



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

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE LUZ E APLICAÇÃO DE CAMPOS
MAGNÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Chlorella fusca***

Taiele Blumberg Machado

Prof.^a Dr.^a Lucielen Oliveira dos Santos (orientadora)
Prof.^o Dr. Jorge Alberto Vieira Costa (coorientador)

Rio Grande, RS

2021

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

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE LUZ E APLICAÇÃO DE CAMPOS
MAGNÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Chlorella fusca***

Taiele Blumberg Machado

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

Prof.^a Dr.^a. Lucielen Oliveira dos Santos
Orientadora

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Coorientador

Rio Grande, RS

2021

Ficha Catalográfica

M149u Machado, Taiete Blumberg.

Utilização de diferentes fontes de luz e aplicação de campos magnéticos para produção de pigmentos por *Chlorella fusca* / Taiete Blumberg Machado. – 2021.

79 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos. Coorientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

APROVAÇÃO

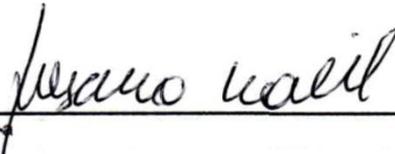
Dissertação defendida por Taiele Blumberg Machado, com orientação da *Prof. De. Lucielen Oliveira dos Santos*, aprovada em 29 de setembro de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Profº. Drº. Lucielen Oliveira dos Santos
- FURG



Profº. Drº. Ana Priscila Centeno da
Rosa - FURG



Profº. Dr. Susana Juliano Kalil - FURG



Prof. Dr. Marcus Bruno Soares Forte - UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Aos meus **pais**, meus principais incentivadores aos estudos. Obrigada por me apoiarem e por me dar a oportunidade de chegar tão longe. Em especial a minha **mãe**, por todo apoio durante minha caminhada e por cuidar, sempre, de mim e da minha irmã. A minha **irmã**, que com um sorriso sempre fez eu ganhar meu dia e tudo melhorar.

À toda **minha família**, por todo suporte que me deram, desde que fui morar a uns quantos km de distância. Obrigada por entenderem sempre que não pude estar presente nas comemorações e torcerem por mim. Isso se estende aos meus amigos, os quais eu tenho muito orgulho. Em especial à **Cris** e **Adriane** que, muitas vezes, ouviram meus desabaços sobre o mestrado e me apoiaram.

Ao **Gustavo**, por toda parceria, por ser um suporte e estar comigo nos momentos bons e ruins. Com teu incentivo, foi tudo mais fácil, muito obrigada por tudo. Que sorte a minha de poder dividir a vida contigo. Obrigada a tua família também, sempre acolhedora.

À minha orientadora, **Lucielen**, obrigada pela oportunidade de aprender contigo, um exemplo de profissional. Muito obrigada, mesmo, por ser uma orientadora tão presente e dedicada. A nossa parceria foi de muito aprendizado e uma experiência única para mim. Ao pessoal do BIOTEC: Muito obrigada! Vocês são pessoas maravilhosas que sempre estavam dispostos a ajudar. À **Sharlene**, por me ajudar muito no início dos experimentos, pelas conversas de apoio e parceria. Ao **Pedro**, que muitas vezes foi final de semana somente me acompanhar no laboratório e sempre esteve disponível para qualquer dúvida que eu tivesse. Ao **Bruno**, que na pandemia, foi um braço direito e esquerdo e uma ótima companhia. À **Luísa**, uma pessoa muito querida, disposta a ajudar e com muito conhecimento para passar, obrigada pela ajuda e pelas caronas. A **Bia**, **Daniel** e **Tairine**: Obrigada por toda dedicação em me ajudar a desenvolver a pesquisa e por serem companhias tão agradáveis e especiais. Vocês têm um futuro de sucesso pela frente.

Ao coorientador **Jorge**, muito obrigada, por todo suporte prestado, principalmente durante a pandemia. Para todo o pessoal do **LEB**, alunos e técnico, que sempre se dispuseram a me ajudar. Muito obrigada a todos! Em especial para o Gabriel, que foi fundamental no início dos

meus experimentos, obrigada pela ajuda e paciência. Obrigada à Priscila, por me ajudar em uma etapa fundamental do trabalho, passando o conhecimento com toda paciência e atenção.

À **Mariana** e ao **Junior**, meus amigos queridos, melhores pessoas que conheci em Rio Grande, eu não tenho nem palavras o suficiente para descrever o quanto vocês são importantes para mim. Além do apoio durante o mestrado, foram fundamentais antes mesmo dele, vocês (e suas famílias maravilhosas) me acolheram e foram meu suporte muitas vezes. Muito, muito obrigada por tudo. Muito obrigada, também, para a **Gabi**, que não importava se era final de semana, feriado, sempre esteve disponível para me ajudar, tanto do lado profissional, quanto pessoal. É uma profissional e uma pessoa a qual eu levo como exemplo. Ao **Renan**, meu amigo querido, pelas conversas, apoio e por sempre tornar tudo muito divertido e mais leve. Muito obrigada mesmo!

À **CAPES**, pela bolsa de estudos.

À **FURG** por disponibilizar um ensino de qualidade e gratuito. Eu tenho muito orgulho de ter feito parte da história desta universidade.

RESUMO

Microalgas vêm sendo reconhecidas como promissoras fontes de pigmentos, se tornando uma via alternativa sustentável de produção. Visando o aumento da produção de biomoléculas, alterações nas condições de cultivo vêm sendo estudadas, tais como a aplicação de campos magnéticos (CM) e uso de diferentes fontes de luz. Diodos emissores de luz (LEDs) são relatados como energeticamente eficientes, em comparação com outras fontes de luz artificiais, e o comprimento de onda da luz emitida pode ser controlado. Nesse contexto, o objetivo da pesquisa foi promover o aumento no teor de pigmentos cultivando a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando diferentes fontes de luz e aplicação de CM. Os cultivos foram feitos em duplicata, utilizando meio BG 11, em reator tubular vertical a 30 °C, 0,5 vvm, durante 15 d. A intensidade média do CM gerada por dois ímãs de ferrite foi de 30 mT e foram testadas aplicações de 1 e 24 h d⁻¹. A utilização de luz fluorescente e LEDs azuis foi avaliada. Os cultivos controles (fluorescente e LEDs azuis) não tiveram a aplicação de CM. Ao longo do cultivo, amostras foram coletadas a cada 24 h e foram determinados o pH e concentração de biomassa e calculados os parâmetros cinéticos. As concentrações de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides foram determinadas a cada 3 d e a composição da biomassa foi determinada ao final do cultivo. A eficiência energética foi calculada, a fim de comparar as fontes de luz. Os cultivos com luz fluorescente apresentaram maior crescimento celular, em comparação aos ensaios com LEDs azuis. A concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$) foi 2,54 g L⁻¹, no cultivo com CM 1 h d⁻¹, porém sem diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os demais ensaios com a mesma fonte de luz e produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$) de 0,24 g L d⁻¹, no cultivo controle. Os cultivos com LEDs azuis apresentaram $X_{m\acute{a}x}$ de 1,7 g L⁻¹ ($P_{m\acute{a}x}$ de 0,20 g L d⁻¹), no cultivo controle que teve diferença significativa ($p \geq 0,05$) dos ensaios com CM. O efeito do CM na caracterização da biomassa foi nulo ou negativo, com exceção do teor de proteína no ensaio com luz fluorescente. O resultado mais promissor de carboidratos (32,7 %) e lipídios (29,3 %) ocorreu no cultivo controle com luz fluorescente e de proteínas (54,8 %) no cultivo controle com LEDs azuis. A aplicação de CM e uso de LEDs azuis promoveram a obtenção de maiores concentrações de pigmentos. A maior concentração de clorofila-a obtida foi 16,13 mg g⁻¹ (1 h d⁻¹), de clorofila-b foi 20,27 mg g⁻¹ (24 h d⁻¹) e carotenoides de 3,84 mg g⁻¹ (1 h d⁻¹). Os cultivos com LEDs azuis além de apresentarem maior teor de pigmentos, do que os ensaios com luz fluorescente, apresentaram maior eficiência energética, tanto em relação a biomassa quanto pigmentos, indicando ser uma alternativa mais econômica.

Palavras chaves: Microalga. Biomoléculas. Clorofila. Carotenoides. Ímãs de ferrite. Eficiência energética.

ABSTRACT

USE OF DIFFERENT SOURCES OF LIGHT AND MAGNETIC FIELDS APPLICATION FOR PRODUCTION OF PIGMENTS BY *Chlorella fusca*

Microalgae have been recognized as promising sources of pigments, becoming an alternative sustainable production route. Aiming at increasing biomolecules production, changes in growing conditions have been studied, such as magnetic fields (MF) application and the use of different light sources. Light emitting diodes (LEDs) are reported to be energy efficient by comparison with other artificial light sources, and the wavelength of the emitted light can be controlled. In this context, this study aimed at increasing pigments content in the cultivation of the microalga *Chlorella fusca* LEB 111, applying different light sources and MF. Cultures were carried out in duplicate, with BG 11 medium, in a vertical tubular reactor at 30 °C, 0.5 vvm, for 15 d. The average intensity of the MF generated by two ferrite magnets was 30 mT and applications of 1 and 24 h d⁻¹ were evaluated. The use of fluorescent lighting and blue LEDs was studied. Control cultures (fluorescent and blue LEDs) had no MF application. During cultivation, samples were collected every 24 h and pH and biomass concentration were determined and kinetic parameters calculated. Concentrations of chlorophyll-a, chlorophyll-b and carotenoids were determined every 3 d and biomass composition was determined at the end of cultivation. Energy efficiency was calculated to compare light sources. Fluorescent light cultures showed high cell growth by comparison with blue LEDs cultures. The highest biomass concentration (X_{\max}) was 2.54 g L⁻¹ in the culture with MF for 1 h d⁻¹, but without statistical difference ($p \leq 0.05$) between the other assays with the same light source and maximum yield (P_{\max}) of 0.24 g L d⁻¹ in the control culture. Cultures with blue LEDs had X_{\max} of 1.7 g L⁻¹ (P_{\max} of 0.20 g L⁻¹ d⁻¹), in the control culture which had a significant difference ($p \geq 0.05$) from the cultures with MF. The effect of MF in the characterization of biomass was null or negative, except for protein content in the fluorescent light assay. The most promising result for carbohydrates (32.7 %) and lipids (29.3 %) was in the control culture with fluorescent light and proteins (54.8 %) was in the control culture with blue LEDs. MF application and the use of blue LEDs promoted the attainment of high pigment concentrations. The highest concentration of chlorophyll-a was 16.13 mg g⁻¹ (1 h d⁻¹), chlorophyll-b was 20.27 mg g⁻¹ (24 h d⁻¹) and carotenoids was 3.84 mg g⁻¹ (1 h d⁻¹). Cultures with blue LEDs, in addition to showing high pigment content than fluorescent light assays, showed high energy efficiency, both in relation to biomass and pigments. This indicating that it is a more economical alternative.

Keywords: Microalgae. Biomolecules. Chlorophyll. Carotenoids. Ferrite magnets. Energy efficiency.

Lista de Figuras

Figura 1 – Fluxograma apresentando as diferentes aplicações de biomassa microalgal.....	25
Figura 2 - Estrutura da clorofila-a, clorofila-b é uma variante com o grupo metil na posição 3 sendo substituído por um grupo formil.....	27
Figura 3 – Estrutura química de carotenoides.	30
Figura 4 – (a) Diodos emissores de luz (LEDs) azuis dispostos na estufa termostaticada e (b) ilustração dos fotobiorreatores, medidas em milímetros, utilizados para realização dos cultivos	40
Figura 5 – Concentração de biomassa no cultivo de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, utilizando (a) luz fluorescente (F) e (b) diodos emissores de luz (LEDs) azuis (L) nos cultivos controle (C) e com aplicação de campo magnético (CM) em 1 e 24 h d ⁻¹	45
Figura 6 - pH dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 utilizando (a) luz fluorescente (F) e (b) diodos emissores de luz (LEDs) azuis (L) nos cultivos controle (C) e com aplicação de campo magnético (CM) em 1 e 24 h d ⁻¹	49
Figura 7 – Concentrações e produtividade de clorofila-a ao longo dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d ⁻¹ e com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente.....	54
Figura 8 – Concentrações e produtividade de clorofila-b ao longo dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d ⁻¹ com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente.....	55
Figura 9 – Concentrações de carotenoides e produtividade ao longo dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d ⁻¹ e com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente.....	58
Figura 10 – Eficiência energética da (a) produção máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$) e dos maiores valores obtidos para (b) clorofila e (c) carotenoides, nos ensaios com luz fluorescente e diodos emissores de luz (LEDs) azuis nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111.	62

Lista de Quadros

Quadro 1 – Estudos sobre aplicação de campos magnéticos no cultivo de microalgas..... 37

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros para realização dos cultivos.	40
Tabela 2 – Parâmetros de crescimento para os cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com diodos emissores de luz (LEDs) azuis e luz fluorescente com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT em 1 e 24 h d ⁻¹ e cultivos controle.	47
Tabela 3 – Eficiência da aplicação do campo magnético (CM) de 30 mT nos parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, utilizando fonte de luz fluorescente e diodos emissores de luz (LEDs) azuis.	48
Tabela 4 – Caracterização da biomassa dos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111, com e sem aplicação de campo magnético (CM) com intensidade de 30 mT, durante 1 e 24 h d ⁻¹	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	MICROALGAS e <i>Chlorella</i>	25
3.2	PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR MICROALGAS	27
3.2.1	Clorofila-a e clorofila-b	27
3.2.2	Carotenoides	29
3.3	FONTES DE LUZ NO CULTIVO DE MICROALGAS	31
3.3.1	Diodos emissores de luz (LEDs) no cultivo de microalgas	32
3.4	CAMPOS MAGNÉTICOS	34
3.4.1	Campos magnéticos (CM) no cultivo de microalgas	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	39
4.2	CONDIÇÕES DE CULTIVO	39
4.3	APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS E DIFERENTES FONTES DE LUZ NOS CULTIVOS	39
4.4	RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DO MEIO LÍQUIDO	40
4.5	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	41
4.5.1	Determinação da concentração da biomassa e pH	41
4.5.2	Conteúdo de clorofilas e carotenoides totais	41
4.5.3	Caracterização da Biomassa	42
4.5.3.1	Determinação do teor de umidade	42
4.5.3.2	Determinação do teor de proteínas	42
4.5.3.3	Determinação de carboidratos	42
4.5.3.4	Determinação do teor de lipídios	43
4.6	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	43
4.7	EFICIÊNCIA ENERGÉTICA DO CONSUMO DE ENERGIA	44
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Concentração da biomassa, parâmetros cinéticos e pH	45
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	50
5.3	PIGMENTOS	53
5.3.1	Clorofila-a e clorofila-b	53
5.3.2	Carotenoides	57
5.4	EFICIÊNCIA ENERGÉTICA	61
6	RESÍDUOS GERADOS E DESTINO	63
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
	APÊNDICE	79

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos que utilizam, energia solar, dióxido de carbono (CO₂) e nutrientes para gerar biomassa. Esse grupo de micro-organismos possui ampla variedade de espécies e vivem em diferentes condições ambientais (LOURENÇO, 2006). A biomassa gerada pode conter compostos como carboidratos, lipídios, proteínas, aminoácidos essenciais e vitaminas (PEREIRA; LISBOA; COSTA, 2018).

Existe uma tendência acentuada na indústria de alimentos para o desenvolvimento e fabricação de produtos que oferecem benefícios a saúde, devido ao crescente interesse dos consumidores em produtos de origem natural em detrimento à sintética. O gênero de microalga *Chlorella* possui potencial para essa aplicação, pois contém em sua composição proteínas, polissacarídeos, vitaminas e minerais, podendo ser utilizada na indústria de alimentos funcionais (MASOJÍDEK; KOBLÍZEK; TORZILLO, 2010). Entre esses compostos que são ou podem ser potencialmente utilizados como ingredientes funcionais estão os pigmentos, como clorofila e carotenoides (PLAZA et al., 2010). As clorofilas são pigmentos importantes para as reações fotossintéticas. Podem apresentar propriedades promotoras de saúde como antioxidantes, antimutagênicas e anti-inflamatórias e por isso serem promotoras de saúde. Estes pigmentos são usados como corante em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (BEGUM et al., 2016).

Os carotenoides são substâncias essenciais para o corpo humano, mas os humanos não conseguem sintetizá-los, por isso a dieta é sua principal fonte. A estrutura desses compostos confere propriedades benéficas, como provitamina A, e estabelece a base para suas funções biológicas complexas (FARAONE et al., 2020). Como as microalgas contêm carotenoides, pesquisadores estão utilizando-as para extraí-los. Os carotenoides que este gênero produz, são β -caroteno, α -caroteno, luteína e zeaxantina (GENÇ et al., 2020). A estimulação eficaz da biossíntese de carotenoides pode promover maior acúmulo destes compostos. Estudos indicam que vários fatores ambientais e estimuladores de cultura podem aumentar o rendimento de carotenoides em microalgas (BOROWITZKA, 2013).

Sob condições de estresse, muitas microalgas alteram a rota biossintética para formação ou acúmulo de produtos de interesse. Os parâmetros como pH, temperatura, concentração de nutrientes e iluminação podem ser modificados, com a finalidade de promover maior rendimento do composto de interesse (LOURENÇO, 2006). Diante disso, se torna importante estudar formas de estimular a produção de biomoléculas, como a aplicação de

campos magnéticos (CM) que vem sendo estudada e tem se mostrado como uma alternativa para indução do crescimento e produção de compostos de interesse. O efeito do CM pode ser negativo, positivo ou nulo (HUNT et al., 2009) e essas modificações dependem da intensidade (DEAMICI et al., 2016), frequência e tempo de exposição (BAUER et al., 2017; YANG et al., 2011).

Pesquisas, também, tem relatado o uso de diodos emissores de luz (LEDs) em cultivos de microalgas, pois os mesmos são considerados uma fonte de energia ecologicamente correta e econômica, frente a utilização de luz fluorescente, além de poderem induzir a produção de biomassa (DUARTE; COSTA, 2018; MARKOU, 2014; PRATES et al., 2018). A principal característica desta fonte de luz é a sua faixa espectral estreita, que pode levar a maior eficiência de captação energética pelas microalgas e, assim, aumentar a produtividade de biomassa e de seus metabólitos. A luz é um dos fatores mais significativos do metabolismo nas células de microalgas, o nível de irradiância e composição espectral influenciam o crescimento, a produção de enzimas, a fotossíntese e as rotas metabólicas de síntese (SCHULZE et al., 2014).

Neste contexto, a hipótese desse trabalho foi de que o CM aplicado ao cultivo de microalga, utilizando LEDs azuis como fonte de luz, pode alterar o crescimento, composição da biomassa, concentração de clorofila e carotenoide total.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Promover o aumento no teor de pigmentos cultivando a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando diferentes fontes de luz e a aplicação de campos magnéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes tempos de aplicação dos campos magnéticos no crescimento e composição de biomassa;
- Verificar se a aplicação de campos magnéticos e a mudança de fonte de luz, durante os cultivos, afeta o conteúdo de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais;
- Comparar a eficiência energética entre LEDs azuis e luz fluorescente, em relação a produção de biomassa e pigmentos.

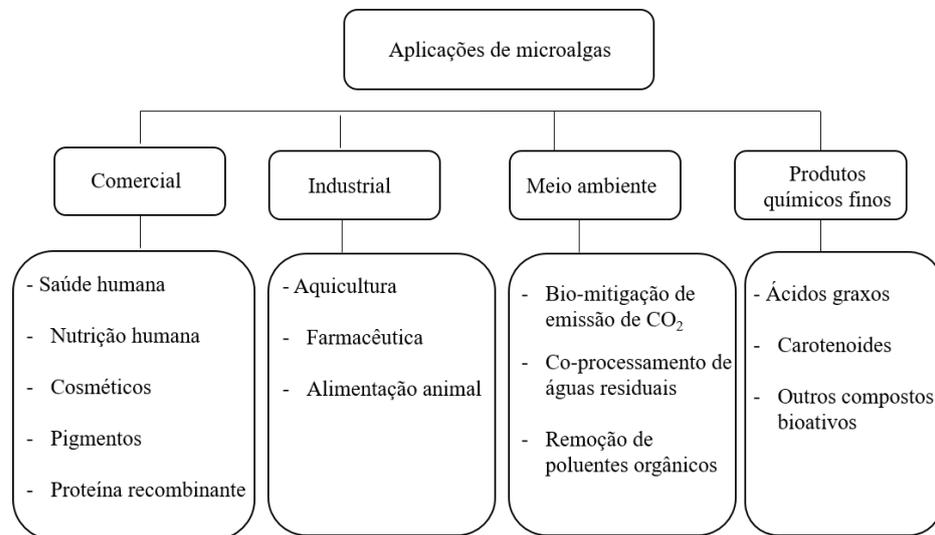
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGAS E *Chlorella*

As microalgas são organismos microscópicos fotossintéticos, sendo umas das principais produtoras de oxigênio nos ecossistemas aquáticos. Algumas espécies são encontradas em água doce e outras em água do mar. Possuem a característica de metabolizar o carbono inorgânico atmosférico em biomassa orgânica, utilizando luz solar. Podem ser eucarióticas, como clorófitas e diatomáceas ou procarióticas, como as cianobactérias. As diferentes espécies de microalgas, apresentam atividades metabólicas distintas, fazendo com que seja possível a adaptação em diferentes condições de cultivo (GOUVEIA et al., 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Os cultivos podem ocorrer de modo autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e foto-heterotrófico (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A produção da biomassa microalgal pode ser utilizada para obtenção de energia pela conversão de lipídios a biodiesel e carboidratos a bioetanol (LEE; OH; LEE, 2015) e outras aplicações que são apresentadas na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma apresentando as diferentes aplicações de biomassa microalgal



Fonte: Adaptado de RIZWAN et al. (2018)

Dentre os fatores que podem influenciar a proporção dos diferentes constituintes da biomassa, pois a composição química de microalgas varia em uma ampla faixa, estão parâmetros como temperatura, pH do meio, nutrientes, fonte de luz (CHIRANJEEVI; MOHAN,

2016), aplicação de campos magnéticos (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2021; SILVA et al., 2020) e uso de diodos emissores de luz (LEDs) (DUARTE; COSTA, 2018).

A microalga *Chlorella* foi descrita, pela primeira vez, por Beijerinck em 1890, utilizando a espécie *Chlorella vulgaris*. Após, um grande número de espécies foi isolado e caracterizado (RICHMOND; HU, 2013). É uma alga verde, eucariótica, unicelular microscópica e que habita água salgada e água doce. Possui diâmetro de 2-10 µm e suas células são esféricas, globulares ou elipsoidais, sem flagelo. O tipo de reprodução é assexuada pela liberação de autósporos e o gênero *Chlorella* é pertencente ao grupo das *Chlorophytas* e a classe *Chlorophyceae* (LOURENÇO, 2006; HUSS; SOGIN, 1990).

Por ser considerada uma fonte potencial de nutrientes, essa microalga é amplamente utilizada no mercado de alimentos saudáveis, sendo incorporada em massas alimentícias para aumentar sua qualidade nutricional (FRADIQUE et al., 2010) e na aquicultura (YUNOS et al., 2017). Illman, Scragg e Shales (2000) pesquisaram, em cultivos com baixo teor de nitrogênio, a composição química das espécies de *Chlorella*, *C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*, *C. sorokiniana* e *C. minutissima*, e obtiveram teores diferentes de proteínas (24-45 %), carboidratos (11-55 %) e lipídios (11-31 %), indicando que há grande variabilidade de composição entre espécies. Esta microalga também possui vitaminas, minerais, pigmentos, ácidos graxos como ácidos oleicos e linoleico (EL-BAKY; EL-BAROTY, 2013).

Por apresentar essas características e com intuito de aplicação, *Chlorella* é produzida comercialmente sob condições fotoautotróficas, principalmente em lagoas abertas ou heterotroficamente em reatores (GUCCIONE et al., 2014). Seyfabadi, Ramezanpour e Khoeyi (2011) comentaram que a composição bioquímica de *Chlorella* pode ser afetada pelas condições de cultivo, como fatores nutricionais e intensidade da luz. Deamici et al. (2016) apresentaram a composição de *Chlorella fusca* LEB 111, cultivada em reator tubular com meio BG 11, de 60,3 %, 25, 2 % e 12,9 % para proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente.

Estudos, com diferentes cepas de *Chlorella* e condições de cultivo relataram a produção de biomoléculas, como ácidos graxos (WANG; CHEN; QIN, 2014), clorofila-a e clorofila-b (BAUER et al., 2017) e carotenoides (ZHANG et al., 2017). Também tem sido descrita como potencial gênero na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (LEE; OH; LEE, 2015).

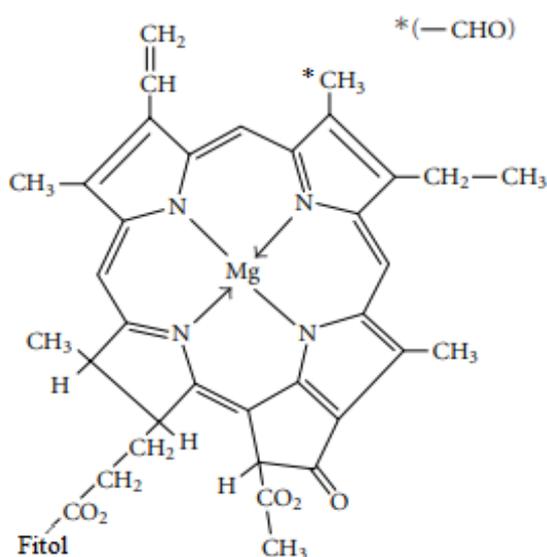
3.2 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR MICROALGAS

3.2.1 Clorofila-a e clorofila-b

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes, essenciais para o processo fotossintético, onde as microalgas obtêm sua energia para o metabolismo e reprodução e que dão às microalgas sua cor verde. Em algas e plantas, a clorofila está presente no cloroplasto e participa do processo de coleta de luz e da conversão da energia. Enquanto a clorofila-a está presente em todas as algas, a clorofila-b pode estar presente como pigmento acessório na antena, alargando a faixa de absorção de luz. A clorofila-b está presente em clorófitas (algas verdes) e euglenófitas.

As clorofilas a e b tem duas bandas de absorção principais, de 660-665 nm (luz vermelha) e 430 nm (luz azul). Ambas têm suas funções no processo fotossintético. Enquanto a clorofila-a está presente no núcleo da antena e dos centros de reação, e é importante para a coleta de luz e transferência de elétrons, a clorofila-b está associada a antena PSII e além da captação de luz, atua na estabilização dos complexos de antenas periféricas (CHEN; BLANKENSHIP, 2011; RODRIGUES et al., 2014). A Figura 2 apresenta a estrutura de clorofila-a.

Figura 2 - Estrutura da clorofila-a



Fonte: Adaptado de Halim et al. (2010)

* clorofila-b é uma variante com o grupo metil na posição 3 sendo substituído por um grupo formil

A partir da clorofila é possível obter pigmentos derivados, como a clorofilina cúprica que pode ser comercializada para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos e suplementos alimentares e pode conter propriedades antioxidantes e antimutagênicas (LARKUM, 2016). Apesar das estruturas moleculares de todas as clorofilas serem semelhantes, elas exibem diferenças em alguns grupos periféricos, que afetam seus espectros de absorção. A produção de clorofila por microalgas pode ser modificada pela alteração das condições de cultivo, que não é apenas específico da espécie, mas também dependente do modo de cultivo (KHANRA et al., 2018; RAI; GAUTOM; SHARMA, 2015).

O efeito da intensidade de luz foi avaliado no conteúdo de clorofila de *Chlorella* sp. por Cheirsilp e Torpee (2012). O conteúdo de clorofila aumentou com o aumento da intensidade da luz ($27-135 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os autores também estudaram condições de cultivo e observaram que o acúmulo de clorofila foi maior no cultivo autotrófico e menor no cultivo heterotrófico usando glicose como fonte de carbono, variando de $8,40$ a $24,15 \text{ mg g}^{-1}$. Kiran e Mohan (2021) cultivaram *Chlorella sorokiniana*, durante 10 d, com intensidade de luz fluorescente de $100-200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e não observaram alteração significativa na concentração de clorofila. A concentração de clorofila-a variou de $0,2$ a $1,5 \text{ mg g}^{-1}$ e clorofila-b de $0,1$ a $0,7 \text{ mg g}^{-1}$. As células de microalgas respondem às alterações ambientais adaptando sua antena fotossintética. Devido as diferentes respostas, os autores comentaram que um dos principais fatores que influenciam a biossíntese de clorofila é a intensidade da luz.

Chen et al. (2011) cultivaram *Chlorella* sp. em fotobiorreator estudando a luz fluorescente de 85 a $590 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Conforme houve aumento da intensidade luminosa, o teor de clorofila diminuiu. Quando *Chlorella vulgaris* foi cultivada sob luz vermelha, verde, laranja, branca ou violeta, o maior rendimento de clorofila-a foi alcançado sob luz vermelha, correspondendo a $1,29 \%$ da biomassa. A produção deste pigmento é estimulada quando exposto a luz vermelha, devido seu comprimento de onda principal ser nesta faixa. Os valores encontrados para a exposição à luz verde, laranja e branca foram $1,04$, $0,89$ e $0,86 \%$, respectivamente (MOHSENPOUR; WILLOUGHBY, 2013). El-sheekh, Morsi e Hassan (2020) cultivaram *Chlorella vulgaris* em Erlenmeyer, meio BG 11, com diferentes intensidades de luz fluorescente (25 , 40 , 60 e $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A maior concentração de clorofila ($18 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida com a intensidade de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto houve diminuição nas menores intensidades testadas.

3.2.2 Carotenoides

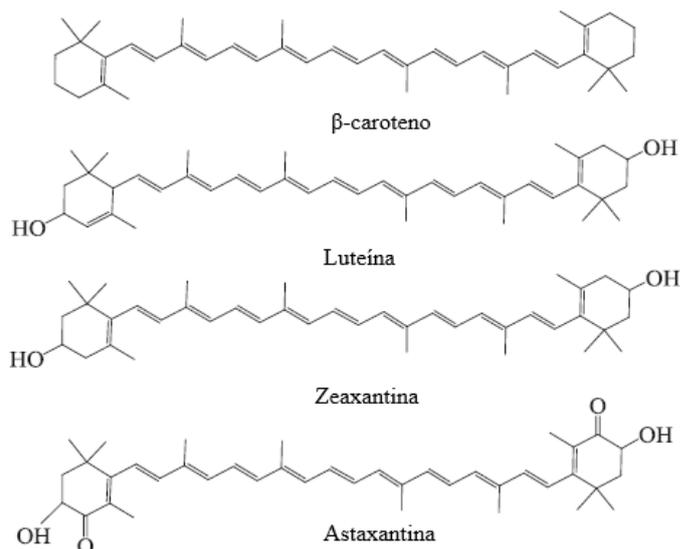
Os carotenoides são classificados como tetraterpenos, formados por 40 átomos de carbono que possuem uma longa cadeia de hidrocarbonetos poliênicos que pode conter entre 9 a 15 ligações conjugadas. Eles são responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelha de frutas e legumes. Esses hidrocarbonetos são divididos em dois grupos: o primeiro são os carotenos, que contêm apenas átomos de carbono e hidrogênio (por exemplo, α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, fitoeno e licopeno) e um segundo grupo, xantofilas, que contêm carbono, hidrogênio e oxigênio em sua estrutura molecular. Plantas, algas e algumas espécies de fungos e bactérias sintetizam carotenoides e esses desempenham funções como atuar como pigmento acessório na captura de energia solar (BHOSALE; BERNSTEIN, 2005; NEGRO; GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2000).

Os carotenoides primários, como o β -caroteno, luteína e zeaxantina, que se acumulam na membrana tilacoide, estão associados ao aparato fotossintético, exercendo papel coletor de luz, eliminando as espécies reativas de oxigênio e estabilizando os complexos pigmento-proteína. Os carotenoides secundários, como astaxantina e cantaxantina, são produzidos por certas microalgas sob condições estresse e não participam da fotossíntese. Mas esses se acumulam em grandes quantidades em glóbulos lipídicos citoplasmáticos, onde bloqueiam o excesso de radiação e suprimem a geração de espécies reativas de oxigênio (DI LENA et al., 2019; DUFOSSÉ et al., 2005; YOUNG, 1993). No entanto, vários carotenoides primários, como o β -caroteno, atuam como metabólitos secundários e, portanto, se acumulam sob condições de estresse (MARKOU, 2014). A Figura 3 apresenta as estruturas químicas de alguns carotenoides.

A biossíntese de carotenoides começa dentro do cloroplasto com geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e com algumas etapas específicas localizadas no citoplasma. Isso ocorre por meio da enzima fitoeno sintase, que dá origem ao hidrocarboneto fitoeno. Esta enzima está entre as enzimas-chave para a biossíntese de carotenoides, em organismos fotossintéticos. A expressão desta enzima ou outros genes de sintase pode ser regulada positivamente por estresses ambientais (GONG; BASSI, 2016). As microalgas estão sendo reconhecidas como fonte de pigmentos e, dessa maneira, podem ser produzidos de maneira sustentável. Os principais carotenoides de microalgas são: β -caroteno, licopeno, astaxantina, zeaxantina, violaxantina e luteína. Desses, β -caroteno, luteína e astaxantina são os mais estudados. β -caroteno é um pigmento laranja-amarelado com crescente demanda, sendo usado como corante para alimentos

ou suplementos nutricionais mento, porque é um precursor de vitamina A (retinol) (DI LENA et al., 2019).

Figura 3 – Estrutura química de carotenoides



Fonte: Adaptado de D'Alessandro e Antoniosi Filho (2016)

Entre as espécies de algas, *Haematococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sps, *Spirulina platensis* e *Botryococcus braunii* são conhecidas pela produção de carotenoides. No entanto, a composição do pigmento das algas varia de espécie para espécie e também de acordo com as condições ambientais. Microalgas como as espécies *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* para a extração de β-caroteno e astaxantina, respectivamente (CEZARE-GOMES et al., 2019).

Chlorella também é considerada uma microalga produtora de β-caroteno, α-caroteno, luteína e zeaxantina (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011). Em *Chlorella zofingiensis*, foi demonstrado que em condições de estresse como alta irradiância de luz, estresse salino e baixa concentração de nitrogênio, o teor de carotenoides pode atingir 5,32-6,02 mg g⁻¹ de biomassa seca (PELAH; SINTOV; COHEN, 2004). Xie et al. (2019), com diferentes meios e concentrações de acetato de sódio e nitrato avaliaram a melhor produção de carotenoides, atingindo 9,57 mg g⁻¹, ao utilizar meio BG 11 e cultivo em batelada. *Chlorella protothecoides* possui taxa de crescimento e produtividade de luteína, relativamente altas em condições heterotróficas, em meios com glicose e ureia e em condições de estresse como baixo teor de nitrogênio (7 g L⁻¹) e alta temperatura (32 °C). A concentração de carotenoides nesta microalga está na faixa de 4,6-5,4 mg g⁻¹ (SHI; JIANG; CHEN, 2002). Christaki et al. (2013)

relataram que as cepas de *Chlorella sp.*, também podem ser utilizadas para a produção comercial de carotenoides, visto que podem alcançar níveis desses pigmentos, aproximadamente, de 1-2 g kg⁻¹ de matéria seca.

Othman et al. (2017) quantificaram carotenoides em *Chlorella vulgaris* e *Chlorella fusca* cultivadas em meio BBM, luz fluorescente (85 μmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16:8 h. Com a primeira cepa, foi obtido 18,42 μg g⁻¹ de β-caroteno e com a segunda 10,01 μg g⁻¹. Damergi et al. (2017) cultivaram *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator de camada fina aberto e relataram concentração de carotenoides máxima de 0,28 mg g⁻¹ de biomassa úmida. Kong et al. (2020) estudaram efeitos de diferentes fontes de carbono em *Chlorella vulgaris* e cultivo fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico. O conteúdo de carotenoides aumentou pela adição de acetato de sódio (6,86 mg g⁻¹) e glicerol (6,18 mg g⁻¹) em cultura mixotrófica e heterotrófica, respectivamente, em comparação ao cultivo padrão. Já Ogbonna, Nweze e Ogbonna (2021) realizaram ensaios com diferentes intensidades de luz fluorescente (702, 1307 e 1786 lux) no cultivo de *C. sorokiniana* em meio BBM. A maior concentração de carotenoides (7,02 mg g⁻¹) foi na intensidade de 1307 lux.

3.3 FONTES DE LUZ NO CULTIVO DE MICROALGAS

A fotossíntese é um processo fotobioquímico que usa energia luminosa para produzir ATP e NADPH para formar moléculas orgânicas. Funcionalmente, os fótons são absorvidos por complexos de proteína, clorofila e carotenoides (que formam a antena de captação de luz dos fotossistemas) e, em seguida, transferidos para o centro de reação do fotossistema, onde elétrons são gerados (MÖGLICH et al., 2010). Embora a luz solar seja a fonte de energia mais econômica para o cultivo de microalgas, a luz artificial ainda é economicamente viável, principalmente quando a biomassa é usada como matéria-prima para produtos de alto valor (SCHULZE et al., 2014). A luz artificial fornece melhor regulação da densidade de fluxo de fótons fotossintéticos e deve fornecer a energia necessárias para o desenvolvimento de microalgas. Para este propósito, as lâmpadas fluorescentes, particularmente aquelas com espectros de azul e vermelho aprimorados (lâmpadas brancas fluorescentes frias), são comumente utilizadas no cultivo (DARKO et al., 2014).

A intensidade da luz e o fotoperíodo escolhido afetam, diretamente, o cultivo de microalgas. Se a iluminação de baixa intensidade, a fotossíntese pode não ser eficiente, no entanto, a luz excessiva gera radicais de oxigênio e pode causar fotoinibição (JAUBERT et al., 2017). A limitação de luz e fotoinibição são as duas fases, capazes de diminuir ou mesmo

interromper o crescimento de microalgas. Na fase de limitação de luz, o aumento da intensidade da luz, aumenta o crescimento da microalga até a área de saturação da luz. A fotoinibição ocorre em intensidades de luz superiores ao ponto de saturação. A irradiação intensiva danifica o fotossistema II e diminui o crescimento de microalgas significativamente. Geralmente, os fotoperíodos estudados são 12:12, 14:10, 16: 8 e 24:0 h de claro/escuro (DANESHVAR et al., 2021; SINGH; SINGH, 2015).

O uso de fontes de luz possui custo, então sua melhoria em termos fotossintéticos e de eficiência econômica pode fornecer uma alternativa a ser utilizada nos cultivos de microalgas. Nesse sentido, os diodos emissores de luz (LEDs) possuem longa duração, emitindo luz monocromática em vários comprimentos de onda (SCHULZE et al., 2014). Portanto, os LEDs também podem ser aplicado para ajustar a composição bioquímica da biomassa produzida por microalgas por meio de comprimentos de onda únicos em diferentes intensidades de luz e fotoperíodos (AMARO et al., 2020).

3.3.1 Diodos emissores de luz (LEDs) no cultivo de microalgas

Os LEDs são uma alternativa econômica de luz, possuem alta durabilidade, tamanho reduzido, não aquecem e não possuem materiais tóxicos em sua composição (GLEMSER et al., 2016). LEDs são semicondutores de estado sólido, que produzem luz com um pico de emissão estreito. Esta fonte de luz é composta por semicondutores que, quando energizados, emitem luz visível monocromática, produzida pelas interações energéticas do elétron. A monocromaticidade que os LEDs apresentam, propicia melhor controle do fluxo de fótons, o que pode interferir quantitativamente e qualitativamente na composição da biomassa de microalgas (SCHULZE et al., 2014). Por isso, atrai atenção para seu estudo como fonte energética em cultivos, onde podem ser avaliados diferentes intensidades da luz e cores. Assim, essa fonte de luz, se torna uma alternativa a luz fluorescente, comumente utilizada, que diferente dos LEDs, emite amplo espectro luminoso, entre 350 a 750 nm (MOSQUEDA; ANDREU; AGUILAR, 2017).

A otimização das condições de iluminação é um dos fatores-chave para atingir a maior taxa de crescimento de microalgas. Intensidade de luz, comprimento de onda e fotoperíodo são três características importantes da luz que podem afetar significativamente o crescimento de microalgas em culturas fotossintéticas (AMARO et al., 2020). Em geral, a luz vermelha fornece energia suficiente para a clorofila, para elevar um elétron ao primeiro estado

excitado na antena de coleta de luz complexo. Em contraste, os fótons de luz azul têm comprimentos de onda mais curtos e contêm cerca de 40 % a mais de energia. Esses fótons de alta energia podem elevar elétrons de pigmentos coletores de luz diretamente ao seu segundo estado excitado, de onde os elétrons finalmente retornam ao seu estado fundamental após terem passado a energia para os componentes a jusante dos fotossistemas I e II, respectivamente. Conseqüentemente, a luz azul tem papel regulador essencial para o crescimento e metabolismo celular (GLEMSER et al., 2016; MATTHIJS et al., 1996).

Asuthkar et al. (2016) estudaram o efeito de diferentes comprimentos de onda de luz no crescimento de *Chlorella pyrenoidosa*, em meio BG 11 durante 10 d. As cores verde (450 lux), azul (1663 lux), vermelho (480 lux) e branco (1986 lux) foram avaliadas. A microalga cresceu melhor sob luz azul ($0,7 \text{ g L}^{-1}$), em comparação aos outros tipos de LEDs, e que também produziu maior teor de lipídios (33,8 %). Shu et al., (2012) avaliaram a influência da exposição a LEDs de diferentes cores no conteúdo lipídico de *Chlorella sp.* A produtividade de conteúdo lipídico foi $4,17$, $1,83$ e $7,40 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sob LED azul, verde e vermelho, respectivamente.

Rendón, Roldan e Voroney (2013) cultivaram *Chlorella vulgaris*, com LEDs ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) durante 15 d. A maior produção de biomassa, $1,59 \text{ g L}^{-1}$, foi obtida quando a microalga foi exposta à luz branca. A produção de biomassa sob luz azul, vermelha e vermelha junto com azul foi $1,53 \text{ g L}^{-1}$, $0,45 \text{ g L}^{-1}$ e $1,27 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Duarte e Costa (2018) estudaram a influência de LEDs azuis de diferentes intensidades no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 (50 , 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para obtenção de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides. Quando a intensidade do LED aumentou de 50 para $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a biomassa acumulou até $4,5$ e $2,4$ vezes mais clorofilas e carotenoides, respectivamente.

Baba et al. (2012) no cultivo de *Botryococcus braunii*, observaram que sob LEDs vermelhos, em 180 dias, houve uma mudança da coloração para laranja-amarelo e isso pode ser devido a maior proporção de carotenoides/clorofila. Fu et al. (2013) relataram que a qualidade de luz não é importante apenas para o crescimento celular, mas também para o acúmulo de carotenoides por *Dunaliella salina*. A possibilidade de combinar luz azul (470 nm) e luz vermelha (660 nm) de intensidade $170 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ aumentou a concentração em $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ de β -caroteno e luteína, em comparação aos cultivos com outras cores. No estudo de Guo e Fang (2020) o conteúdo de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides em *Chlorella pyrenoidosa* foi de $8,4 \text{ mg g}^{-1}$, $6,4 \text{ mg g}^{-1}$ e $3,6 \text{ mg g}^{-1}$ sob luz azul, respectivamente.

3.4 CAMPOS MAGNÉTICOS

Os campos magnéticos (CM) correspondem a região em que forças magnéticas atuam e podem ser classificados como uniformes, onde mantêm a intensidade em determinado local, contínuos, onde a intensidade é mantida ao longo do tempo e alternados, onde a intensidade aplicada é variável (DINI; ABBRO, 2005). A unidade utilizada pelo sistema internacional (SI) é o tesla (T) (BURNS; NACDONALD, 1975). Os CM podem ser classificados como fracos ($< 1\text{mT}$), moderados ($1\text{ mT} - 1\text{ T}$), fortes ($1\text{ T} - 5\text{ T}$) e ultra fortes ($> 5\text{ T}$) (DINI; ABBRO, 2005). Os CM podem ser gerados por ímãs ou correntes elétricas. A interação entre campo e objeto pode ser diamagnéticas, quando o objeto é repelido pelo CM, paramagnéticas quando o objeto é atraído pelo CM ou ferromagnéticas, quando após a exposição ao CM o objeto mantém o CM (GIANCOLI, 1998).

Existem três mecanismos estabelecidos pelos quais os CM estáticos interagem com os tecidos vivos. O primeiro é a indução magnética, exercendo forças sobre íons em movimento na solução, como eletrólitos, e dão origem a campos e correntes elétricos induzidos (KOWALCZUK et al., 1991). O segundo é o efeito magnético-mecânico, onde CM uniformes produzem torções em certas moléculas e materiais ferromagnéticos (KIRSCHVINK, 1992). O terceiro são as interações eletrônicas, onde os CM podem causar mudanças nos níveis de energia e orientar a rotação dos elétrons (REPACHOLI; GREENEBAUM, 1999).

CM são capazes de causar efeitos em muitos sistemas biológicos e por isso, essa técnica atrai atenção para estimulação de culturas para aplicações em biotecnologia e bioenergia. Os efeitos biológicos causados pelo CM podem ser inibitórios, nulos ou estimulantes (HUNT et al., 2009). As forças magnéticas podem atuar de forma diferente nos micro-organismos devido as suas variadas constituições fisiológicas e bioquímicas (TANG et al., 2019). O mecanismo de eletroestimulação pode estar ligado a mudanças na membrana, uma vez que durante a eletroestimulação ocorre o aumento dos fluxos na membrana plasmática. Também pode ocorrer a eletroativação de alguns sistemas enzimáticos ou rotas metabólicas que estão relacionados a alguns processos que acontecem em nível de membrana. Os efeitos podem ser diferentes de acordo com a intensidade, frequência e tempo de aplicação (FOLOGEA, 1998).

Diante disso, o CM, no organismo vivo, pode causar efeitos como estresse oxidativo, ou seja, aumento na concentração, atividade e tempo de vida dos radicais livres e, também, pode causar alterações na atividade enzimática e de proteínas, expressão gênica, movimentos de elétrons e íons e crescimento celular (SAHEBJAMEI; ABDOLMALEKI;

GHANATI, 2007; YANG et al., 2011) e o aumento da atividade do fotossistema II em microalgas (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2019).

Estudos vêm relatando efeitos dos CM em micro-organismos. Motta et al. (2004) observaram aumento de 2,5 vezes no crescimento celular e 3,4 vezes na concentração de etanol em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* DAUFPE-2012 com aplicação de CM por imãs (220 mT por 24 h). Santos et al. (2010) demonstraram aumento de 39,0 % na produção de glutatona com *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 com aplicação de 25 mT por 16 h.

Zhou e Gao (2014) verificaram o aumento de 20 % na produção de pigmento vermelho e 36% do amarelo pelo fungo *Monascus purpureus* quando aplicado 0,4 mT por 8 d, em comparação ao controle (sem o campo). Tang et al. (2019) verificaram 71,3 % maior produção de vitamina K2 e 86,8 % de biomassa, em comparação ao controle, pela bactéria *Flavobacterium* sp. m1-14 quando exposta a 100 mT por 48 h, indicando ser um método promissor para promover o crescimento bacteriano. Canli et al. (2011) estudaram a produção de invertase, expondo a levedura *Rhodotorula glutinis*, em cultivo submerso a 7 mT, utilizando bobina cilíndrica com fio de cobre. A atividade enzimática em 72 h com a aplicação do CM aumentou em 38 % em comparação ao cultivo controle, sem a aplicação. Silva et al. (2020) avaliaram a influência do CM (30 mT) durante o cultivo de *Phaffia rhodozyma*. Houve aumento da concentração de biomassa em 12,8 %, produção e produtividade de carotenoides em 59,4 % e 99,3 %, respectivamente, indicando que o CM é uma alternativa viável e de baixo custo.

3.4.1 Campos magnéticos (CM) no cultivo de microalgas

Pesquisadores têm procurado alternativas para estimular o crescimento e produção de biomoléculas de interesse a partir de microalgas, sendo uma dessas abordagens, a utilização de CM no cultivo (HUNT et al., 2009). Com auxílio dos trabalhos encontrados na literatura, podem ser observados resultados positivos em relação ao crescimento e produção de biomassa com a aplicação de CM. Assim, o estudo de diferentes intensidades de CM, tempo de exposição e espécies de microalgas se torna atrativo (DEAMICI et al., 2016). Li et al. (2007) relataram que a exposição de *Spirulina platensis* a 250 mT aumentou a concentração de células, em menor tempo, e que esse comportamento pode estar associado ao aumento da absorção de nutrientes, devido a mudança na permeabilidade da membrana que o CM pode ter causado.

Small, Hüner e Wan (2012) observaram mudanças na fotossíntese e composição bioquímica quando *Chlorella kessleri* foi exposta a 10 mT. O aumento do estresse oxidativo e do efeito de radicais livres pode ser o mecanismo que ocorre, fazendo com que o CM afete as

microalgas alterando a concentração de radicais livres. Porém, os autores relataram que é necessário um estudo mais aprofundado dos efeitos de CM sobre os níveis de radicais livres. O Quadro 1 apresenta alguns estudos, além dos citados no texto, envolvendo CM em cultivo de microalgas, com os parâmetros utilizados e os efeitos positivos decorrentes dessa aplicação.

Deamici, Costa e Santos (2016) estudaram a influência de 30 e 60 mT, aplicado durante 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹ no crescimento e composição da biomassa de *Chlorella fusca*. Com 60 mT aplicado por 24 h d⁻¹, foi observado aumento de 20,5 % na concentração de biomassa e 24,8 % no teor de carboidratos em comparação ao cultivo sem a aplicação do CM. Wang et al. (2008) aplicaram CM (10-50 mT) durante 12 h d⁻¹, no cultivo de *Chlorella vulgaris*. Em ensaios com a exposição a 10-35 mT a taxa de crescimento específico aumentou significativamente. Nenhuma variação significativa no conteúdo de carotenoides totais nas células foi observada nos cultivos com CM. Luna, Álvarez e Rivero (2011) também aplicaram CM (30 mT) em *Chlorella vulgaris*, durante 1 h d⁻¹. O cultivo com CM apresentou concentração de biomassa máxima em menor tempo, do que o cultivo sem a aplicação. A concentração de clorofila foi menor com aplicação do CM e a de carotenoides não apresentou diferença estatística do cultivo sem aplicação do CM.

Bauer et al. (2017) aplicaram CM de diferentes intensidades (30 e 60 mT) e tempos de exposição (24 h e 1 h d⁻¹) em cultivos de *Chlorella kessleri* em reator tubular. A intensidade de 60 mT por 1 h d⁻¹ aumentou 83,2 % o $X_{m\acute{a}x}$ em comparação ao cultivo controle (sem aplicação do CM), além de estimular a síntese lipídica em 13,7 %, de clorofila-a em 38,9 %, de clorofila-b em 59,1 % e carotenoides em 25,0 %, indicando que os CM são uma alternativa para estimular o crescimento celular e biomoléculas de interesse. Deamici, Santos e Costa (2019) observaram que o uso de 30 e 60 mT por 1 h d⁻¹ aumentou 34 % a produtividade e produziu 1,42 g L⁻¹ de biomassa de *Chlorella fusca*. Além disso, a taxa de biofixação de CO₂ aumentou em 50 % com 60 mT por 1 h d⁻¹.

No cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, Deamici, Santos e Costa (2019) utilizaram diferentes CM de 30 e 60 mT, durante 1 e 24 h d⁻¹. Os cultivos expostos a 1 h d⁻¹, nas duas intensidades, tiveram maiores concentrações de biomassa e 34 % mais produtividade no mesmo tempo que o cultivo sem aplicação do CM. A taxa de biofixação de CO₂ aumentou em 50 % com 60 mT por 1 h d⁻¹, e o conteúdo de proteínas com 30 mT aumentou 56,2 %. Costa et al. (2020) estudaram a aplicação de diferentes intensidades (15, 30 e 60 mT) e tempos de exposição (1 h d⁻¹, 24 h d⁻¹) de CM na produção de lipídios e crescimento da microalga *Chlorella homosphaera*. A aplicação de 30 mT (1 h d⁻¹) aumento a concentração de biomassa em 20,6 % e de 60 mT (1 h d⁻¹) aumentou produção de lipídios em 12,4 %, respectivamente. A

produtividade lipídica aumentou em 108,4 % e 135,1 %, respectivamente, em comparação ao cultivo sem CM. Huo e colaboradores (2020) também relataram aumento na concentração de biomassa (15 %) da microalga filamentosa *Tribonema* sp. utilizando 30 mT durante todo o cultivo.

Quadro 1 - Estudos sobre aplicação de campos magnéticos no cultivo de microalgas

Microalga	Intensidade do CM (mT)	Tempo aplicado (h)	Efeito positivo	Referência
<i>Anabaena doliolum</i>	300	1-6	Pigmentos, carboidratos e proteínas	Singh et al. (1994)
<i>Spirulina platensis</i>	251-402	24	Proteínas e aminoácidos	Guo et al. (2002)
<i>Spirulina platensis</i>	250	3	Aminoácidos essenciais e oligômeros	Li et al. (2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	100	2	11,5 % no teor de clorofila-a	Tu et al. (2015)
<i>Spirulina platensis</i>	30	3, 6 e 12	Diminuição Cd ²⁺	Shao et al. (2018)
<i>Chlorella minutissima</i>	30	24	Aumento de biomassa e carboidratos	Menestrino et al. (2020)
<i>Spirulina platensis</i>	60	24	Aumento de biomassa	Veiga et al. (2020)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20, 30 e 40	24	Maior produtividade lipídica	Chu et al. (2020)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 pertence ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG. O meio de cultivo BG 11 foi utilizado nos ensaios e contém (g L⁻¹): NaNO₃ (1,5); K₂HPO₄.7H₂O (0,04); MgSO₄.7H₂O (0,075); CaCl₂.2H₂O (0,036); C₆H₁₁FeNO₇ (0,006); C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H (0,001); Na₂CO₃ (0,02); C₆H₈O₇ (0,006) e solução A₅+Co (1 mL L⁻¹). Solução A₅+Co contém (g L⁻¹): H₃BO₃ (2,86), MnCl₂.4H₂O (1,81), ZnSO₄.7H₂O (0,222), NaMoO₄ (0,015), CuSO₄.5H₂O (0,079) e Co(NO₃).6H₂O (0,0494) (RIPPKA et al., 1979).

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os cultivos foram feitos em duplicata, em fotobiorreatores tubulares verticais de acrílico de 1,8 L (volume útil de 1,5 L), a 30°C, concentração do inóculo de 0,3 g L⁻¹, mantidos com agitação contínua utilizando injeção de ar comprimido (0,5 vvm) filtrado em filtro de lã de vidro durante 15 d (MORAIS; COSTA, 2007).

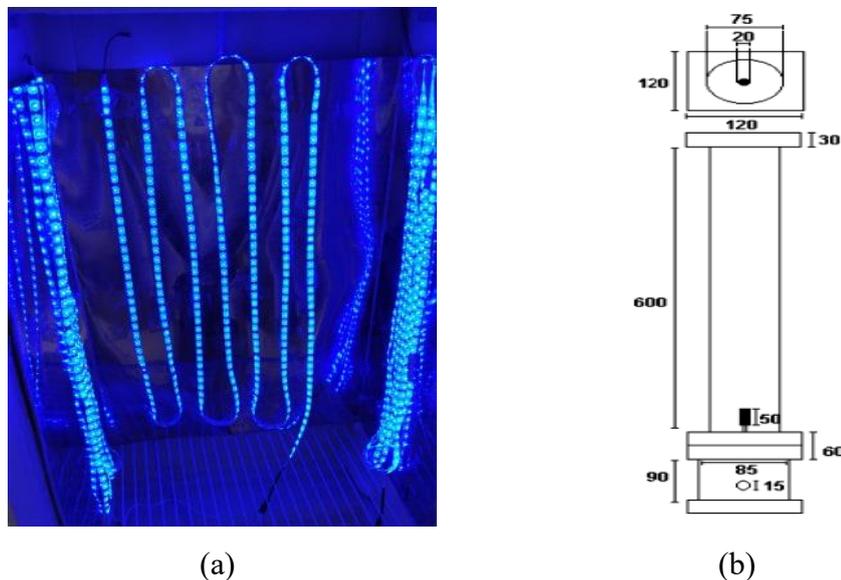
4.3 APLICAÇÃO DE CAMPOS MAGNÉTICOS E DIFERENTES FONTES DE LUZ NOS CULTIVOS

Os CM foram gerados por imãs de ferrite, com intensidade média de 30 mT (150 x 50 x 10 mm). Em cada fotobiorreator tubular foram acoplados dois imãs na parte externa, dispostos a 180° um do outro. Os imãs foram aplicados durante 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹, a fim de avaliar a influência do tempo de aplicação.

LEDs azuis na intensidade de 100 μmol m⁻² s⁻¹ foram utilizados como fonte de luz em alguns ensaios (DUARTE; COSTA, 2018). As fitas foram dispostas em uma estrutura de alumínio acoplada na estufa (Figura 4^a). A Figura 4b apresenta a ilustração do fotobiorreator utilizado. A Tabela 1 apresenta os parâmetros utilizados durante os cultivos, sendo o fotoperíodo de 24:0 h luz ligada/desligada.

Cultivos com a aplicação dos CM e luz fluorescente (100 μmol m⁻² s⁻¹) foram feitos, a fim de verificar os efeitos que podem ser causados pela mudança da fonte de luz. As lâmpadas fluorescentes estavam acopladas na porta da estufa termostatizada, a uma distância de 10 cm do fotobiorreator.

Figura 4 – (a) Diodos emissores de luz (LEDs) azuis dispostos na estufa termostatizada e (b) ilustração dos fotobiorreatores, medidas em milímetros, utilizados para realização dos cultivos



Fonte: Morais e Costa (2007)

Tabela 1 – Parâmetros para realização dos cultivos

Cultivo	Tempo de aplicação do campo magnético (h d ⁻¹)	Fonte de luz (100 μmol m ⁻² s ⁻¹)
FC	×	Fluorescente (Controle)
LC	×	LEDs azuis (Controle)
FCM 1 h d ⁻¹	1	Fluorescente
FCM 24 h d ⁻¹	24	Fluorescente
LCM 1 h d ⁻¹	1	LEDs azuis
LCM 24 h d ⁻¹	24	LEDs azuis

4.4 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 x g; 20 °C; 20 min), ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada (9690 x g; 20 °C; 10 min) para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa centrifugada foi seca em estufa a 35 °C por 48 h. Após, foi feita a caracterização quanto ao teor de proteínas, lipídios e carboidratos.

4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.5.1 Determinação da concentração da biomassa e pH

A concentração de biomassa foi determinada diariamente mediante a leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro (670 nm), a partir de curva padrão correspondente (Apêndice- Figura A1), que relaciona a densidade ótica e a biomassa seca.

O pH dos cultivos foi avaliado diariamente por meio da leitura direta em pHmetro digital.

4.5.2 Conteúdo de clorofilas e carotenoides totais

As determinações das concentrações de clorofila-a, clorofila-b e carotenoides totais na biomassa foram feitas a cada 3 d. Para tal, 7 mL de amostra foram retiradas dos cultivos e a extração foi realizada utilizando acetona como solvente. Os extratos foram lidos em espectrofotômetro UV-Vis (QUIMIS Q798DRM, Diadema– SP) para determinação de clorofila-a (663 nm) e clorofila-b (645 nm) e foram calculadas conforme as Equações 1 e 2, respectivamente (LICHTENTHALER, 1987). Para determinação do teor de carotenoides, o sobrenadante obtido na etapa de extração feita anteriormente foi submetido ao processo de saponificação com solução de KOH 10 %. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ do β -caroteno (450 nm – Apêndice- Figura A2) em éter de petróleo e calculada conforme a Equação 3 (BEZERRA et al., 2019; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004). Nas equações C_a : conteúdo de clorofila-a total; C_b : conteúdo de clorofila-b total e C_t : conteúdo de carotenoides; A : Absorbância em determinado comprimento de onda; 25592: Coeficiente de absorção do β -caroteno em éter de petróleo.

$$C_a(\text{mg g}^{-1} \text{ de biomassa})=11,24A_{663} - 2,04A_{645} \quad (1)$$

$$C_b(\text{mg g}^{-1} \text{ de biomassa})=20,13A_{645} - 4,19A_{663} \quad (2)$$

$$C_t(\text{mg g}^{-1} \text{ de biomassa})=\frac{A_{450} \times V_{\text{amostra}} \times 10^4}{25592 \times m_{\text{amostra}}} \quad (3)$$

4.5.3 Caracterização da Biomassa

A biomassa obtida após os cultivos foi analisada quanto ao teor de umidade, proteínas, carboidratos e lipídios. Para realização das determinações de proteínas e carboidratos foi necessário preparar extratos não clarificados de biomassa. Estes extratos foram obtidos a partir de 5 mg de biomassa seca e 10 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). Após o tratamento ultrassônico obteve-se uma suspensão de biomassa, a qual foi utilizada nas determinações de carboidratos e proteínas.

4.5.3.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade (%) foi determinado pela metodologia oficial descrita pela *Official Methods of Analysis - AOAC (2000)*.

4.5.3.2 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas na biomassa foi determinado por método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. Foram adicionados 0,5 mL dos extratos não clarificados da biomassa e 0,5 mL de NaOH 1 mol L⁻¹, que foram aquecidos (100 °C por 5 min) e após resfriados por 10 min. Após, foram adicionados 2,5 mL da solução que continha Na₂CO₃ 5 % (m v⁻¹), tartarato de sódio e potássio 1 % (m v⁻¹), CuSO₄.5H₂O 0,5 % (m v⁻¹) e 0,5 mL de Follin-Ciocalteau 1 mol L⁻¹. Os tubos foram mantidos por 30 min no escuro e após, foi feita leitura da transmitância em espectrofotômetro a 750 nm.

4.5.3.3 Determinação de carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose. Para isso, 1 mL do extrato de biomassa e 1 mL da solução fenol 5 % (v v⁻¹) foram agitados, adicionado 5 mL de H₂SO₄ e após novamente agitados. O meio reacional permaneceu em repouso por 10 min e depois foram resfriados por 20 min, para parar a reação com o ácido. Transcorrido este tempo, as transmitâncias das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 488 nm.

4.5.3.4 Determinação do teor de lipídios

Os lipídios foram determinados a partir da metodologia descrita por Marsh; Weinstein (1966), utilizando curva padrão de tripalmitina. Um extrato com 10 mg de biomassa seca, 5 gotas de solução de clorofórmio:metanol (1:2) e esferas de vidro foi preparado. O extrato foi aquecido a 60 °C, após centrifugado e adicionado ao sobrenadante 3,5 mL de clorofórmio:metanol. Após, o sobrenadante foi centrifugado e o procedimento foi feito três vezes.

Para quantificação do teor lipídico foi adicionado em cada um dos extratos 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada para a separação das fases. O extrato foi centrifugado (3000 rpm por 10 min), a fase apolar foi separada da fase polar e filtrada utilizando papel filtro. O extrato lipídico foi evaporado em rotaevaporador, ressuspendido em 3 mL de clorofórmio e dividido em 3 alíquotas de 200 µL. Para separar o solvente, os tubos foram aquecidos a 60 °C sob vácuo, depois 2 mL de solução de H₂SO₄ foi adicionado aos extratos que foram aquecidos a 200 °C por 15 min. Após a reação foi parada com banho de gelo e as amostras lidas em espectrofotômetro a 375 nm.

4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

Nos cultivos foram determinadas produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$). As produtividades (P , g L⁻¹ d⁻¹) em cada dia de cultivo foram calculadas de acordo com a Equação $P = (X - X_i)/t$, onde, X (g L⁻¹), a concentração de biomassa no tempo t ; X_i a concentração de biomassa inicial (g L⁻¹) e t o tempo. O valor de $P_{m\acute{a}x}$ corresponde ao maior valor encontrado entre as produtividades calculadas.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) é a velocidade na fase exponencial de crescimento e foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação celular. O tempo de geração ($t_g = \ln 2/\mu_{m\acute{a}x}$) corresponde ao tempo necessário para que ocorra a duplicação celular (BAILEY; OLLIS, 1986).

Os resultados dos parâmetros de crescimento e concentração de biomoléculas dos cultivos controles, e cultivo com CM foram comparados utilizando a Equação 4 (DEAMICI et al., 2016).

$$\eta = \frac{C_{CM} - C_C}{C_C} \times 100 \quad (4)$$

Nesta η é a eficiência de aplicação de CM e relaciona as respostas obtidas nos cultivos com CM (C_{CM}) com as respostas nos cultivos controle (C_C).

4.7 EFICIÊNCIA ENERGÉTICA DO CONSUMO DE ENERGIA

As eficiências econômicas das diferentes fontes de luz foram avaliadas com base no custo do consumo de energia e na concentração de biomassa e biomoléculas produzidas. A Equação 5 (LOGANATHAN et al. 2020) foi utilizada para avaliar a eficiência econômica. Onde: E_e é a eficiência econômica, C_n e C_0 é a concentração do composto analisado no dia t e dia 0 , k é o custo por unidade de eletricidade consumida (R\$ W^{-1}). Foi utilizada a média de preço da energia no estado do Rio Grande do Sul (R\$ 0,55 kwh), nos meses em que os cultivos foram feitos; T é o tempo em dias e P é a energia fornecida pela fonte de luz com base nas informações cedidas pelo fornecedor (W). Para LEDs azuis é de 12 W e fluorescente de 40 W.

$$E_e = \frac{C_n - C_0}{k \times T_n \times P} \quad (5)$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

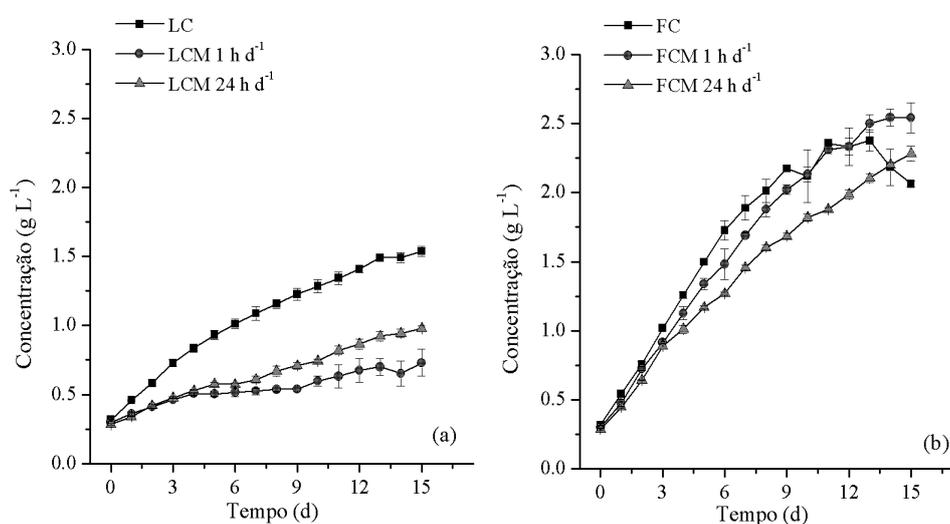
Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados por meio de Análise de Variância, seguido pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA, PARÂMETROS CINÉTICOS E pH

Na Figura 5 estão apresentadas as concentrações de biomassa, durante 15 d de cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, com (a) LEDs azuis e (b) luz fluorescente, com e sem aplicação de CM.

Figura 5 – Concentração de biomassa no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando (a) diodos emissores de luz (LEDs) azuis (L) e (b) luz fluorescente (F) nos cultivos controle (C) e com aplicação de campo magnético (CM) em 1 e 24 h d⁻¹



Em toda as condições estudadas, houve o crescimento e nenhum cultivo apresentou fase de adaptação. Todos cultivos com luz fluorescente apresentaram crescimento superior aos cultivos com LEDs azuis, com concentração final cerca de 40 % maior. Nos cultivos com luz fluorescente, houve decréscimo na concentração de biomassa do cultivo controle, entre o 12^o e 15^o dia de cultivo, comportamento não observado nos outros ensaios. Nos cultivos com luz fluorescente, entre o 6^o e 12^o dia, no cultivo com CM 24 h d⁻¹, notou-se menor crescimento, quando comparado ao cultivo controle e com CM 1 h d⁻¹. Wang et al. (2008) também observaram decréscimo na concentração no 12^a dia de cultivo de *Chlorella vulgaris* e relataram que isso não ocorreu no cultivo com aplicação de CM. Os autores observaram aumento na concentração de biomassa e maior incidência de espécies reativas de oxigênio, em comparação ao controle, indicando que o CM pode regular o seu sistema de defesa antioxidante para proteger as células.

Nos cultivos com LEDs azuis, houve maior crescimento no cultivo controle, sem utilização do CM. Ou seja, a aplicação do CM durante 1 h d⁻¹ e 24 h d⁻¹ inibiu o crescimento da *Chlorella fusca* LEB 111, com esta fonte de luz. Koç e Anderson (2013) no cultivo com *Chlorella kessleri* também obtiveram maior concentração de biomassa no cultivo com luz fluorescente, quando comparado ao cultivo com LEDs azuis e atribuíram isso a maior tamanho de célula nos cultivos com LED. Kim et al. (2014) comentaram que com a luz azul, as células tendem a ser maiores, o que acaba comprometendo a divisão celular, devido à maior expressão de um gene inibidor de crescimento (minD), além de aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio.

O CM pode causar danos na célula de microalgas, dependendo da intensidade e do tempo que vai estar exposta, devido ao aumento nos radicais livres (SMALL; HÜNER; WAN, 2012; WANG et al., 2008), o que pode ter causado decréscimo no crescimento da microalga com LEDs azuis e CM. A aplicação de CM pode promover alterações no ciclo celular, na sinalização do fator de crescimento e na transcrição do DNA, afetando, portanto, os parâmetros cinéticos e a viabilidade celular (ALBUQUERQUE et al., 2016). Além disso, Geda et al. (2018) comentaram que a eficiência do CM tem relação com o diâmetro da célula, devido as menores conseguirem concentrar a força do CM em seu interior, levando a mudanças. Kim et al. (2014) relataram que o tamanho da célula de *Chlorella vulgaris* cultivada sob LEDs azuis teve aumento de 60-70 % no diâmetro.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros de crescimento para os cultivos de *Chlorella fusca*. A concentração máxima obtida foi 2,54 g L⁻¹ no cultivo com luz fluorescente e aplicação de CM durante 1 h d⁻¹. Essa concentração é igual, estatisticamente, as outras obtidas com a mesma fonte de luz. Devido a isso, foi observado que o tempo e a intensidade do CM, ao qual o cultivo foi exposto, não causou estímulo, nem inibição no crescimento celular, apresentando efeito nulo. Embora, não houve diferença estatística entre os valores de X_{máx}, nesses cultivos, o P_{máx} obtido no cultivo controle (0,24 g L d⁻¹), sem aplicação do CM foi estatisticamente diferente dos demais cultivos.

Estudos de Rai, Gautom e Sharma (2015) e Chandra, Amit e Ghosh (2019) obtiveram X_{máx} de 0,82 g L⁻¹ (15 d) e 1,04 g L⁻¹ (9 d) para as microalgas *Chlorella* sp e *Chlorella minutissima*, respectivamente. Ambos utilizaram luz fluorescente e fotoperíodo de 24/0 h, assim como este trabalho. Esses valores são, aproximadamente, 67 e 58 % menores do que o maior X_{máx} obtidos nos cultivos com luz fluorescente. O primeiro estudo utilizou intensidade menor, de 40 μmol m⁻² s⁻², enquanto o segundo foi 120 μmol m⁻² s⁻², o que pode ter levado ao

menor $X_{m\acute{a}x}$. As produtividades desses estudos foram de $0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2 – Parâmetros de crescimento para os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com diodos emissores de luz (LEDs) azuis e luz fluorescente com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT em 1 e 24 h d^{-1} e cultivos controle

Ensaio	$X_{m\acute{a}x} \text{ (g L}^{-1}\text{)}$	$P_{m\acute{a}x} \text{ (g L}^{-1} \text{ d}^{-1}\text{)}$	$\mu_{m\acute{a}x} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	tg (d)
LEDs azuis				
Controle	$1,54^a \pm 0,05 \text{ (15 d)}$	$0,14^a \leq 0,01$	$0,19^a \leq 0,01$	$3,43^b \pm 0,28$
CM 1 h d^{-1}	$0,73^c \pm 0,10 \text{ (15 d)}$	$0,06^b \pm 0,02$	$0,13^b \leq 0,01$	$5,14^a \pm 0,09$
CM 24 h d^{-1}	$0,98^b \pm 0,02 \text{ (15 d)}$	$0,07^b \leq 0,01$	$0,14^b \leq 0,01$	$5,05^a \pm 0,25$
Fluorescente				
Controle	$2,38^a \pm 0,09 \text{ (15 d)}$	$0,24^a \leq 0,01$	$0,25^a \leq 0,01$	$2,73^a \pm 0,11$
CM 1 h d^{-1}	$2,54^a \pm 0,06 \text{ (15 d)}$	$0,21^b \leq 0,01$	$0,29^a \pm 0,08$	$2,49^a \pm 0,68$
CM 24 h d^{-1}	$2,28^a \pm 0,05 \text{ (13 d)}$	$0,20^b \leq 0,01$	$0,24^a \leq 0,01$	$2,91^a \pm 0,06$

Os ensaios foram comparados, estatisticamente, entre os cultivos com a mesma fonte de luz. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p \leq 0,05$), pelo teste de Tukey para cada parâmetro. $X_{m\acute{a}x}$ – Concentração de biomassa máxima; $P_{m\acute{a}x}$ – Produtividade máxima; $\mu_{m\acute{a}x}$ – Velocidade específica máxima de crescimento e tg – Tempo de geração.

Deamici et al. (2016) cultivaram *Chlorella fusca* LEB 111 com CM por 1 e 24 h d^{-1} , também em reator tubular, meio BG 11 e luz fluorescente, porém com fotoperíodo de 12/12 h e intensidade de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. $X_{m\acute{a}x}$ de $1,65 \text{ g L}^{-1}$ ($P_{m\acute{a}x}$ de $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtido no cultivo com CM por 1 h d^{-1} , mas que não diferiu estatisticamente do CM por 24 h d^{-1} e controle, mesmo comportamento obtido neste estudo. O $X_{m\acute{a}x}$ obtido neste trabalho, em condições semelhantes, foi $2,54 \text{ g L}^{-1}$. Entretanto, neste estudo foi utilizado fotoperíodo contínuo e maior intensidade luminosa. Wahidin, Idris e Shaleh (2013) estudaram diferentes intensidades de luz fluorescente em *Nannochloropsis sp.* e observaram que o crescimento foi menor com a intensidade de luz menor de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, enquanto a intensidade de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionou maior crescimento.

Nos cultivos com LEDs azuis, o $X_{m\acute{a}x}$ obtido foi $1,54 \text{ g L}^{-1}$ com $P_{m\acute{a}x}$ de $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, no cultivo controle. Com aplicação de CM durante 1 e 24 h d^{-1} , o $X_{m\acute{a}x}$ foi $0,73$ e $0,98 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, havendo diferença significativa entre todos cultivos e demonstrando que o CM inibiu o crescimento da microalga. Não há na literatura, estudos que avaliem, em conjunto,

LEDs e CM. Bauer e colaboradores (2017) observaram diminuição no $X_{\text{máx}}$ no cultivo de *Chlorella kessleri* quando aplicado CM por 24 h d⁻¹.

Khalili et al. (2015) cultivaram *Chlorella* sp. FC-21 com meio BG 11 em Erlenmeyer com fitas de LEDs azuis em volta (110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com fotoperíodo de 16:8 h e conseguiram $X_{\text{máx}}$ de 0,8 g L⁻¹ em 8 d e $P_{\text{máx}}$ de 0,010 g L⁻¹ d⁻¹. Esse valor é menor do que o obtido no cultivo controle, em 8 d. Com intensidade mais alta, de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Rendón, Roldan e Voroney (2013), obtiveram $X_{\text{máx}}$ de 1,53 g L⁻¹ (15 d) e $P_{\text{máx}}$ de 0,10 g L⁻¹ d⁻¹ no cultivo de *Chlorella vulgaris*, com exposição contínua a LEDs azuis. Deve ser observado que estes estudos foram feitos com outras cepas de *Chlorella*, além de diferente intensidade luminosa e fotoperíodo. Como as respostas das microalgas dependem das condições as quais são expostas, esses fatores influenciam diretamente nas respostas obtidas.

Em relação a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (tg), nos cultivos com luz fluorescente não teve diferença significativa entre as condições estudadas. O $\mu_{\text{máx}}$ ficou na faixa de 0,24-0,29 d⁻¹ e o tg em 2,49-2,91 d. Deamici, Santos e Costa (2019) para a mesma cepa, fotoperíodo 12:12 h e luz fluorescente, obtiveram $\mu_{\text{máx}}$ de 0,12 d⁻¹ nos cultivos com CM (30 mT, 1 h d⁻¹, 24 h d⁻¹) e 0,14 d⁻¹ sem aplicação. O tg obtido ficou na faixa de 5-5,9, cerca de 50 % maior do que o obtido neste trabalho, para a mesma fonte de luz. A eficiência do CM nos parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Eficiência da aplicação do campo magnético (CM) de 30 mT nos parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando fonte de luz fluorescente e diodos emissores de luz (LEDs) azuis

Ensaio	$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	$P_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	tg (d)
LEDs azuis				
1 h d ⁻¹	-52,6 %	-56,6 %	-33,4 %	+49,8 %
24 h d ⁻¹	-36,4 %	-51,8 %	-32,1 %	+47,0 %
Fluorescente				
1 h d ⁻¹	NS	-10,2 %	NS	NS
24 h d ⁻¹	NS	-15,0 %	NS	NS

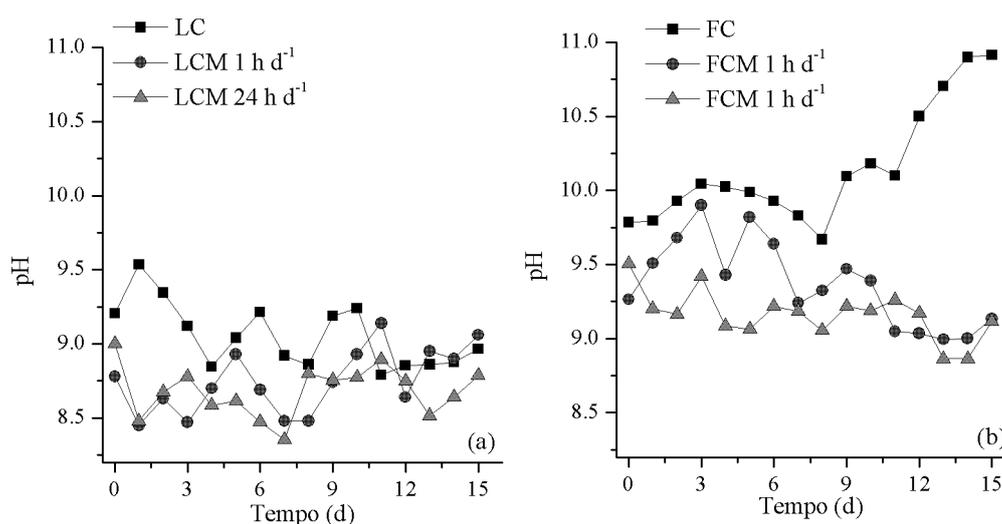
(+) Aumento da resposta avaliada por comparação com o cultivo controle; (-) Diminuição da resposta avaliada por comparação com o cultivo controle; NS – não significativo ($p \geq 0,05$) quando comparado ao cultivo controle.

$X_{\text{máx}}$ – Concentração de biomassa máxima; $P_{\text{máx}}$ – Produtividade máxima; $\mu_{\text{máx}}$ – Velocidade específica máxima de crescimento e tg – Tempo de geração.

Com LEDs azuis, os cultivos com CM, tiveram diferença estatística do cultivo controle. O maior $\mu_{\text{máx}}$ ($0,19 \text{ d}^{-1}$) foi no cultivo controle e consequentemente o menor tg, sendo que com CM foram cerca de 30 % maior do que para o cultivo controle. Choi et al. (2013) obtiveram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,27 \text{ d}^{-1}$ e tg de 2,57 d, no cultivo de *Chlorella* sp. com LEDs azuis, intensidade de $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. O valor mais promissor de tg obtido com luz fluorescente, foi 27 % menor que o obtido com LEDs azuis. Isso demonstra que o cultivo com luz fluorescente precisou de menos tempo para dobrar o valor da concentração de biomassa, quando comparado ao cultivo com LEDs azuis.

Em todas as condições estudadas, em que houve diferença estatística, o CM inibiu o crescimento da microalga e nos cultivos com LEDs azuis a inibição foi maior. Portanto, se o objetivo for a produção de biomassa, seria vantajoso utilizar a fonte de luz fluorescente. Embora não tenha diferença estatística entre as maiores concentrações obtidas nos cultivos com essa fonte de luz, o cultivo controle atingiu o $X_{\text{máx}}$ em 13 d e apresentou produtividade maior ($p \leq 0,05$). Com isso há diminuição de 2 d de cultivo, não sendo necessária a aplicação do CM. A Figura 6 apresenta o monitoramento do pH dos ensaios, durante os 15 d de cultivo de *Chlorella fusca*.

Figura 6 – pH dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 utilizando (a) diodos emissores de luz (LEDs) azuis (L) e (b) luz fluorescente (F) nos cultivos controle (C) e com aplicação de campo magnético (CM) em 1 e 24 h d^{-1}



O pH dos cultivos variou de 8,5 até 10,9. Nos cultivos com luz fluorescente (Fig. 6a) o pH no cultivo controle aumentou a partir do 9º dia. A microalga utilizada neste trabalho apresenta resistência a alcalinidade, pois foi isolada das lagoas de estabilização de cinzas,

próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici, cujo pH é próximo de 9,8 (DEAMICI et al., 2016). Pode ser observado, na Figura 6b que nos dias finais do ensaio controle, com luz fluorescente, enquanto houve decréscimo da concentração, ocorreu aumento no valor de pH. Ho et al. (2014) comentaram que a variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólitos produzidos. Logo, o aumento que ocorreu no ensaio Fluorescente controle pode ter levado a inibição do crescimento celular, devido ao estresse causado no meio.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

A síntese e o acúmulo das macromoléculas pelas microalgas são afetados pelas condições de cultivo as quais são expostas. A Tabela 4 apresenta a caracterização da biomassa, quanto ao teor de carboidratos, lipídios e proteínas.

Tabela 4 – Caracterização da biomassa dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111, com e sem aplicação de campo magnético (CM) com intensidade de 30 mT, durante 1 e 24 h d⁻¹

Ensaio	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
LEDs azuis			
Controle	15,4 ^a ± 1,36	20,2 ^a ± 1,26	54,8 ^{ab} ± 0,92
CM 1 h d ⁻¹	14,1 ^a ± 0,47	24,0 ^a ± 1,10	52,0 ^b ± 0,38
CM 24 h d ⁻¹	14,4 ^a ± 0,68	19,4 ^a ± 0,08	56,4 ^a ± 0,27
Fluorescente			
Controle	32,7 ^a ± 0,37	29,3 ^a ± 0,23	30,6 ^c ± 0,66
CM 1 h d ⁻¹	35,3 ^a ± 0,38	22,0 ^b ± 1,80	40,5 ^b ± 0,25
CM 24 h d ⁻¹	27,1 ^b ± 0,81	31,1 ^a ± 1,61	45,7 ^a ± 0,04

Valores em base seca (g g⁻¹). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p≤0,05) pelo teste de Tukey para a mesma resposta e fonte de luz. LEDs: Diodos emissores de luz.

O CM não modificou a composição da biomassa nos cultivos com LEDs azuis, mas modificou nos cultivos com luz fluorescente. Como pode ser visto, na Tabela 4 com aplicação de 1 h d⁻¹, o teor de carboidratos não foi afetado, porém o teor de lipídios foi inibido e de proteína estimulado. A eficiência do CM para lipídios e proteínas, nessa condição, foi de -24,7 % e +32,5 %, respectivamente. Já o CM aplicado por 24 h d⁻¹ inibiu os carboidratos, teve efeito

nulo no teor de lipídios e estimulou a produção de proteínas. A eficiência do CM para carboidratos e proteínas, nessa condição, foi de -17,1 % e +49,3 %, respectivamente.

Pesquisas com CM apresentam respostas diferentes, de acordo com tempo, intensidade aplicada e fatores envolvidos no meio de cultivo. As células das microalgas possuem componentes suscetíveis a mudanças com a aplicação de CM. Como, em geral, todas as reações metabólicas são baseadas nas diferenças de cargas elétricas e íons, isso pode contribuir para mudanças na produção de metabólitos e macromoléculas induzíveis pelo CM (SANTOS et al., 2017; TENG, 2005; YANG et al., 2011).

O conteúdo lipídico chegou a 31,11 % (luz fluorescente), que pode ser devido a exposição a luz contínua (24:0 h). Cassuriaga et al. (2018) caracterizaram a biomassa dos cultivos com *Chlorella fusca* LEB 111 com luz fluorescente e diferentes fotoperíodos. O maior teor lipídico (20,5 %) foi obtido no cultivo em que a microalga foi mais exposta a luz (18:6 h). Estudos como o de Ali et al. (2020) e Xu; Ibrahim; Harvey (2016) indicaram que o excesso de luz pode aumentar o conteúdo de lipídico.

Aplicação do CM, promoveu o acúmulo de proteínas, nos cultivos com luz fluorescente. Costa et al. (2020) observaram estimulação da síntese de lipídios com a mesma intensidade e tempo de aplicação em *Chlorella homosphaera*. Huo et al. (2020) também relataram que o CM aumentou o teor de lipídios em *Tribonema* sp. Já Bauer et al. (2017) com *Chlorella kessleri* e utilizando luz fluorescente e 30 mT (1 e 24 h d⁻¹) também observaram aumento do teor de proteínas. As respostas diferentes podem ter ocorrido devido as diferenças no meio de cultivo, que influenciam diretamente na composição da biomassa. Deamici, Santos e Costa (2021), com a mesma cepa de *Chlorella fusca*, fotoperíodo 12:12 h, luz fluorescente (81,3 $\mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), aplicaram 25 mT. O teor de proteínas quando aplicado CM durante 1 h d⁻¹ (35 %) foi maior em relação ao cultivo sem aplicação (28 %). Isso corresponde a eficiência, do CM 1 h d⁻¹ de 26,7 %, enquanto a obtida neste trabalho foi 35,5 %.

Small, Hüner e Wan (2012) observaram que, no cultivo de *C. kessleri*, o CM de 10 mT aplicado por 24 h d⁻¹ aumentou 8 % no teor de carboidratos (42,0 %) e proteínas (32,3 %). Pode ser observado, na Tabela 5, que o CM diminuiu 17 % a concentração de carboidratos e aumentou 49,3 % a de proteínas, também em 24 h d⁻¹. Uma hipótese para essa maior produção, é a diferença na intensidade do CM, que neste trabalho foi maior. Luna, Álvarez e Rivero (2011) também relataram efeito positivo ao aplicarem 30 mT, durante 24 h d⁻¹, no teor de proteínas.

A estratégia de gerenciamento de luz pode ser usada para aumentar a biomassa de microalgas, no entanto, a resposta do metabolismo das algas a diferentes qualidades de luz e sua interação com outros fatores ambientais não é uniforme (SCHULZE et al., 2014). O teor de

carboidratos nos cultivos com LEDs azuis foi 14-15 %, mostrando que houve menor acúmulo dessa macromolécula do que nos cultivos com luz fluorescente ($p \leq 0,05$). Estudos com *Chlorella* sp. investigaram os efeitos de espectros de luz na composição da biomassa e relataram que nos cultivos com luz vermelha ocorreu maior acúmulo de carboidratos (CHONG et al., 2019; LI et al., 2019). A luz vermelha pode aumentar a concentração de enzimas relacionadas à fixação de carbono através do sistema fitocromo, levando ao acúmulo de carboidratos (YUAN et al., 2020).

As pesquisas sugerem que a luz vermelha é adequada para a produção de carboidratos, enquanto a azul é para lipídios, quando comparadas as cores de LEDs. Embora neste estudo, a luz fluorescente tenha acumulado maior teor lipídico ($p \leq 0,05$), conforme a Tabela 5, os valores obtidos com LEDs azuis estão próximos aos relatados em estudos com essa mesma fonte de luz. Os teores de lipídios, nos cultivos com essa fonte de luz, ficaram entre 19-24 %. Duarte e Costa (2018) obtiveram teor de lipídios, similar, de 23,0 %, no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 com LEDs azuis ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo 24:0 h. Atta et al. (2013) com *Chlorella vulgaris* e utilizando mesmo fotoperíodo e intensidade de LEDs azuis, em 10 d de cultivo, obtiveram teor de lipídios similar a este trabalho (20,8 %) e descreveram que não houve diferença significativa para o cultivo com luz fluorescente.

A biomassa dos cultivos com LEDs azuis acumulou maior teor de proteínas (52-56 %) do que os cultivos com luz fluorescente ($p \leq 0,05$). Li e colaboradores (2021) verificaram em cultivos de *Chlorella vulgaris* com diferentes cores de LEDs que o teor de proteínas aumentou, enquanto o de lipídios diminuiu, quando expostos a LEDs azuis, e indicaram que esse comportamento pode ter sido causado pela influência da luz azul na síntese de proteínas. A divisão celular e o tamanho da célula das microalgas afetam a síntese de proteínas. De acordo com Cookson et al. (2009) o teor de proteínas de microalgas diminuiu, após a divisão celular. Isso indica que alta taxa de divisão pode resultar em menores teores de proteínas. Como já foi relatado também que a luz azul inibe a divisão celular e aumenta o tamanho das células de microalgas, pode ser que em certa intensidade de luz, uma taxa de crescimento relativamente lenta com divisão retardada e tamanho de célula grande pode induzir maior síntese e acúmulo de proteínas. Por isso, a luz azul pode promover o aumento do conteúdo de proteínas, conforme observado neste estudo.

Com estes resultados da caracterização da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111, é possível concluir que dependendo do objetivo final, a escolha da fonte de luz é um fator importante. Para maior acúmulo de carboidratos e lipídios, cultivos com luz fluorescente devem ser feitos. Já com objetivo de atingir maior teor de proteínas, LEDs azuis são mais eficientes,

entretanto se for utilizar a luz fluorescente, a aplicação do CM em 1 ou 24 h d⁻¹ pode aumentar o teor desta macromolécula. Com exceção do conteúdo proteico produzido com luz fluorescente, o CM não teve influência, logo não seria necessária sua aplicação para as outras macromoléculas, independente da fonte de luz.

5.3 PIGMENTOS

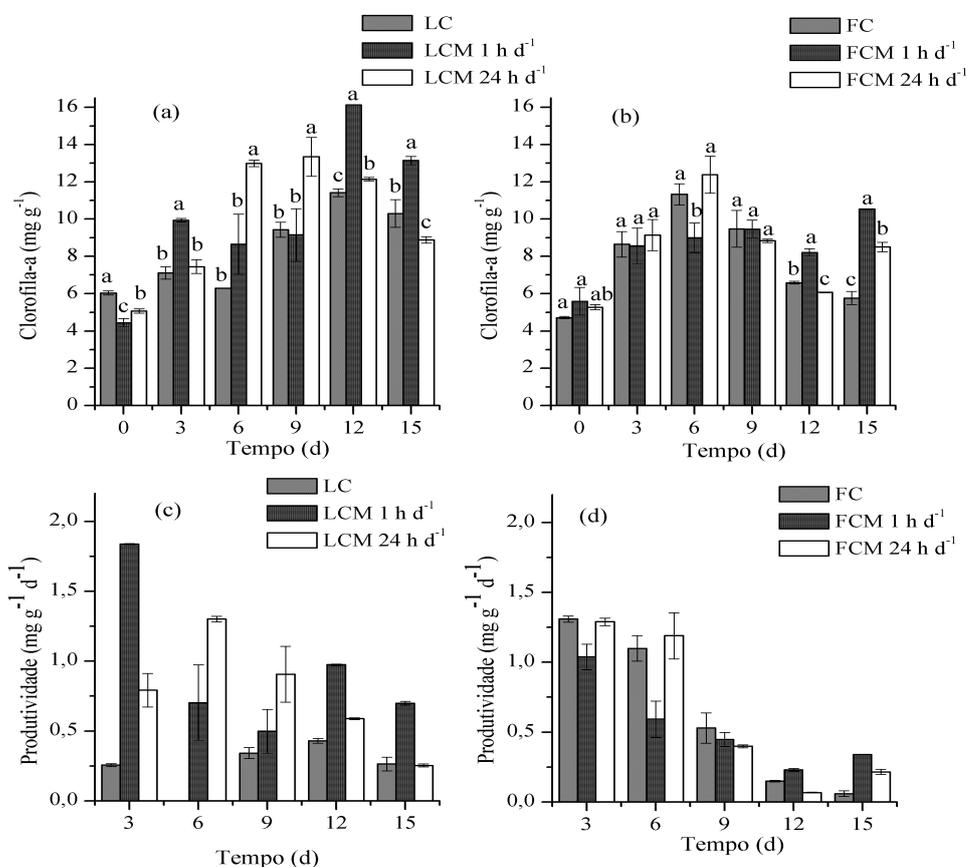
5.3.1 Clorofila-a e clorofila-b

A Figura 7 apresenta as concentrações e produtividade de clorofila-a para os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111, com LEDs azuis e luz fluorescente. Os cultivos com LEDs (Fig. 7a) apresentaram concentração de 4,20 a 16,13 mg g⁻¹, enquanto os com luz fluorescente (Fig. 7b) de 4,72 a 12,30 mg g⁻¹. No cultivo com LEDs azuis a menor concentração foi no cultivo controle. Com essa fonte de luz e CM (24 h d⁻¹), ao longo de todo o cultivo, a concentração aumentou até o dia 6, se manteve entre 6 e 12 e teve decréscimo no último dia de cultivo. Com o CM por 1 h d⁻¹ a concentração foi maior que nos outros cultivos no 3º, 12º e 15º dia e embora tenha diminuído no dia 15, ainda era maior do que nas concentrações iniciais (0-9 d). A eficiência da aplicação do CM por 1 h d⁻¹ foi de 41,2 %.

A maior concentração de clorofila-a, nos cultivos com luz fluorescente, foi no dia 6, no cultivo com CM 24 h d⁻¹. Entretanto, esse valor não teve diferença significativa do cultivo controle, no mesmo dia. Após o 6º dia, ocorreu decréscimo na concentração em todos os cultivos. Porém, essa diminuição do teor de clorofila-a foi menor nos cultivos com CM. De acordo com Rial et al. (2013), o conteúdo de clorofila, geralmente, diminui entre o crescimento exponencial e a fase estacionária, devido às limitações de nutrientes, luz e envelhecimento celular. O que pode explicar a diminuição desses pigmentos nos últimos dias, em alguns ensaios.

A maior produtividade (1,83 mg g⁻¹ d⁻¹) para os cultivos com LEDs azuis (Fig. 7c) foi obtida no 3º dia no cultivo com CM aplicado por 1 h d⁻¹. Os ensaios com CM apresentaram produtividade maior do que o cultivo controle, sem a aplicação. A produtividade dos cultivos com luz fluorescente (Fig. 7d) foi menor do que os cultivos com LEDs azuis, sendo a máxima obtida no 3º d.

Figura 7 – Concentrações e produtividade de clorofila-a ao longo dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d⁻¹ e com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente

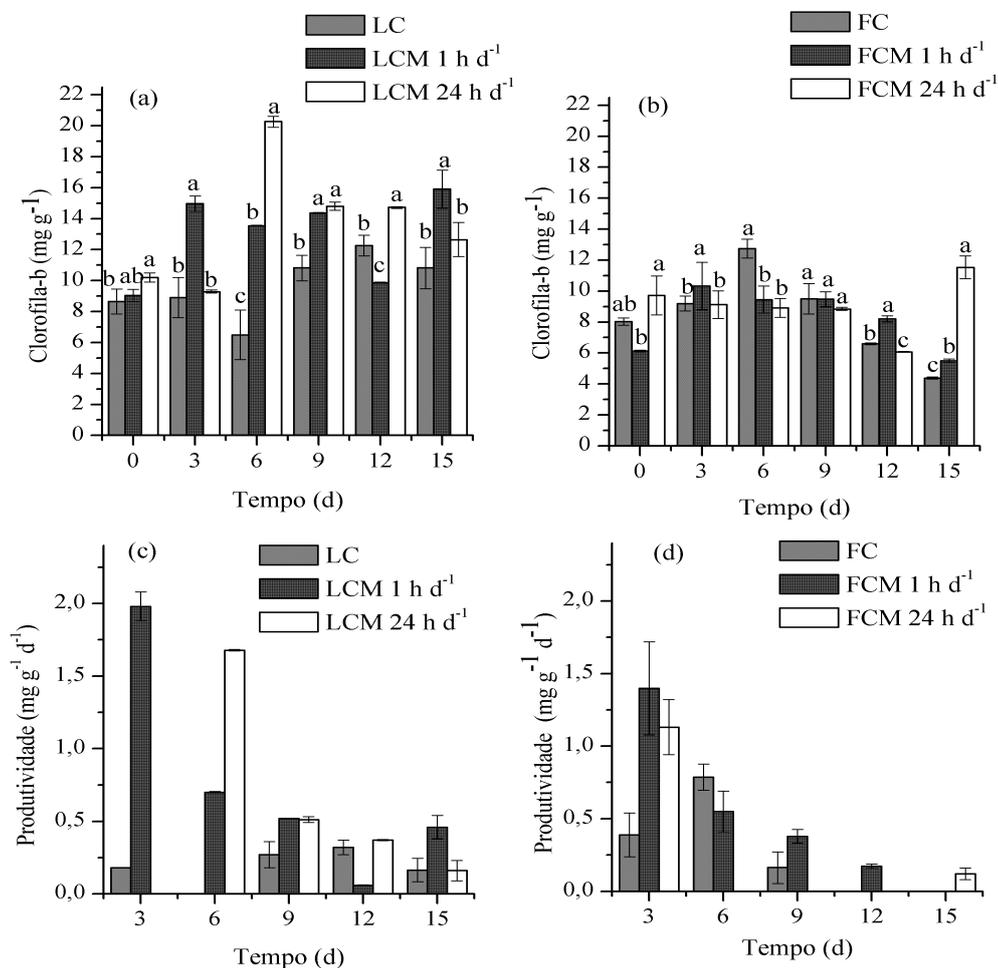


L: LEDs azuis; F: Fluorescente. C: Controle. Experimentos realizados com a biomassa úmida. Letras iguais, no mesmo dia, indicam que não há diferença ($p \geq 0,05$) significativa entre os ensaios pelo teste de Tukey.

A Figura 8 apresenta as concentrações e produtividade de clorofila-b para os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111, com LEDs azuis e luz fluorescente. Assim como as concentrações de clorofila-a, os cultivos com LEDs azuis também apresentaram maior teor de clorofila-b do que os ensaios com luz fluorescente. A concentração de clorofila-b, nos cultivos com LEDs azuis (Fig. 8a), variou de 8,64-20,27 mg g⁻¹ e nos cultivos com luz fluorescente (Fig. 8b) de 6,13-12,75 mg g⁻¹. A luz de LED proporcionou maior concentração deste pigmento no 6º dia, com aplicação de CM por 24 h d⁻¹, apresentando eficiência de aplicação de 212,2 %. A partir do 3º dia, o cultivo com CM aplicado por 24 h d⁻¹ apresentou maior teor de clorofila-b do que o cultivo controle. O cultivo com CM por 1 h d⁻¹ apresentou maior concentração nos dias 3 e 15, enquanto no cultivo com CM por 24 h d⁻¹ apresentou nos dias 6 e 12.

Nos cultivos com luz fluorescente, a maior concentração foi no 6º dia, no cultivo controle, de 12,75 mg g⁻¹. Esse ensaio apresentou aumento do pigmento até o dia 6 e, após, houve decréscimo até o último dia de cultivo. O cultivo com CM aplicado por 1 h d⁻¹, também apresentou diminuição da concentração entre os dias 9 e 15. Já no cultivo com CM 24 h d⁻¹, entre o 12º e 15º dia aumentou a concentração de clorofila-b. A maior produtividade para os cultivos com LEDs azuis (Fig. 8c) e com luz fluorescente (Fig. 8d), foi no 3º dia com CM 1 h d⁻¹, de 1,98 e 1,41 mg g⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Figura 8 – Concentrações e produtividade de clorofila-b ao longo dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d⁻¹ com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente



L: LEDs azuis; F: Fluorescente. C: Controle. Experimentos realizados com a biomassa úmida. Letras iguais, no mesmo dia, indicam que não há diferença ($p \geq 0,05$) significativa entre os ensaios pelo teste de Tukey.

Houve aumento de 30 % de clorofila-a, no ensaio com CM (1 h d⁻¹) e 37 % de clorofila-b (CM 24 h d⁻¹) nos cultivos com LEDs azuis, em comparação aos com luz fluorescente. Zhong, Jin e Cheng (2018) observaram aumento no conteúdo de clorofila a e b

com LEDs azuis (18:6 h, $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em 6 d, comparados a luz fluorescente. Entretanto, o crescimento também foi maior com LEDs azuis, diferente deste estudo, que foi com luz fluorescente. Os teores de clorofila-a e clorofila-b foram 13,0 e 7 mg g^{-1} , respectivamente, para LEDs azuis e 10 e 5 mg g^{-1} para luz fluorescente.

Devido ao comprimento de onda específico, as microalgas requerem condições de luz ideais dentro da estreita faixa do espectro. No entanto, a luz fluorescente comum contém ampla gama de comprimentos de onda (CHEIRSILP; TORPEE, 2012), enquanto os LEDs possuem menor faixa. Para clorofila, as bandas de absorção estão presentes nas regiões espectrais azuis (450–475 nm) e vermelhas (630–675 nm) e então, são referidas como as principais indutoras do maior acúmulo de clorofila, devido as bandas de absorção estarem presentes nas regiões do comprimento de onda dessas cores (RA et al., 2016; TEO et al., 2014). Logo, isso pode justificar os menores valores obtidos de clorofila nos cultivos com luz fluorescente e a maior produção de clorofila na luz azul.

Guo e Fang (2020) cultivaram *Chlorella pyrenoidosa* em LEDs (12:12 h), durante 30 d, e extraíram clorofila-a e clorofila-b com acetona. O conteúdo de clorofila-a, na luz azul, foi $8,4 \text{ mg g}^{-1}$, menor do que os cultivos sob luz vermelha. Já o conteúdo de clorofila-b foi inferior na luz vermelha e maior na luz azul ($6,4 \text{ mg g}^{-1}$). Kendirlioglu e Cetin (2017) determinaram clorofila-a e clorofila-b, durante 10 d, em *Chlorella vulgaris* com diferentes comprimentos de onda de luz (16:8 h). A quantidade máxima de clorofila-a e clorofila-b, sob luz azul, foi atingida no 6º dia, e após houve diminuição da concentração. Comportamento similar foi observado neste trabalho, em geral, pois as concentrações de clorofila entre os dias 6 e 9 mantiveram-se a mesma ou diminuíram.

A clorofila-a, com LEDs azuis, teve maior concentração no ensaio com CM por 1 h d^{-1} e clorofila-b no ensaio com CM por 24 h d^{-1} . Nos cultivos com luz fluorescente, a maior concentração de clorofila-a foi com CM 24 h d^{-1} , mas sem diferença estatística do controle, sendo este efeito nulo. Com clorofila-b o CM inibiu a sua produção em ambos tempos de aplicação. Deamici, Santos e Costa (2021), no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 (luz fluorescente, 12:12 h), observaram aumento da concentração de clorofila total com aplicação de CM (25 mT) por 24 h d^{-1} , em relação ao cultivo controle, no 12º dia de cultivo. O valor obtido foi $10,36 \mu\text{g mL}^{-1}$, cerca de 45 % menor do que o obtido no cultivo com CM 24 h d^{-1} e luz fluorescente, no mesmo dia. Porém, neste estudo, o cultivo controle teve maior produção de clorofila. Feng et al., (2020) também relataram que o CM (100-500 mT, 1 e 3 h d^{-1}) aumentou a concentração máxima de clorofila-a (6 d) no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* com águas residuais. Tu et al. (2015) cultivaram *Scenedesmus obliquus* em águas residuais municipais com

aplicação de 100 mT na fase de crescimento logarítmico por 0,5 h e conseguiram aumentar o conteúdo de clorofila-a em 11,5 %, em relação ao controle, após o crescimento de 6 dias.

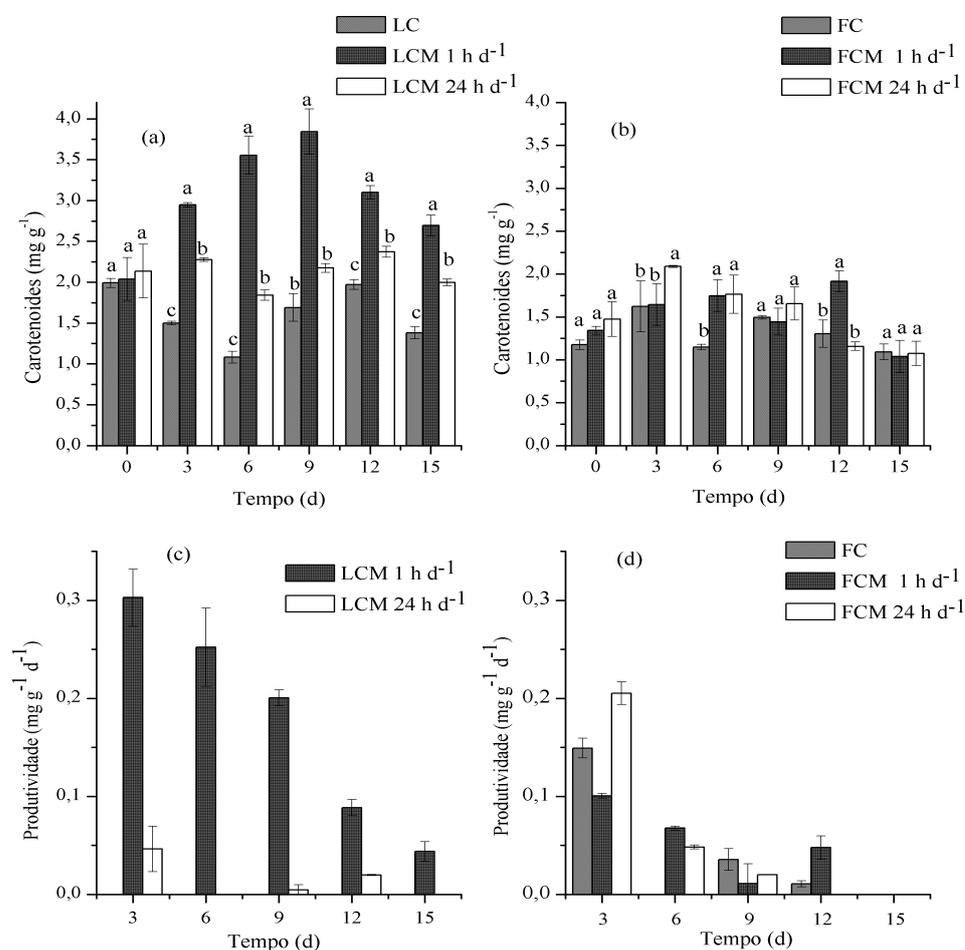
Bauer et al. (2017) relataram que a aplicação de 60 mT durante 1 h d⁻¹ em *Chlorella kessleri*, estimulou em 38,9 e 59,1 % a concentração de clorofila a e b, respectivamente, em relação aos cultivos sem aplicação. Small, Hüner e Wan (2012), com 10 mT, mais do que dobraram o conteúdo de clorofila-a e clorofila-b de *Chlorella kessleri*. Os autores relataram que a exposição ao CM aumentou a área do cloroplasto e do tilacoide. Como as clorofilas estão presentes nessas membranas e são nelas que ocorrem as reações fotossintéticas, e o CM pode influenciar em sua estrutura, essas mudanças podem ter influenciado no aumento da produção. Deamici et al. (2019) avaliaram o efeito do CM de 30 mT, durante 1 e 24 h d⁻¹, no desempenho fotossintético de *Arthrospira platensis* SAG 21.99. Os dados transientes de fluorescência de clorofila mostraram que o CM aumentou o desempenho do fotossistema II, sendo afetado positivamente, devido ao aumento do rendimento quântico.

Por consequência dos resultados apresentados, foi observado que, se desejado maior produção de clorofila com *Chlorella fusca* LEB 111, os cultivos devem ser feitos com LEDs azuis e aplicação de CM (1 ou 24 h d⁻¹).

5.3.2 Carotenoides

A Figura 9 apresenta o acompanhamento das concentrações de carotenoides, durante o cultivo de *Chlorella fusca*. Com aplicação de LEDs azuis a concentração de carotenoides variou de 1,08-3,84 mg g⁻¹ (Fig. 9a). O ensaio com CM por 1 h d⁻¹ proporcionou concentrações maiores, do que nos outros ensaios com a mesma fonte de luz, em todos os dias em que o pigmento foi determinado (exceção do dia 0). Nos cultivos com luz fluorescente (Fig. 9b), a variação de carotenoides foi de 1,04 a 2,08 mg g⁻¹. Com esta fonte de luz, nos dias 3, 6 e 12, pelo menos um dos ensaios CM afetou positivamente a concentração, em comparação ao cultivo controle. A maior produtividade obtida do cultivo com LEDs azuis (Fig. 9c) foi em 3 d (0,30 mg g⁻¹ d⁻¹), no cultivo com CM 1 h d⁻¹. Com luz fluorescente (Fig. 9d), a maior obtida foi em 3 d (0,20 mg g⁻¹ d⁻¹), no cultivo com CM 24 h d⁻¹. A eficiência do CM por 24 h d⁻¹ foi de 31,2 %. Em geral, a maior produção de carotenoides foi com LEDs azuis e aplicação de CM por 1 h d⁻¹, em 9 d (p≤0,05) de 3,84 mg g⁻¹. Neste caso ocorreu aumento de 126,2 %.

Figura 9 – Concentrações de carotenoides e produtividade ao longo dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com aplicação de campo magnético (CM) de 30 mT durante 1 e 24 h d⁻¹ e com (a) e (c) diodos emissores de luz (LEDs) azuis e (b) e (d) luz fluorescente



L: LEDs azuis; F: Fluorescente. C: Controle. Experimentos realizados com a biomassa úmida. Letras iguais, no mesmo dia, indicam que não há diferença ($p \geq 0,05$) significativa entre os ensaios pelo teste de Tukey.

Tendo em vista as particularidades de cada espécie, em termos de intensidade luminosa e combinações espectrais, avaliações de espectro são necessárias, com combinações de comprimentos de onda únicos e múltiplos revelando possíveis interações entre as diferentes respostas de absorção de pigmentos em células de microalgas. Na literatura é relatado que a cor azul, que compreende a faixa de comprimento de onda de 440 a 485 nm, corresponde a absorção de carotenoides, como o β -caroteno, e pode estimular a síntese de carotenoides (GLEMSER et al., 2016), o que pode justificar a maior produção deste pigmento em relação aos cultivos com luz fluorescente.

Logo, maior produção de carotenoides com LEDs azuis pode ser devido a mudanças que essa luz pode causar na biossíntese deste pigmento. Beel et al. (2012) estudaram os genes envolvidos na biossíntese de carotenoides da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

observaram aumento gradual durante a exposição sob luz azul. Os resultados obtidos por Li e colaboradores (2020), mostraram que a expressão constitutiva da fitoenol sintase, que catalisa a primeira etapa da via de biossíntese de carotenoides aumentou o carotenoide total e síntese de β -caroteno em espécies de *Dunaliella salina*. Sob luz azul, as duas transcrições identificadas tiveram aumento de 2-3 vezes. A atividade de enzimas já foram relatadas como afetadas por CM (ALBUQUERQUE et al., 2016), então a aplicação no cultivo pode ter afetado a biossíntese de carotenoides pela eletroativação do sistema enzimático.

O crescimento celular foi menor com LEDs azuis, em comparação a luz fluorescente, e a concentração de carotenoides foi maior. Lamers et al. (2010) comentaram que o acúmulo de β -caroteno em *Dunaliella* sp. foi acionado, principalmente, quando a taxa de divisão celular foi desacelerada ou interrompida devido ao efeito dos fatores de estresse. Entre os cultivos desse estudo, o cultivo com aplicação de LEDs azuis e CM 1 h d⁻¹ foi o que apresentou menor taxa de crescimento celular. Logo, o CM pode ter causado esse estresse que levou a maior produção deste pigmento, pois a aplicação do mesmo durante 24 h d⁻¹, nos dias 3, 6, 12 e 15, também apresentou maior concentração do que o cultivo controle.

Fu et al. (2013) comentaram que no cultivo de *Dunaliella salina*, LEDs azuis salina, levaram a diminuição do número de células e a combinação de LED azul e vermelho aumentou o acúmulo de β -caroteno. Um acúmulo de carotenoides em microalgas pode levar a diminuição da fotossíntese na extremidade azul do espectro, aparentemente absorvendo a luz azul antes que ela alcance a clorofila (BLINKS, 1954). Nezammahalleh et al. (2016) relataram que não houve mudanças significativas nos carotenoides totais do células expostas a campo elétrico (2,7 kV cm⁻¹) em diferentes intervalos de tempo de *Chlorella vulgaris*, com luz fluorescente (60 μ mol m⁻² s⁻¹). Porém, foi observado diminuição contínua de até 50 % dos carotenoides com o aumento na concentração da microalga, que pode ter sido causado pelo auto sombreamento.

Estudos relataram que a síntese de lipídios está ligada ao acúmulo de carotenoides e que essas possuem uma relação linear sob condições de estresse e que pode ocorrer a produção simultânea. Os acúmulos estão associados com a expressão de genes específicos (LIU et al., 2012, 2016; REARTE et al., 2020). Entretanto, como visto anteriormente, o teor de lipídios obtido com LEDs azuis foi na faixa de 19-24 % e não apresentou diferença estatística entre os cultivos, diferente do que aconteceu com as concentrações de carotenoides. Ou seja, apenas a concentração de pigmento aumentou devido a aplicação conjunta de CM e LEDs azuis.

Guo e Fang (2020) obtiveram 3,6 mg g⁻¹ de carotenoides utilizando LEDs azuis no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa*. As alterações dos pigmentos sintéticos na célula de microalgas sob diferentes tipos de luz são provavelmente causadas pela hipótese de que

diferentes qualidades de luz podem afetar o *turnover* intracelular e a transformação do pigmento fotossintético no interior da célula, e causar a síntese de pigmentos e degradação das células de algas. Pode ser observado que nos cultivos com LEDs, houve incremento de carotenoides até o 9º d e após, decréscimo. Kendirlioglu e Cetin (2017) observaram no cultivo de *Chlorella vulgaris* aumento de carotenoides até o 6º d.

Amaro et al. (2020) cultivaram *Scenedesmus obliquus* M2-1 com LEDs azuis e luz fluorescente ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e quantificaram os carotenoides. Assim como neste trabalho, os autores também relataram que os LEDs azuis aumentaram o teor de carotenoides, em comparação a luz fluorescente. Em 6 d, ensaios com LEDs azuis apresentaram teores 80 % maiores do que os ensaios com luz fluorescente. Já neste estudo, no mesmo dia, apresentou 50 % de incremento em comparação de uma fonte de luz para outra, corroborando com o estudo de que a luz azul causa maior influência neste pigmento. O cultivo com maior concentração de carotenoides obtido neste estudo, além da fonte de luz utilizada ter sido LEDs azuis, foi aplicado CM por 1 h d^{-1} e ambos tempos de aplicação apresentaram efeito positivo. Segundo Zhang, Yarema e Xu (2017), a aplicação de CM pode induzir interação com a membrana celular, que ativa vias de sinalização que levam ao núcleo e alteram as respostas metabólicas que podem resultar na síntese de metabólito secundário, como os carotenoides.

Neste estudo, a aplicação do CM durante 24 h d^{-1} aumentou a concentração de carotenoides, em comparação ao controle, nos ensaios com as duas fontes de luz. Small, Hüner e Wan (2012) observaram aumento no teor de clorofilas e não observaram efeito do CM (24 h d^{-1}) na concentração de carotenoides de *Chlorella kessleri* em comparação ao cultivo sem CM e luz fluorescente. Bauer et al. (2017) com *Chlorella kessleri* relataram aumento de carotenoides quando aplicado 60 mT por 1 h d^{-1} em 5, 8, 9 e 10 d, em comparação ao cultivo controle, com acúmulo maior entre 6 e 10 d.

Nos cultivos com luz fluorescente, com exceção dos dias 0, 9 e 15, o CM aumentou a concentração deste pigmento. Wang et al. (2008) não observaram nenhuma variação significativa ($p > 0,05$) no conteúdo de carotenoides totais nas células de *Chlorella vulgaris*, com luz fluorescente ($53,97 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e exposição de 10 a 50 mT. Entretanto, ocorreu aumento na atividade antioxidante e os carotenoides, em muitas ocasiões, atuam como antioxidantes. Luna et al. (2009) avaliaram o efeito de 30 mT (15, 30 e 60 min) em *Haematococcus pluvialis*, com luz fluorescente ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Ao analisar a concentração de astaxantina nas células foi observado que não foi significativamente afetada pelo CM na fase exponencial de crescimento ($p < 0,05$), e sim na fase estacionária (11 d). Esse comportamento poderia estar associado a resiliência da espécie, que se estabilizaria metabolicamente em direção à fase

estacionária, a partir de perturbação causada pelo CM. Já nos resultados obtidos neste estudo, a partir do 3º dia, ainda na fase exponencial, em ambas fontes de luz, já houve diferença significativa entre os cultivos com CM e controle.

Em síntese, o CM durante 1 e 24 h d⁻¹ aumentaram o acúmulo de carotenoides nos ensaios com LEDs azuis e luz fluorescente de *Chlorella fusca* LEB 111. O ensaio com LEDs azuis e CM por 1 h d⁻¹ foi o mais promissor para a produção deste pigmento.

5.4 EFICIÊNCIA ENERGÉTICA

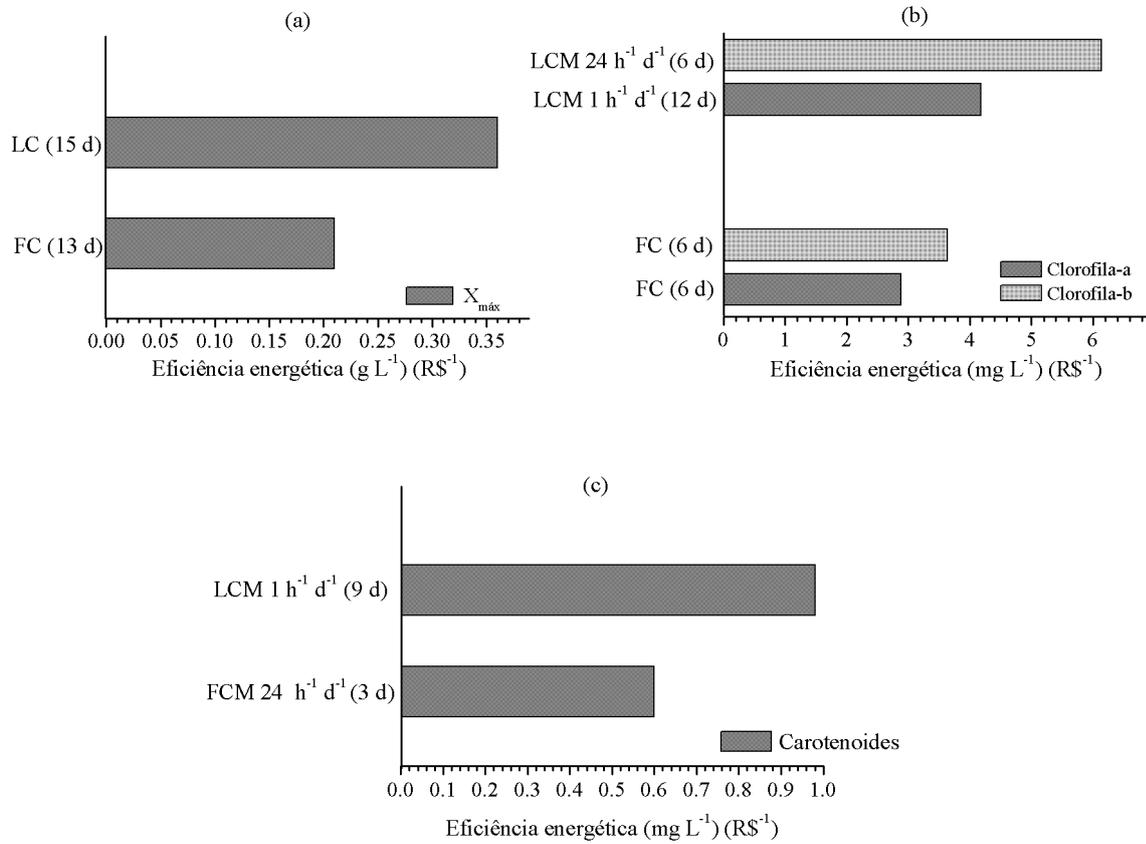
A eficiência energética foi calculada, a fim de comparar as duas fontes de luz utilizadas no estudo. Com as melhores condições já definidas, foram calculadas as eficiências para os cultivos que apresentaram os resultados mais promissores de biomassa e pigmentos. A Figura 10 apresenta a eficiência energética da produção máxima de biomassa ($X_{máx}$), concentrações de clorofila e carotenoides obtidos dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111.

Pode ser observado na Figura 10a que os LEDs azul tiveram maior eficiência de energia para a biomassa, de 0,36 g L⁻¹ R\$⁻¹, em comparação com a luz fluorescente que foi 0,21 g L⁻¹ (R\$⁻¹). Como apresentado anteriormente, a luz fluorescente (cultivo controle) proporcionou crescimento maior do que a luz de LEDs azuis (cultivo controle), entretanto menor eficiência de conversão energética.

Os cultivos com LEDs azuis apresentaram maior eficiência energética para clorofila a e b e carotenoides, conforme pode ser observado na Fig. 10b e 10c, respectivamente. Logo, além dos pigmentos com LEDs azuis apresentarem concentrações maiores do que com luz fluorescente, também possuem maior eficiência energética.

Loganathan et al. (2020) também relataram que LEDs azuis tiveram a maior eficiência econômica. A luz fluorescente teve maior produtividade de biomassa no cultivo consórcio de *Chlorella variabilis* e *Scenedesmus obliquus*, porém foi considerada a menor eficiência econômica devido ao aumento do consumo de eletricidade necessário para produzir a intensidade de luz necessária. Okumura et al. (2014) observaram que utilizando LEDs azuis no cultivo teve eficiência energética 12 vezes maior do que a condição com luz fluorescente nos cultivos de *Botryococcus braunii*, na produção de biomassa. Logo, o uso de LEDs azuis pode ser uma alternativa econômica no cultivo de microalgas.

Figura 10 – Eficiência energética da (a) produção máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$) e dos maiores valores obtidos para (b) clorofila e (c) carotenoides, nos ensaios com luz fluorescente e diodos emissores de luz (LEDs) azuis nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111



L: LEDs azuis; F: Fluorescente; C: Controle. CM: campo magnético.

6 RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Os resíduos gerados foram acondicionados em frasco âmbar separadamente, identificados e acondicionados em local separado para resíduos no laboratório de Biotecnologia. Os mesmos foram recolhidos e encaminhados a empresa responsável por fazer o descarte.

7 CONCLUSÃO

Todos os cultivos com luz fluorescente apresentaram maior crescimento celular, comparado com os cultivos com LEDs azuis. Nos cultivos com luz fluorescente foi obtido $X_{\text{máx}}$ de $2,54 \text{ g L}^{-1}$ e $P_{\text{máx}}$ de $0,24 \text{ g L d}^{-1}$ no cultivo controle, sem diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os demais ensaios, com a mesma fonte de luz. O cultivo controle com LEDs azuis apresentou $X_{\text{máx}}$ de $1,7 \text{ g L}^{-1}$ e $P_{\text{máx}}$ de $0,20 \text{ g L d}^{-1}$, enquanto nos cultivos com aplicação de CM a concentração de biomassa foi menor. O efeito do CM na caracterização da biomassa foi nulo ou negativo, com exceção do teor de proteína no cultivo com luz fluorescente. O resultado mais promissor de carboidratos (32,7 %) e lipídios (29,3 %) foi no cultivo controle com luz fluorescente e de proteínas (54,8 %) foi no cultivo controle de LEDs azuis.

A aplicação de CM e LEDs azuis promoveram o acúmulo de pigmentos, comparando-se com os cultivos com luz fluorescente e sem aplicação de CM. A maior concentração de clorofila-a foi $16,13 \text{ mg g}^{-1}$ no cultivo com CM por 1 h d^{-1} , clorofila-b foi $20,27 \text{ mg g}^{-1}$ com CM por 24 h d^{-1} e carotenoides foi $3,84 \text{ mg g}^{-1}$, com CM por 1 h d^{-1} .

Em relação a eficiência energética, avaliada nos cultivos nos quais foram obtidos os melhores resultados, pode-se observar que os LEDs azuis apresentaram maior eficiência energética do que a luz fluorescente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed Gaithersburg, MD, USA, 2000.

ALBUQUERQUE, W. W. C.; COSTA, R. M. P. B.; SALAZAR E FERNANDES, T.; PORTO, A. L. F. Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 121, n. 1, p. 16–28, 2016.

ALI, H. E. A.; EL-FAYOUMY, E. A.; RASMY, W. E.; SOLIMAN, R. M.; ABDULLAH, M. A. Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 1, p. 227–239, 2020.

AMARO, H. M.; PAGELS, F.; AZEVEDO, I. C.; AZEVEDO, J.; SOUSA PINTO, I.; MALCATA, F. X.; GUEDES, A. C. Light-emitting diodes—a plus on microalgae biomass and high-value metabolite production. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 6, p. 3605–3618, 2020.

ASUTHKAR, M.; GUNTI, Y.; RAO, R. S.; RAO, C. S.; YADAVALLI, R. Effect of Different Wavelengths of Light on the Growth of *Chlorella pyrenoidosa*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 2, p. 847–851, 2016.

ATTA, M.; IDRIS, A.; BUKHARI, A.; WAHIDIN, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 373–378, 2013.

BABA, M.; KIKUTA, F.; SUZUKI, I.; WATANABE, M. M.; SHIRAIWA, Y. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 266–270, 2012.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; DA ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425–1432, 2017.

BEEL, B.; PRAGER, K.; SPEXARD, M.; SASSO, S.; WEISS, D.; MÜLLER, N.; HEINNICKEL, M.; DEWEZ, D.; IKOMA, D.; GROSSMAN, A. R.; KOTTKE, T.; MITTAGA, M. A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Cell**, v. 24, n. 7, p. 2992–3008, 2012.

BEGUM, H.; YUSOFF, F. M. D.; BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 13, p. 2209–2222, 2016.

BEZERRA, P. Q. M.; MATOS, M. F. R. DE; RAMOS, I. G.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DRUZIAN, J. I.; COSTA, J. A. V.; NUNES, I. L. Innovative functional nanodispersion: Combination of carotenoid from *Spirulina* and yellow passion fruit albedo. **Food Chemistry**, v. 285, p. 397–405, 2019.

BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial xanthophylls. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 68, n. 4, p. 445–455, 2005.

BLINKS, L. R. the Photosynthetic Function of Pigments. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 5, n. 14, p. 93–114, 1954.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743–756, 2013.

CANLI, O.; ERDAL, S.; TASKIN, M.; KURBANOGLU, E. B. Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 1, p. 35–39, 2011.

CASSURIAGA, A. P. A.; FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Innovative polyhydroxybutyrate production by *Chlorella fusca* grown with pentoses. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 456–463, 2018.

CEZARE-GOMES, E. A.; MEJIA-DA-SILVA, L. DEL C.; PÉREZ-MORA, L. S.; MATSUDO, M. C.; FERREIRA-CAMARGO, L. S.; SINGH, A. K.; DE CARVALHO, J. C. M. Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 602–634, 2019.

CHANDRA, R.; AMIT; GHOSH, U. K. Effects of various abiotic factors on biomass growth and lipid yield of *Chlorella minutissima* for sustainable biodiesel production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 4, p. 3848–3861, 2019.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 510–516, 2012.

CHEN, M.; BLANKENSHIP, R. E. Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 8, p. 427–431, 2011.

CHEN, X.; GOH, Q. Y.; TAN, W.; HOSSAIN, I.; CHEN, W. N.; LAU, R. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6005–6012, 2011.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. V. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, v. 98, p. 64–71, 2016.

CHOI, B.; LIM, J. H.; LEE, J.; LEE, T. Optimum conditions for cultivation of *Chlorella* sp. FC-21 using light emitting diodes. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 8, p. 1614–1619, 2013.

CHONG, J. F.; FADHULLAH, W.; LIM, V.; LEE, C. K. Two-stage cultivation of the marine microalga *Chlorella salina* for starch and carbohydrate production. **Aquaculture International**, v. 27, n. 5, p. 1269–1288, 2019.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENASA, I.; FLOROU-PANERIA, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 1, p. 5–11, 2013.

CHU, F. J.; WAN, T. J.; PAI, T. Y.; LIN, H. W.; LIU, S. H.; HUANG, C. F. Use of magnetic fields and nitrate concentration to optimize the growth and lipid yield of *Nannochloropsis oculata*. **Journal of Environmental Management**, v. 253, p. 109680, 2020.

COOKSON, N. A.; COOKSON, S. W.; TSIMRING, L. S.; HASTY, J. Cell cycle-dependent variations in protein concentration. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 8, p. 2676–2681, 2009.

COSTA, S. S.; PERES, B. P.; MACHADO, B. R.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Increased lipid synthesis in the culture of *Chlorella homosphaera* with magnetic fields application. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123880, 2020.

D’ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832–841, 2016.

DAMERGI, E.; SCHWITZGUÉBEL, J.; REFARDT, D.; SHARMA, S.; HOLLIGER, C.; LUDWIG, C. Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. **Algal Research**, v. 25, p. 488–495, 2017.

DANESHVAR, E.; SIK OK, Y.; TAVAKOLI, S.; SARKAR, B.; SHAHEEN, S. M.; HONG, H.; LUO, Y.; RINKLEBE, J.; SONG, H.; BHATNAGAR, A. Insights into upstream processing of microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 124870, 2021.

DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M. R. Photosynthesis under artificial light: The shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, p. 20130243, 2014.

DE 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.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DEAMICI, K. M.; CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; MUYLAERT, K.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Quantum yield alterations due to the static magnetic fields action on *Arthrospira platensis* SAG 21.99: Evaluation of photosystem activity. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121945, 2019.

DEAMICI, K. M.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields as triggers of microalga growth: evaluation of its effect on *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 62–67, 2016.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Use of static magnetic fields to increase CO₂ biofixation by the microalga *Chlorella fusca*. **Bioresource Technology**, v. 276, p. 103–109, 2019.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field as promoter of growth in outdoor and indoor assays of *Chlorella fusca*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 7, p. 1453–1460, 2021.

DI LENA, G.; CASINI, I.; LUCARINI, M.; LOMBARDI-BOCCIA, G. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. **Food Research International**, v. 120, p. 810–818, 2019.

DINI, L.; ABBRO, L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron**, v. 36, n. 3, p. 195–217, 2005.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1242–1245, 2018.

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.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 389–406, 2005.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAROTY, G. S. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. **Journal of Aquatic Science**, v. 1, n. 1, p. 11–23, 2013.

EL-SHEEKH, M. M.; MORSI, H. H.; HASSAN, L. H. S. Assessment of the optimum growth medium and the effect of different light intensities on growth and photosynthetic pigments of *Chlorella vulgaris* and *scenedesmus arvernensis*. **Egyptian Journal of Botany**, v. 60, n. 2, p. 395–404, 2020.

FARAONE, I.; SINISGALLI, C.; OSTUNI, A.; ARMENTANO, M. F.; CARMOSINO, M.; MILELLA, L.; RUSSO, D.; LABANCA, F.; KHAN, H. Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: A systematic review. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104689, 2020.

FENG, X.; CHEN, Y.; LV, J.; HAN, S.; TU, R.; ZHOU, X.; JIN, W.; REN, N. Enhanced lipid production by *Chlorella pyrenoidosa* through magnetic field pretreatment of wastewater and treatment of microalgae-wastewater culture solution: Magnetic field treatment modes and conditions. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123102, 2020.

FOLOGEA, D. Increase of *Saccharomyces cerevisiae* plating efficiency after treatment with bipolar electric pulses. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, p. 285–287, 1998.

FRADIQUE, MÓNICA; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656–1664, 2010.

FU, W.; GUOMUNDSSON, Ó.; PAGLIA, G.; HERJÓLFSSON, G.; ANDRÉSSON, Ó. S.; PALSSON, B. O.; BRYNJÓLFSSON, S. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2395–2403, 2013.

GEADA, P.; RODRIGUES, R.; LOUREIRO, L.; PEREIRA, R.; FERNANDES, B.;

TEIXEIRA, J. A.; VASCONCELOS, V.; VICENTE, A. A. Electrotechnologies applied to microalgal biotechnology – Applications, techniques and future trends. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 656–668, 2018.

GENÇ, Y.; BARDAKCI, H.; YÜCEL, Ç.; KARATOPRAK, G. Ş.; AKKOL, E. K.; BARAK, T. H.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E. Oxidative stress and marine carotenoids: Application by using nanoformulations. **Marine Drugs**, v. 18, n. 8, 2020.

GLEMSER, M.; HEINING, M.; SCHMIDT, J.; BECKER, A.; GARBE, D.; BUCHHOLZ, R.; BRÜCK, T. Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1077–1088, 2016.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 8, p. 1396–1412, 2016.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; SOUSA, J. M.; MOURA, P.; BANDARRA, N. M. Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 2, p. 21–37, 2010.

GUCCIONE, A.; BIONDI, N.; SAMPIETRO, G.; RODOLFI, L.; BASSI, N.; TREDICI, M. R. *Chlorella* for protein and biofuels: From strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625–644, 2011.

GUO, H.; FANG, Z. Effect of light quality on the cultivation of *Chlorella pyrenoidosa*. **E3S Web of Conferences**, v. 143, p. 1–6, 2020.

GUO, S. Y.; LI, Z. Y.; LI, L.; CAI, M. Y.; ZHENG, B. S. Cultivation of *Spirulina platensis* with a Magnetic Field Treatment. **Journal of South China University of Technology**, v. 30, n. 11, p. 49–50, 2002.

HALIM, R.; HOSIKIAN, A.; LIM, S.; DANQUAH, M. K. Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–11, 2010.

HO, S. H.; YE, X.; HASUNUMA, T.; CHANG, J. S.; KONDO, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae - A critical review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1448–1459, 2014.

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.

HUO, S.; CHEN, X.; ZHU, F.; ZHANG, W.; CHEN, D.; JIN, N.; COBB, K.; CHENG, Y.; WANG, L.; RUAN, R. Magnetic field intervention on growth of the filamentous microalgae *Tribonema* sp. in starch wastewater for algal biomass production and nutrients removal: Influence of ambient temperature and operational strategy. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122884, 2020.

HUSS, V. A. R.; SOGIN, M. L. Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 31, n. 5, p. 432–442, 1990.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 631–635, 2000.

JAUBERT, M.; BOULY, J. P.; RIBERA D'ALCALÀ, M.; FALCIATORE, A. Light sensing and responses in marine microalgae. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 37, p. 70–77, 2017.

KENDIRLIOGLU, G.; KADRI CETIN, A. Effect of different wavelengths of light on growth, pigment content and protein amount of *Chlorella vulgaris*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 7974–7980, 2017.

KHALILI, A.; NAJAFPOUR, G. D.; AMINI, G.; SAMKHANIYANI, F. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 20, n. 2, p. 284–290, 2015.

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Food and Bioprocess Processing**, v. 110, p. 60–84, 2018.

KIM, D. G.; LEE, C.; PARK, S. M.; CHOI, Y. E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 240–248, 2014.

KIRAN, B. R.; MOHAN, S. V. Photosynthetic transients in *Chlorella sorokiniana* during phycoremediation of dairy wastewater under distinct light intensities. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125593, 2021.

KIRSCHVINK, J. L. Uniform magnetic fields and double-wrapped coil systems: Improved techniques for the design of bioelectromagnetic experiments. **Bioelectromagnetics**, v. 13, n. 5, p. 401–411, 1992.

KOÇ, C.; ANDERSON, G. A. Use of RGB LEDs and Fluorescents Lamps as Light Sources to Grow Microalgae in a Photo-Bio Reactor (PBR). **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 3, p. 1–10, 2010.

KONG, W.; YANG, S.; WANG, H.; HUANRAN, H.; BAOMIN, G.; NA, L.; AIMEI, Z.; SHIQUAN, N. Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 1569–1579, 2020.

LAMERS, P. P.; VAN DE LAAK, C. C. W.; KAASENBROOD, P. S.; LORIER, J.; JANSSEN, M.; DE VOS, R. C. H.; BINO, R. J.; WIJFFELS, R. H. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, n. 4, p. 638–648, 2010.

LARKUM, A. W. Photosynthesis and Light Harvesting in Algae. In: **The Physiology of Microalgae**. Netherlands: Springer, 2016. p. 67–87.

- LEE, O. K.; OH, Y. K.; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 22–27, 2015.
- LI, D.; YUAN, Y.; CHENG, D.; ZHAO, Q. Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121783, 2019.
- LI, X.; MANUEL, J.; SLAVENS, S.; CRUNKLETON, D. W.; JOHANNES, T. W. Interactive effects of light quality and culturing temperature on algal cell size, biomass doubling time, protein content, and carbohydrate content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 587–597, 2021.
- LI, Y.; CAI, X.; GU, W.; WANG, G. Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* under red and blue light. **Journal of Oceanology and Limnology**, v. 38, n. 1, p. 177–185, 2020.
- 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.
- LIU, J.; HUANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, F. Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 393–398, 2012.
- LIU, J.; MAO, X.; ZHOU, W.; GUARNIERI, M. T. Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 319–327, 2016.
- LOGANATHAN, B. G.; ORSAT, V.; LEFSRUD, M.; WU, B. SEN. A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1445–1455, 2020.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.
- LUNA, L. G.; MENÉNDEZ, J.; ÁLVAREZ, I.; FLORES, I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. **Biotecnología Vegetal**, v. 9, n. 2, p. 105–117, 2009.
- 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.
- MARKOU, G. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. **Applied**

Biochemistry and Biotechnology, v. 172, n. 5, p. 2758–2768, 2014.

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.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 5, p. 20–38, 2010.

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, 2010.

MATTHIJS, H. C. P.; BALKE, H.; VAN HES, U. M.; KROON, B. M. A.; MUR, L. R.; BINOT, R. A. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 1, p. 98–107, 1996.

MENESTRINO, B. C.; PINTOS, T. H. C.; SALA, L.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Application of static magnetic fields on the mixotrophic culture of *Chlorella minutissima* for carbohydrate production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, p. 822–830, 2020.

MÖGLICH, A.; YANG, X.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and function of plant photoreceptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 21–47, 2010.

MOHSENPOUR, S. F.; WILLOUGHBY, N. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 147–153, 2013.

MOSQUEDA, M. A. R.; ANDREU, L. G. I.; AGUILAR, J. R. B. The Effect of Light Quality on Growth and Development of In Vitro Plantlet of *Stevia rebaudiana Bertonii*. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331–336, 2017.

MOTTA, M. A.; FERREIRA MUNIZ, J. B.; SCHULER, A.; MOTTA, M. Static Magnetic Fields Enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanolic Fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 393–396, 2004.

NEGRO, J. J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 126, n. 3, p. 347–352, 2000.

NEZAMMAHALLEH, H.; GHANATI, F.; ADAMS, T. A.; NOSRATI, M.; SHOJAOSADATI, S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 700–711, 2016.

OGBONNA, J. C.; NWEZE, N. O.; OGBONNA, C. N. Effects of light on cell growth , chlorophyll , and carotenoid contents of *Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus falcatus* in poultry dropping medium. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 157–163, 2021.

OKUMURA, C.; SAFFREENA, N.; RAHMAN, A.; HASEGAWA, H.; MIKI, O.; TAKIMOTO, A. Economic Efficiency of Different Light Wavelengths and Intensities Using

LEDs for the Cultivation of Green Microalga *Botryococcus braunii* (NIES-836) for Biofuel Production. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 33, n. 3, p. 676–680, 2014.

OTHMAN, R.; NOH, N.; NURRULHIDAYAH, A. F.; ANIS AMIZAH, H.; JAMALUDIN, M. A. Determination of natural carotenoid pigments from freshwater green algae as potential halal food colorants. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 468–471, 2017.

PELAH, D.; SINTOV, A.; COHEN, E. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 483–486, 2004.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G.; IBÁ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 450–455, 2010.

PRATES, D. DA F.; RADMANN, E. M.; DUARTE, J. H.; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 38–43, 2018.

RA, C.; KANG, C.; JUNG, J.; JEONG, G.; KIM, S. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 254–261, 2016.

RAI, M. P.; GAUTOM, T.; SHARMA, N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 4, p. 260–267, 2015.

REARTE, T. A.; FIGUEROA, F. L.; GÓMEZ-SERRANO, C.; VÉLEZ, C. G.; MARSILI, S.; IORIO, A. DE F.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; ABDALA-DÍAZ, R. T.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G. Optimization of the production of lipids and carotenoids in the microalga *Golenkinia aff. brevispicula*. **Algal Research**, v. 51, n. July, p. 102004, 2020.

RENDÓN, S. M.; ROLDAN, G. J. C.; VORONEY, R. P. . Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth Response of *Chlorella vulgaris* Under Four Different Led Illumination. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, p. 125–131, 2013.

REPACHOLI, M. H.; GREENEBAUM, B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: Health effects and research needs. **Bioelectromagnetics**, v. 20, n. 3, p. 133–160, 1999.

RIAL, P.; GARRIDO, L.; JAEN, D.; RODRÍGUEZ, F. Pigment composition in three *Dinophysis* species (Dinophyceae) and the associated cultures of *Mesodinium rubrum* and *Teleaulax amphioxeia*. **Journal of Plankton Research**, v. 35, p. 433–437, 2013.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. 2^a ed. Chichester: Wiley, 2013.

- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.
- RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, 2018.
- RODRIGUES, D. B.; FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, p. 144–148, 2014.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. . M. K. **HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis**. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute and International Center for Tropical Agriculture, 2004.
- SAHEBJAMEI, H.; ABDOLMALEKI, P.; GHANATI, F. Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of suspension-cultured *tobacco* cells. **Bioelectromagnetics**, v. 28, n. 1, p. 42–47, 2007.
- SANTOS, L. O.; ALEGRE, R. M.; GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1362–1367, 2010.
- SANTOS, L. O.; DEAMICI, K. M.; MENESTRINO, B. C.; GARDA-BUFFON, J.; COSTA, J. A. V. Magnetic treatment of microalgae for enhanced product formation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 1–6, 2017.
- SCHULZE, P. S. C.; BARREIRA, L. A.; PEREIRA, H. G. C.; PERALES, J. A.; VARELA, J. C. S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014.
- SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; KHOEYI, Z. A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, p. 721–726, 2011.
- SHAO, W.; EBAID, R.; ABOMOHRRA, A. E. F.; SHAHEN, M. Enhancement of *Spirulina* biomass production and cadmium biosorption using combined static magnetic field. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 163–169, 2018.
- SHI, X. M.; JIANG, Y.; CHEN, F. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 4, p. 723–727, 2002.
- SHU, C. H.; TSAI, C. C.; LIAO, W. H.; CHEN, K. Y.; HUANG, H. C. Effects of light quality on the accumulation of oil in a mixed culture of *Chlorella* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 601–607, 2012.
- SILVA, P. G. P. DA; PRESCENDO JÚNIOR, D.; SALA, L.; BURKERT, J. F. DE M.; SANTOS, L. O. Magnetic field as a trigger of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. **Process Biochemistry**, v. 98, n. August, p. 131–138, 2020.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431–444, 2015.

SINGH, S. S.; TIWARI, S. P.; ABRAHAM, J.; RAI, S.; RAI, A. K. Magnetobiological effects on a cyanobacterium, *Anabaena doliolum*. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 13, n. 3, p. 227–235, 1994.

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.

TANG, H.; WANG, P.; WANG, H.; FANG, Z.; YANG, Q.; NI, W.; SUN, X.; LIU, H.; WANG, L.; ZHAO, G.; ZHENG, Z. Effect of static magnetic field on morphology and growth metabolism of *Flavobacterium* sp. m1-14. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 2019.

TENG, H. C. A Puzzle of the Effect of Magnetic Field on Biological Cells. **Life Science Journal**, v. 2, n. 1, 2005.

TEO, C. L.; ATTA, M.; BUKHARI, A.; TAISIR, M.; YUSUF, A. M.; IDRIS, A. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 38–44, 2014.

TU, R.; JIN, W.; XI, T.; YANG, Q.; HAN, S. F.; ABOMOHRRA, A. E. F. Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. **Water Research**, v. 86, p. 132–138, 2015.

VEIGA, M. C.; FONTOURA, M. M.; DE OLIVEIRA, M. G.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Magnetic fields: biomass potential of *Spirulina* sp. for food supplement. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1231–1240, 2020.

WAHIDIN, S.; IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 7–11, 2013.

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.

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, 2014.

WEI, D.; CHEN, F.; CHEN, G.; ZHANG, X. W.; LIU, L. J.; ZHANG, H. Enhanced production of lutein in heterotrophic *Chlorella protothecoides* by oxidative stress. **Science in China, Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 12, p. 1088–1093, 2008.

XIE, Y.; LI, J.; MA, R.; HO, S. H.; SHI, X.; LIU, L.; CHEN, J. Bioprocess operation strategies with mixotrophy/photoinduction to enhance lutein production of microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60. **Bioresource Technology**, v. 290, n. June, p. 121798, 2019.

XU, Y.; IBRAHIM, I. M.; HARVEY, P. J. The influence of photoperiod and light intensity on

the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 305–315, 2016.

YANG, G.; WANG, J.; MEI, Y.; LUAN, Z. Effect of Magnetic Field on Protein and Oxygen-production of *Chlorella vulgaris*. **Mathematical and Physical Fisheries Science**, v. 9, p. 116–126, 2011.

YOUNG, A. J. Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. **Carotenoids in Photosynthesis**, n. 1980, p. 16–71, 1993.

YUAN, H.; ZHANG, X.; JIANG, Z.; WANG, X.; WANG, Y.; CAO, L.; ZHANG, X. Effect of light spectra on microalgal biofilm: Cell growth, photosynthetic property, and main organic composition. **Renewable Energy**, v. 157, p. 83–89, 2020.

YUNOS, F. H. M.; NASIR, N. M.; WAN JUSOH, H. H.; KHATOON, H.; LAM, S. S.; JUSOH, A. Harvesting of microalgae (*Chlorella* sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 124, p. 243–249, 2017.

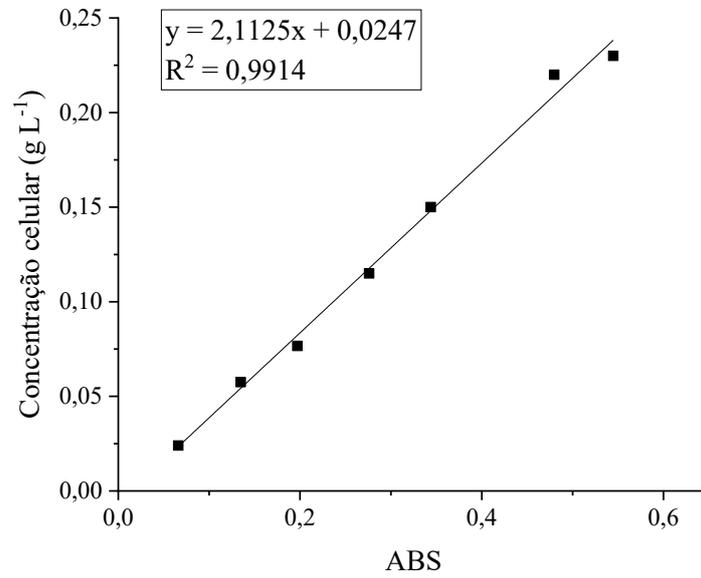
ZHANG, P.; LI, Z.; LU, L.; XIAO, Y.; LIU, J.; GUO, J.; FANG, F. Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 181, p. 30–38, 2017.

ZHANG, X.; YAREMA, K.; XU, A. Impact of Static Magnetic Field (SMF) on Microorganisms, Plants and Animals. In: **Biological Effects of Static Magnetic Fields**. Springer ed. Singapore: Springer, 2017. p. 1–220.

ZHONG, Y.; JIN, P.; CHENG, J. J. A comprehensive comparable study of the physiological properties of four microalgal species under different light wavelength conditions. **Planta**, v. 248, p. 489–498, 2018.

ZHOU, J. Z. K.; GAO, L. W. M. Extremely low-frequency magnetic fields affect pigment production of *Monascus purpureus* in liquid-state fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 157–162, 2014.

APÊNDICE

Figura A 1 – Curva padrão da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 utilizada neste trabalho**Figura A 2** – Espectro de varredura (λ 400-500) para a amostra de carotenoides de *Chlorella fusca* LEB 111