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A Figura 6 apresenta os resultados das concentrações de carotenoides totais, determinados ao longo dos cultivos de *C. reinhardtii* 2137, sob a influência de CM de 11 e 20 mT, e do CC

**Figura 6** - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* 2137 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.

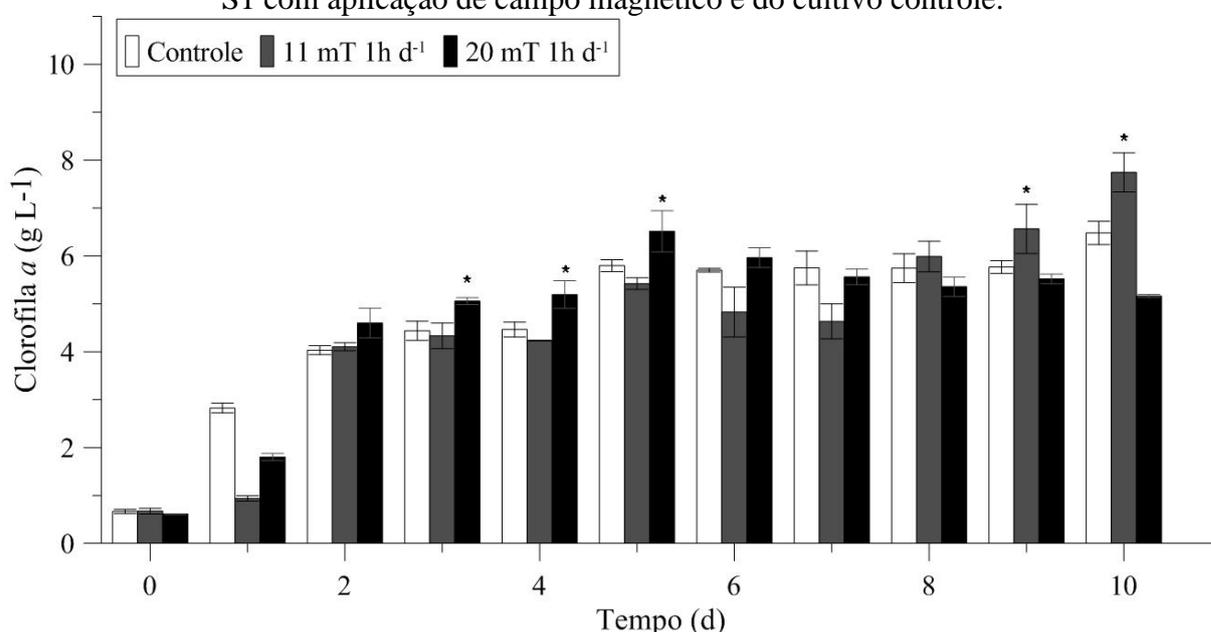


A concentração de carotenoides totais do CC foi máxima no 6º d de cultivo ( $3,39 \pm 0,05$  mg L<sup>-1</sup>), enquanto que nas condições com CM as concentrações máximas ocorreram no 9º

d com 11 mT ( $2,87 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$ ) e no 10º d com 20 mT ( $2,48 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$ ), não havendo estímulo deste pigmento quando foi aplicado os CM (Figura 6).

A concentração máxima de clorofila *a* para o CC nos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 foi  $6,48 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$  obtida no 10º d de cultivo, enquanto que para a condição de 11 mT no mesmo período foi  $7,74 \pm 0,41 \text{ mg L}^{-1}$ , 19,5 % maior ( $p \leq 0,05$ ). Entretanto, a condição de 20 mT apresentou concentrações máximas no 5º d, obtendo  $6,40 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$ , 12,3 % maior que o CC no mesmo período, condição ideal para produção deste pigmento em menor período (Figura 7).

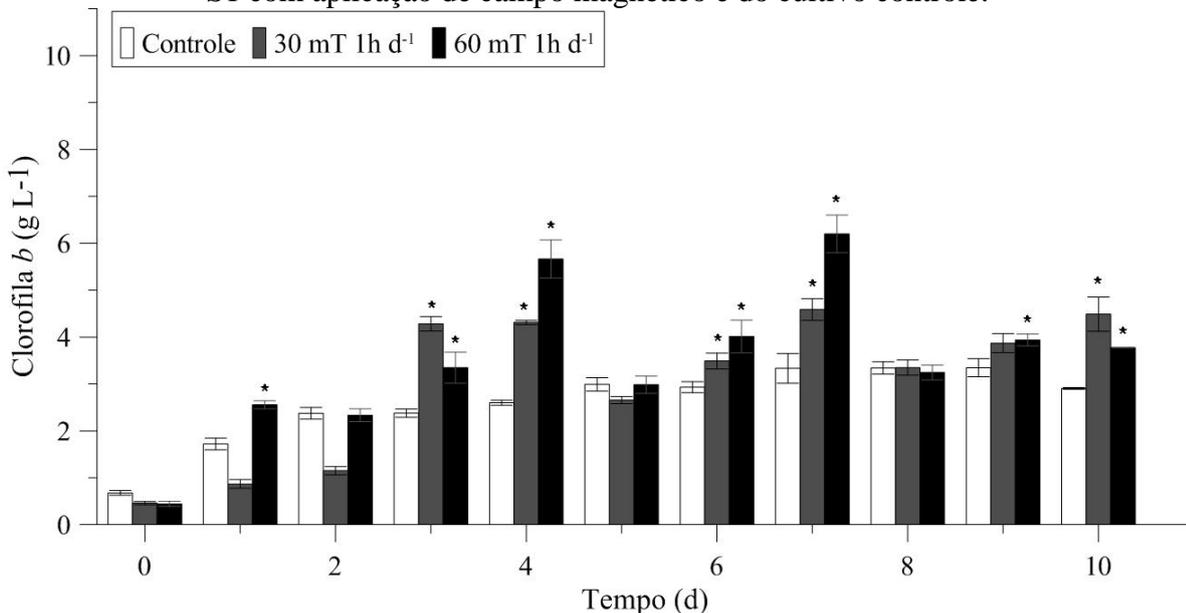
**Figura 7** - Concentração de clorofila *a* ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O CC de *C. reinhardtii* Wt-S1 apresentou concentração máxima de clorofila *b* no 9º d de cultivo ( $3,35 \pm 0,19 \text{ mg L}^{-1}$ ), enquanto que os CM de 11 e 20 mT apresentaram concentração máxima no 7º d, estimulando a síntese deste pigmento em relação ao CC em 37,7 % ( $4,59 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 86,0 % ( $6,20 \pm 0,40 \text{ mg L}^{-1}$ ), respectivamente (Figura 8). No entanto, no 4º d, o estímulo de clorofila *b* foi 65,9 % ( $4,31 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 118,0 % ( $5,66 \pm 0,41 \text{ mg L}^{-1}$ ) maior que o CC ( $2,60 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ) no mesmo período, demonstrando ser alternativas viáveis para estimular a síntese deste pigmento em menor período de tempo.

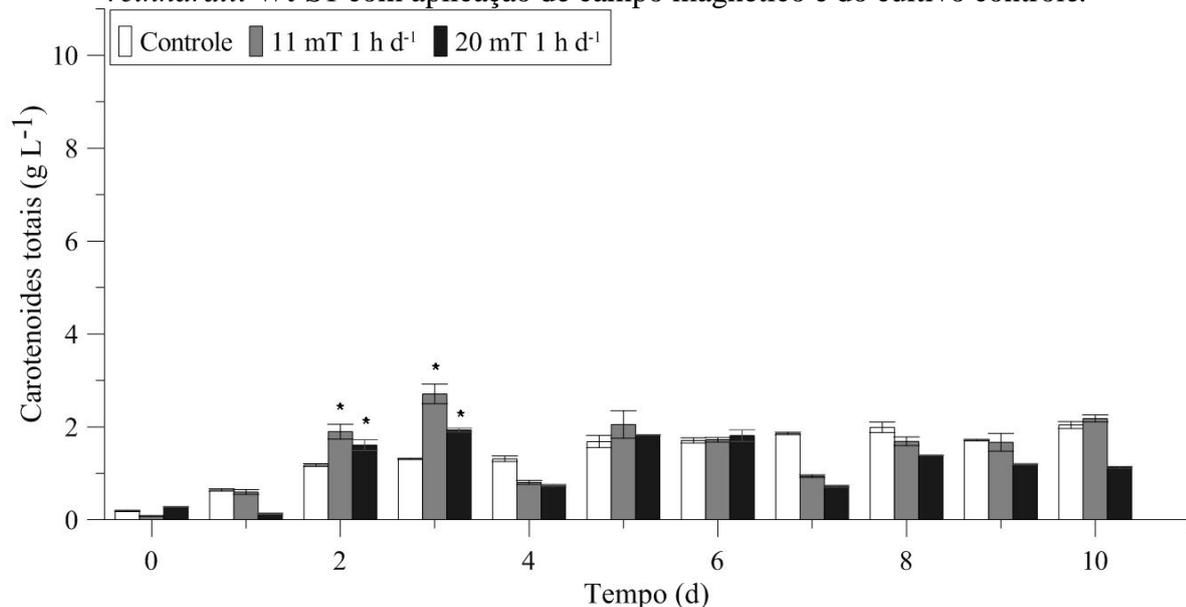
**Figura 8** - Concentração de clorofila *b* ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A concentração máxima de carotenoides totais para o CC de *C. reinhardtii* Wt-S1 ocorreu no 10<sup>o</sup> d ( $2,04 \pm 0,02$  mg L<sup>-1</sup>) (Figura 9). Quando aplicou-se os CM, as máximas concentrações foram alcançadas no 3<sup>o</sup> d, obtendo  $2,71 \pm 0,21$  mg L<sup>-1</sup> (11 mT) e  $1,93 \pm 0,04$  mg L<sup>-1</sup> (20 mT). Comparando estas concentrações com a do CC no mesmo dia, os CM de 11 e 20 mT estimularam em 106,8 % e 47,4 % a produção de carotenoides totais, respectivamente.

**Figura 9** - Concentração de carotenoides totais ao longo do tempo, dos cultivos de *C. reinhardtii* Wt-S1 com aplicação de campo magnético e do cultivo controle.



(\*): Respostas significativamente maior que o cultivo controle a 95 % de confiança pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Li et al. (2007) ao cultivarem *Spirulina platensis* sob influência de CM de 250 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, obtiveram aumento do teor de clorofilas de 31,1 % em relação ao CC. Os autores mencionaram que esse fator torna a absorção da luz pelas clorofilas mais eficiente, o que pode auxiliar no crescimento celular. O mesmo efeito foi encontrado por Small, Hüner e Wan (2012), quando cultivaram *C. kessleri* com CM de 10 mT por 24 h d<sup>-1</sup>, estimulando em 15,2 % e 64,2 % os teores de clorofila *a* e *b*, respectivamente.

Assim como estes autores, no presente estudo, a cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1 apresentou maiores concentrações de clorofila *a*, *b* e carotenoides totais frente a aplicação de CM de 11 e 20 mT, porém não houve estimulação da concentração de biomassa. Supõe-se que o estímulo destes pigmentos pode estar associado a ausência da parede celular nesta cepa, facilitando o acúmulo de metais na célula, tais como, cobre e cobalto, e estimulando a síntese de pigmentos devido ao estresse que estes metais podem provocar. Além disto, o acúmulo destes metais pode ser acelerado pelo CM.

Yamaoka et al (1992) ao aplicarem CM de 10 mT em cultivos de *Dunaliella salina* observaram maior acúmulo de metais pesados (Co, Cd, Cu e Ni) nos cultivos em relação ao CC, além de maior estímulo da produção de  $\beta$ -caroteno.

A estimulação de pigmentos por microalgas pode ser obtida através de estresses imposto por condições ambientais, como água hipersalina, temperatura e concentração de metais pesados. Ajayan, Selvaraju e Thirugnanamoorthy (2011) cultivaram *Scenedesmus bijuga* em águas residuais e avaliaram sua capacidade em acumular metais pesados. Esta microalga foi capaz de acumular quantidades significativas de cobre, cobalto, chumbo e zinco, além de estimular a concentração de clorofilas e carotenoides na biomassa.

### 3.5 EFEITO DOS CM SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA DE CEPAS DE *Chlamydomonas reinhardtii*

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a análise de atividade antioxidante dos extratos metanólicos da biomassa microalgal tratada magneticamente.

As atividades antioxidante do CC e da condição de 20 mT foram estatisticamente iguais ( $p \leq 0,05$ ) em todos os métodos avaliados para a cepa de *C. reinhardtii* 2137 (Tabela 4). O CM de 11 mT apresentou menor atividade antioxidante em relação as demais condições, nos métodos de poder redutor e DPPH. Supõe-se que os parâmetros (tempo de exposição e intensidade) utilizados para esta cepa não proporcionaram estresse oxidativo nas células, e

consequentemente, não houve ativação do sistema de defesa e a produção de compostos antioxidantes.

**Tabela 4** - Atividade antioxidante dos extratos metanólicos determinada pelo método do poder redutor, DPPH e ABTS<sup>·+</sup>.

Microalga	Extratos	Poder redutor (Abs 700 nm)	DPPH (% inibição)	ABTS <sup>·+</sup> (μmol de Trolox/g de amostra)
<i>C. reinhardtii</i> 2137	Controle	0,497 ± 0,002 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	487,2 ± 36,7 <sup>a</sup>
	11 mT	0,466 ± 0,011 <sup>b</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	462,8 ± 10,2 <sup>a</sup>
	20 mT	0,495 ± 0,004 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	492,8 ± 29,1 <sup>a</sup>
<i>C. reinhardtii</i> Wt-S1	Controle	0,343 ± 0,007 <sup>a</sup>	4,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	410,7 ± 17,1 <sup>a</sup>
	11 mT	0,378 ± 0,001 <sup>b</sup>	5,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	496,7 ± 17,5 <sup>b</sup>
	20 mT	0,332 ± 0,002 <sup>c</sup>	4,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	427,2 ± 12,6 <sup>a</sup>

Para todos os ensaios realizados, nos valores de absorbância média, porcentagem de inibição e μmol de Trolox/g de amostra, letras iguais indicam que não há diferença significativa e letras distintas indicam diferença significativa a 95% de confiança.

As atividades antioxidante do CC e da condição de 20 mT foram estatisticamente iguais ( $p \leq 0,05$ ) em todos os métodos avaliados para a cepa de *C. reinhardtii* 2137 (Tabela 4). O CM de 11 mT apresentou menor atividade antioxidante em relação as demais condições, nos métodos de poder redutor e DPPH. Supõe-se que os parâmetros (tempo de exposição e intensidade) utilizados para esta cepa não proporcionaram estresse oxidativo nas células, e consequentemente, não houve ativação do sistema de defesa e a produção de compostos antioxidantes.

Os CM podem exercer estresse oxidativo em sistemas biológicos, dependendo de parâmetros como intensidade e tempo de exposição do CM, além do tipo de micro-organismo empregado (WANG et al., 2008). Segundo Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan (2008), o estresse oxidativo em sistemas biológicos leva a ativação do sistema de defesa das células, o qual pode ser enzimático ou não enzimático, neste último caso, há a produção de compostos de baixo peso molecular, tais como, glutatona, carotenoides, vitaminas e compostos fenólicos. Compostos estes capazes de eliminar os radicais livres que poderiam ser provocados pelos CM.

Nos ensaios com *C. reinhardtii* Wt-S1 a condição de 11 mT apresentou maior atividade antioxidante ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao controle e a intensidade de 20 mT. Esta estimulou em 19,5 % e 54,6 % o teor de clorofilas *a* e clorofilas *b*, respectivamente, além de

aumentar em 8,5 % o teor de carotenoides totais em relação ao CC. O que poderia explicar o aumento na atividade antioxidante nesta condição.

#### 4 CONCLUSÃO

A ação de CM mostrou-se como alternativa viável para estimular a síntese dos diferentes biocompostos avaliados nas cepas de *Chlamydomonas reinhardtii*. O CM de 20 mT estimulou o teor de proteínas em 12,8 % e de lipídios em 20,5 % na biomassa da cepa selvagem. Enquanto que o CM de 11 mT estimulou o teor de carboidratos (15,1 %) e lipídios (19,7 %) na cepa sem parede celular. A aplicação de 20 mT estimulou o teor de lipídios nesta mesma cepa em 31,6 %. Os diferentes CM utilizados neste estudo demonstraram ser boas alternativas quando almeja-se a estimulação de lipídios.

A aplicação de 11 e 20 mT estimularam o teor de pigmentos, aumentando a produção de clorofila *a* (19,5 %), *b* (118,0 %) e carotenoides totais (106,8 %) na cepa de *C. reinhardtii* Wt-S1, a qual apresentou maior atividade antioxidante em sua biomassa, quando aplicado CM de 11 mT, agregando valor comercial a sua biomassa.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; ISTIVAN, T.; COSIC, I.; PIROGOVA, E. Evaluation of the effects of Extremely Low Frequency (ELF) Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) on survival of the bacterium *Staphylococcus aureus*. **EPJ Nonlinear Biomedical Physics**, v. 1, n. 1, p. 1–17, 2013.

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. growth and heavy metals accumulation potential of microalgae grown in sewage wastewater and petrochemical effluents. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 14, n. 16, p. 805–811, ago. 2011.

CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y. E.; OZKAN, A. D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947–1957, 2012.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina Platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

HALLMANN, A. Evolution of reproductive development in the volvocine algae. **Sexual Plant Reproduction**, v. 24, n. 2, p. 97–112, 2011.

HUNT, R. W.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 10, p. 4515–4558, 2009.

KARPAGAM, R.; PREETI, R.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 121, p. 253–7, dez. 2015.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; DAUVILLEE, D.; SOMMERFELD, M.; BALL, S.; HU, Q. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 4, p. 387–91, jul. 2010.

LI, Z. Y.; GUO, S. Y.; LI, L.; CAI, M. Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700–705, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

LUNA, L. G.; ÁLVAREZ, I.; RIVERO, R. Cultivo de *chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. **Revista Colombiana de biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 27–38, 2011.

MACFIE, S. M.; TARMOHAMED, Y.; WELBOURN, P. M. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: The influences of the cell wall and pH. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 454–458, 1994.

MACFIE, S. M.; WELBOURN, P. M. The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 413–419, 2000.

MARET, G.; DRANSFELD, K. Macromolecules and membranes in high magnetic fields. **Physica B+C**, v. 86-88, p. 1077–1083, jan. 1977.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

PAZUR, A; SCHEER, H. The growth of freshwater green algae in weak alternating magnetic fields of 7.8 Hz frequency. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 47, p. 690 – 694, 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides e alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98 p.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.

SALEEM, M.; CHAKRABARTI, M. H.; ABDUL RAMAN, A. A.; HASAN, D. B.; ASHRI WAN DAUD, W. M.; MUSTAFA, A. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 6, p. 4930–4934, mar. 2012.

SANTOS, L. O.; GONZALES, T. A.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 921–926, dez. 2012.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2011.

SMALL, D. P.; HÜNER, N. P. a; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. **Bioelectromagnetics**, v. 33, n. 4, p. 298–308, 2012.

YAMAOKA, Y.; TAKIMURA, O.; FUSE, H.; KAMIMURA, K. Effect of magnetism on growth of *Dunaliella salina*. **Research Photosynthesis**, v. 3, p. 87-90, 1992.

WANG, H.-Y.; ZENG, X.-B.; GUO, S.-Y.; LI, Z.-T. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. **Bioelectromagnetics**, v. 29, n. 1, p. 39–46, 2008.

## **CAPÍTULO IV**

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A aplicação de CM em cultivos de *C. kessleri* LEB 113 foi eficiente na estimulação da produção de biomassa, na síntese de macromoléculas e pigmentos, além da produção de antioxidantes pela célula. Das condições estudadas para esta microalga, a que mais se destacou foi quando aplicou-se CM de 60 mT por 1 h d<sup>-1</sup>, apresentando maiores valores de X<sub>máx</sub> (83,2 %), P<sub>máx</sub> (59,0 %) e  $\mu_{máx}$  (76,7 %), em relação ao CC. Esta condição também estimulou a síntese de lipídios (13,7 %), clorofila *a* (38,9 %), carotenoides totais (25,5 %) e a produção de antioxidantes. Tornando viável economicamente a produção destes compostos de alto valor agregado provenientes das microalgas.

A microalga *C. reinhardtii* Wt-S1, mostrou-se mais sensível a ação dos CM devido à ausência da parede celular, levando a inibição do crescimento em relação ao CC e cepa selvagem. No entanto, a aplicação de CM de 11 mT estimulou a produção de carboidratos (15,1 %) e lipídios (19,7 %), a concentração de clorofilas *a* (19,5 %), clorofilas *b* (54,6 %) e carotenoides totais (106,8 %), além de proporcionar maior atividade antioxidante, agregando assim valor comercial a sua biomassa. A Cepa de *C. reinhardtii* 2137 foi estimulada quanto ao teor de proteínas (12,8 %) e lipídios (20,5 %) quando aplicado o CM de 20 mT e a condição de 11 mT estimulou em 44,0 % o teor de clorofila *b* em relação ao CC.

Os resultados obtidos neste estudo comprovam a eficiência dos CM na estimulação do crescimento celular, contribuindo com a redução de custos na produção de biomassa microalgal, bem como na estimulação da síntese de biocompostos de interesse biotecnológico.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Avaliar outras intensidade e tempos de exposição nos cultivos de *C. kessleri* LEB 113 e *C. reinhardtii* 2137 e Wt-S1.

Aplicar os CM em diferentes locais dos fotobiorreatores.

Avaliar o perfil de ácidos graxos e carotenoides para as diferentes condições avaliadas neste estudo.

Avaliar modificações na morfologia celular devido à aplicação de campos magnéticos.

**CAPÍTULO V**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTHI; LEELAPRIYA, T.; KALAICHELVAN, P. T.; DHILIP, K.S.; SANKER, P. V. Application of Weak Sinusoidal Magnetic Field on Flavobacterium Species in the Treatment of Paper Mill Effluent. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 215-227, 2004.
- ADARME-VEGA, T. C.; LIM, D. K. Y.; TIMMINS, M.; VERNEN, F.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 96–105, 2012.
- AHMAD, F.; KHAN, A. U.; YASAR, A. Transesterification of oil extracted from different species of algae for biodiesel production. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 7, n. 6, p. 358–364, 2013.
- AJAYAN, K. V; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. growth and heavy metals accumulation potential of microalgae grown in sewage wastewater and petrochemical effluents. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 14, n. 16, p. 805–811, ago. 2011.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L. A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 163–173, 12 jan. 2011.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMBROZOVA, J.; MISURCOVA, L.; VICHA, R.; MACHU, L.; SAMEK, D.; BARON, M.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; JURIKOVA, T. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2344-2360, 2014.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture (Amsterdam)**, v. 264, p. 130-134, 2007.
- BARNES, F. S.; GREENEBAUM, B. The effects of weak magnetic fields on radical pairs. **Bioelectromagnetics**, v. 36, n. 1, p. 45–54, 2015.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.
- BEZERRA, L. R.; SILVA, A. M. A.; AZEVEDO, S. A.; MENDES, R. S.; MANGUEIRA, J. M.; GOMES, A. K. A. Desempenho de cordeiros Santa Inês submetidos a aleitamento artificial enriquecido com *Spirulina platensis*. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 258-263, 2010.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; GARLAND, C. D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review, **CSIRO Marine Laboratories Report**, n. 205, p. 44, 1989.

CAKMAK, T.; ANGUN, P.; DEMIRAY, Y. E.; OZKAN, A. D.; ELIBOL, Z.; TEKINAY, T. Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiesel feedstock production of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1947–1957, 2012.

CAMPOS, F. M.; MARTINO, H. S. D.; SABARENSE, C. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 481–490, 2008.

CHEN, M.; ZHANG, L.; SHIZHONG, L.; CHANG, S.; WENRUI, W.; ZHANG, Z.; WANG, J.; ZHAO, G.; QI, K.; XU, W. Characterization of cell growth and photobiological H<sub>2</sub> production of *Chlamydomonas reinhardtii* in ASSF industry wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 25, p. 13462-13467, 2014.

CHENG, J.; HUANG, Y.; LU, H.; HUANG, R.; ZHOU, J.; CEN, K. The oxidation product (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) of NO pollutant in flue gas used as a nitrogen source to improve microalgal biomass production and CO<sub>2</sub> fixation. **RSC Advances**, v. 4, n. 79, p. 42147-42154, 2014.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R. DAS, K. C. Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6751–6760, 2010.

COLLIS, C. S.; SEGAL, M. B. Effects of pulsed electromagnetic fields on Na<sup>+</sup> fluxes across stripped rabbit colon epithelium. **Journal of Applied Physiology**, v. 65, n. 1, p. 124–30, jul. 1988.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

DEAMICI, K. M. Microalgas cultivadas sob ação de campos magnéticos: efeito no crescimento e composição. 2015. 91 f. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGGERS, P. M. E.; BRENTNER, L. B.; ROY, A.; BARBOSA, M. J. Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169–77, abr. 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FETTERMAN, W. J.; ZDANOWICZ, M. M. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 66, n. 13, p. 1169-1179, 2009.

FIGUEIRA, F. S.; CRIZEL, T. M.; SILVA, C. S.; SALAS-MELLADO, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 308-316, 2011.

GOFF, K. L.; HEADLEY, J. V.; LAWRENCE, J. R.; WILSON, K. E. Assessment of the effects of oil sands naphthenic acids on the growth and morphology of *Chlamydomonas reinhardtii* using microscopic and spectromicroscopic techniques. **Science of The Total Environment**, v. 442, p. 116-122, 2013.

GOUVEIA, L. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 2, p. 157-159, ago. 1996.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, abr. 2010.

HARRIS, E. H. *Chlamydomonas* as a model organism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, v. 52, p. 363-406, 2001.

HENRARD; A. S. A. Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HENRARD, A. A.; MARTINS, G.; ROSA, D.; MORAES, L.; GREQUE DE MORAIS, M.; VIEIRA COSTA, J. A. The cultivation of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture media and stirring setting. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 21, p. 1431-1439, 2015.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. DEL P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 26-38, set. 2015.

HIDALGO, P.; CIUDAD, G.; NAVIA, R. Evaluation of different solvent mixtures in esterifiable lipids extraction from microalgae *Botryococcus braunii* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 360-364, nov. 2015.

HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313-316, 1998.

- HO, S. H.; HUANG, S. W.; CHEN, C. Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J. S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.
- HÖNES, I.; POSPISCHIL, A.; BERG, H. Electrostimulation of proliferation of the denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri*. **Bioelectrochemistry Bioenergetics**, v. 44, n. 2, p. 275–277, 1988.
- HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.
- HUNT, R. W.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 10, p. 4515–4558, 2009.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 631-635, 2000.
- INBARAJ, B. S.; CHIEN, J. T.; CHEN, B. H. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of chromatography. A**, v. 1102, n. 1-2, p. 193–9, 13 jan. 2006.
- JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R.H. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 193-210, 2003.
- JAYAPPRIYANA, K. R.; RAJKUMARB, R.; VENKATAKRISHNANC, V.; NAGARAJD, S.; RENGASAMYD, R. In vitro anticancer activity of natural  $\beta$ -carotene from *Dunaliella salina* EU5891199 in PC-3 cells. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 99–105, 2013.
- JOHANSEN, M. N. **Microalgae: biotechnology, microbiology and energy**. New York: Nova Science Publishers, 2012. 475p.
- JUÁREZ, A. B. Estudios biológicos y enzimáticos en *Chlorella kessleri* (trebouxiophyceae, chlorophyta). 2003. 204 f. Tese (Doutora em Ciências biológicas) – Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2003.
- JUSTO, O. R.; PÉREZ, V. H.; ALVAREZ, D. C.; ALEGRE, R. M. Growth of *Escherichia coli* under extremely low-frequency electromagnetic fields. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 134, n. 2, p. 155-163, 2006.
- KARPAGAM, R.; PREETI, R.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P. Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 121, p. 253–7, dez. 2015.
- KAULMANN, A.; JONVILLE, M.-C.; SCHNEIDER, Y.-J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties

and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food chemistry**, v. 155, p. 240–50, 15 jul. 2014.

KIGHTLINGER, W.; CHEN, K.; POURMIR, A.; CRUNKLETON, D. W.; PRICE, G. L.; JOHANNE, T. W. Production and characterization of algae extract from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 14-18, 2014.

KIM, B-H.; KANG, Z.; RAMANAN, R.; CHOI, J-E.; CHO, D-H.; OH, H-M.; KIM, H-S. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1123-1132, 2014.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52–63, out. 2014.

KŘIKLAVOVÁ, L.; TRUHLÁŘ, M.; ŠKODOVÁ, P.; LEDERER, T.; JIRKU, V. Effects of a static magnetic field on phenol degradation effectiveness and *Rhodococcus erythropolis* growth and respiration in a fed-batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 510-513, 2014.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726–732, 2005.

ŁEBKOWSKA, M.; RUTKOWSKA, A. N.; PAJOR, E.; POCHANKE, Z. Effect of a static magnetic field on formaldehyde biodegradation in wastewater by activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8777–8782, 2011.

LI, J.; LIU, Y.; CHENG, J. J.; MOS, M.; DAROCH, M. Biological potential of microalgae in China for biorefinery-based production of biofuels and high value compounds. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 588–596, 14 fev. 2015.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; DAUVILLEE, D.; SOMMERFELD, M.; BALL, S.; HU, Q. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. **Metabolic engineering**, v. 12, n. 4, p. 387–91, jul. 2010.

LI, Y.; HOSMAN, M.; WU, N.; LAN, C.Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LI, Z.; GUO, S.; LI, L.; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700-705, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LISBOA, C. R.; PEREIRA, A. M.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Utilisation of *Spirulina* sp. and *Chlorella pyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 5, p. 29–38, 2014.

- LIU, C.-H.; CHANG, C.-Y.; LIAO, Q.; ZHU, X.; LIAO, C.-F.; CHANG, J.-S. Biohydrogen production by a novel integration of dark fermentation and mixotrophic microalgae cultivation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 35, p. 15807–15814, nov. 2013.
- LIU, W.; PEARCE, C. M.; MCKINLEY, R. S.; FORSTER, I. P. Nutritional value of selected species of microalgae for larvae and early post-set juveniles of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa*. **Aquaculture**, v. 452, p. 326–341, fev. 2016.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 588p.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- LUNA, L. G.; ALVAREZ, I.; RIVERO, R. Cultivo de *Chlorella vulgaris* sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 2, p. 27-38, 2011.
- MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of biotechnology**, 22 jun. 2015.
- MAHAJAN, T.; PANDEY, O. Magnetic-time model at off-season germination. **International Agrophysics**, v. 28, n. 1, p. 57-62, 2014.
- MAKI, K. C.; YURKO-MAURO, K.; DICKLIN, M. R.; SCHILD, A. L.; GEOHAS, J. G. A new, microalgal DHA- and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 91, n. 4, p. 141–8, out. 2014.
- MARET, G.; DRANSFELD, K. Macromolecules and membranes in high magnetic fields. **Physica B+C**, v. 86-88, p. 1077–1083, jan. 1977.
- MARQUES, A. E.; MIRANDA, J. R.; BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L. Microalgae biotechnological applications: Nutrition, health and environment. In: JOHNSEN, M. N. (Ed.). **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**. New York: Nova Science Publishers, 2012. Cap 1.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.
- MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2004.

- MARTIN, C.; ALMEIDA, V.; RUIZ, M.; et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, jan. 2010.
- MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 67-70, 1997.
- MENESTRINO, B. C.; PINTOS, T. E. C. Produção de biomassa a partir da microalga *Chlorella minutissima* cultivada com aplicação de campos magnéticos visando a produção de bioetanol. 2015. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- MERCHANT, S.S.; PROCHNIK, S.E.; VALLON, O.; HARRIS, E.H.; KARPOWICZ, S.J.; WITMAN, G.B.; TERRY, A. et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, **Science**, v. 318, n. 5848, p. 245-251, 2007.
- MORAES, L. Aumento da eficiência de biofixação de CO<sub>2</sub> por microalgas. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- MORAIS, M. G.; MIRANDA, J. A.; COSTA, A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 3, p. 323-328, 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation with *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, 2008.
- MOREIRA, L.; BEHLING, B.; RODRIGUES, R.; COSTA, J.; SOARES, L. *Spirulina* as a protein source in the nutritional recovery of Wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 3, 2013
- MULDERS, K. J. M.; JANSSEN, J. H.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. **Algal Research**, v. 6, p. 8–16, out. 2014.
- MUSSGNUM, H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTE, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 51-56, 2010.

MOTTA, M. A.; MUNIZ, J. B. F.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 393-396, 2004.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307–315, 1986.

PARSONS, T. R.; STRICKLAND, J. D. H. Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. **Journal of Marine Research**, v. 21, n. 3, p. 155–163, 1963.

PAZUR, A; SCHEER, H. The growth of freshwater green algae in weak alternating magnetic fields of 7.8 Hz frequency. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 47, p. 690 – 694, 1992.

PIEMONTE, V.; DI PAOLA, L.; IAQUANIELLO, G.; PRISCIANDARO, M. Biodiesel production from microalgae: ionic liquid process simulation. **Journal of Cleaner Production**, v. 111, p. 62–68, jul. 2015.

PRAKASH, J. W.; ANTONISAMY, J. M.; JEEVA, S. Antimicrobial activity of certain fresh water microalgae from Thamirabarani River, Tamil Nadu, South India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 170-173, 2011.

PRIETO, A.; CAÑAVATEA, J. P.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 2, p. 180-185, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SOX and NOX resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 10, p. 3132-3136, 2011.

RASOUL-AMINI, S.; MONTAZERI-NAJAFABADY, N.; SHAKER, S.; SAFARI, A.; KAZEMI, K.; MOUSAVI, P.; MOBASHER, M. A.; GHASEM, Y. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p.126-131, 2014.

RAY, S. Causes and Mechanism(s) of Ner Bioeffects. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 16, n. 1, p. 59-67, 1997.

REDDY, S. M.; RAO, M. M.; REDDY, A. S.; REDDY, M. M.; CHARY, S. J. **University botany 3**. New Delhi: New Age International (P) Ltd., 2004. 388p.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semi continuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23–28, 2006.

RIAL, D.; Murado, M. A.; Menduiña, A.; Fuciños, P.; González, P.; Mirón, J.; Vázquez, J. A. Effects of spill-treating agents on growth kinetics of marine microalgae. **Journal of hazardous materials**, v. 263, n. 2, p. 374–81, 15 dez. 2013.

RIOS, ALESSANDRO DE OLIVEIRA; LUSÂNIA MARIA GREGGI ANTUNES; BIANCHI, M. L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 343–350, 2009.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. **Fontes Brasileiras de Carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides e alimentos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. 98 p.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235–254, 2005.

RUIZ-GÓMEZ, M. J.; PRIETO-BARCIA, M. I.; RISTORI-BOGAJO, E.; MARTÍNEZ-MORILLO, M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 64, n. 2, p. 151-155, 2004.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. **EMBRAPA: Comunicado técnico 128** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA: Comunicado técnico 127** – on line. Fortaleza, Brasil, 2007b.

SALCEDO, C. L.; FRÍAS, M. A.; CUTRO, A. C.; NAZARENO, M. A.; DISALVO, E. A. Antiradical activity of gallic acid included in lipid interphases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 10, p. 2656–61, out. 2014.

SANTOS, L. S.; GONZALES, T. J.; ÚBEDA, B. T.; ALEGRE, R. M. Glutathione production using magnetic fields generated by magnets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 921-926, 2012.

SCOR-UNESCO. **Determination of photosynthetic pigments in sea water**: report of SCOR/UNESCO. Paris, 1966. 69p. (Monography on Oceanography Methodology).

SEDOUD, A.; LOPEZ-IGUAL, R.; REHMAN, A. U.; WILSON, A.; PERREAU, F.; BOULAY, C.; VASS, I.; KRIEGER-LISZKAY, A.; KIRILOVSKY, D. The cyanobacterial

photoactive orange carotenoid protein is an excellent singlet oxygen quencher. **Plant Cell**, v. 26, n. 4, p. 1781–1791, 2014.

SHANAB, S. M. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608-615, 2012.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2011.

SINGH, P.; KUMARI, S.; GULDHE, A.; MISRA, R.; RAWAT, I.; BUX, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 1–16, mar. 2016.

SMALL, D. P.; HÜNER, N. P. A.; WAN, W. Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of *Chlorella kessleri* microalgae. **Bioelectromagnetics**, v. 33, n. 4, p. 298-308, 2012.

SOGI, D. S.; SIDDIQ, M.; DOLAN, K. D. Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of Tommy Atkin mango cubes as affected by drying techniques. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 564–568, abr. 2015.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

STEPHEN, D. W. S.; JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2/3, p. 207-212, 1996.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. **Journal of food science**, v. 72, n. 9, p. R159–65, 2007.

TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; JOUZANI, G. S.; SAFARNEJAD, M.; PAZOUKI, M. Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 4, p. 1918-1927, 2011.

Taelman, S. E.; DE MEESTER, S.; ROEF, L.; MICHIELS, M.; DEWULF, J. The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. **Bioresource technology**, v. 150, p. 513–22, dez. 2013.

TIMMEL, C. R.; CINTOLESI, F.; BROCKLEHURST, B.; HORE, P. J. Model calculations of magnetic field effects on the recombination reactions of radicals with anisotropic hyperfine interactions. **Chemical Physics Letters**, v. 334, n. 4-6, p. 387–395, fev. 2001.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. ROBERTO, M.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616–622, 2007.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008a.

WANG, H. Y.; ZENG, X. B.; GUO, S. Y.; LI, Z. T. Effects of magnetic field on the antioxidant defense system of recirculation-cultured *Chlorella vulgaris*. **Bioelectromagnetics**, v. 29, n. 1, p. 39-46, 2008b.

WANG, J.; DONG, X.; WEI, F.; ZHONG, J.; LIU, B.; YAO, M.; YANG, M.; ZHENG, C.; QUEK, S.; CHEN, H. Preparation and Characterization of Novel Lipid Carriers Containing Microalgae Oil for Food Applications. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, p. 169-177, 2014.

WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Differential fatty acid profiles of *Chlorella kessleri* grown with organic materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 651-657, 2013.

WANG, Y.; CHEN, T.; QIN, S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 402-409, 2012.

YALCIN, Z.; HICSASMAZ, B.; BOZOGLU, F. Characterization of the extracellular polysaccharide from freshwater microalgae *Chlorella* sp. **Food Science and Technology**, v.27, n. 2, p. 158-165, 1994.

YAMAOKA, Y.; TAKIMURA, O.; FUSE, H.; KAMIMURA, K. Effect of magnetism on growth of *Dunaliella salina*. **Research Photosynthesis**, v. 3, p. 87-90, 1992.

YEN, G.-C.; CHEN, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27–32, 1995.

ZAPATA, J. E.; HOYOS, M.; MORENO, G. Acción de un campo magnético sobre un cultivo aireado de *Saccharomyces cerevisiae*. **Interciencia**, v. 30, n. 7, p. 409- 413, 2005.

ZHANG, J.; ZENG, D.; XU, C.; GAO, M. Effect of low-frequency magnetic field on formation of pigments of *Monascus purpureus*. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 3, p. 577 – 582, 2015

ZHANG, S.; WEI, W.; ZHANG, J.; MAO, Y.; LIU, S. Effect of static magnetic field on growth of *Escherichia coli* and relative response model of series piezoelectric quartz crystal. **Analyst**, v. 127, p. 373-377, 2002.

ZHANG, X.; LIU, X.; PAN, L.; LEE, I. Magnetic fields at extremely low-frequency (50 Hz, 0.8 mT) can induce the uptake of intracellular calcium levels in osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 3, p. 662-666, 2010.