

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica

Investigando *Chlorolobion braunii* em escala laboratorial: uma abordagem fisiológica para o entendimento do efeito sinérgico de cobre e LEDs branco/azul/vermelho na síntese de biomoléculas

Julia Bolli

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Botânica

Investigando *Chlorolobion braunii* em escala laboratorial: uma abordagem fisiológica para o entendimento do efeito sinérgico de cobre e LEDs branco/azul /vermelho na síntese de biomoléculas

Julia Bolli

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como pré-requisito à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Ana Teresa Lombardi

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Adriana, cujo investimento na minha educação, encorajamento e suporte durante toda minha vida foram fundamentais, e à minha irmã, Sofia, pelo apoio e companheirismo incondicional. Agradeço por todo o amor, paciência e compreensão ao longo dessa jornada.

Agradecimentos

À minha mãe, Adriana Vieira Cerri, e minha irmã, Sofia Vieira Corrêa, por acreditarem no meu potencial.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Teresa Lombardi, por ter me proporcionado a oportunidade de aprender e contribuir para a pesquisa no Laboratório de Biotecnologia de Algas, pelo investimento de seu tempo e conhecimento em meu crescimento profissional e pessoal, e pelo companheirismo nos desafios e nas conquistas dentro e fora do laboratório.

À Dr^ª. Jaqueline Carmo da Silva, cujo comprometimento e dedicação em me ajudar a alcançar meus objetivos acadêmicos foram verdadeiramente fundamentais e inspiradores. Obrigada por ser não apenas uma excelente orientadora, mas também uma amiga.

Ao Leonardo Murilo Aoyagi, por sua disposição, apoio e contribuição cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À República Lótus, pelo acolhimento, por estarem sempre presentes, compartilhando momentos divertidos e me apoiando nas fases desafiadoras.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Algas pela companhia e toda a ajuda durante o projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos n^o 2021/13817-1 (bolsa de estudos) e 2018/07988-5 (projeto temático).

Resumo

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes com ampla biodiversidade e plasticidade fisiológica, sendo os produtores primários nos ecossistemas aquáticos. Apresentam importante papel ecológico, na medida que contribuem para o equilíbrio da cadeia alimentar nesses ambientes e para manutenção das condições climáticas, devido à atividade exercida na mitigação biológica do CO₂. Através das respostas fisiológicas e metabólicas frente às variações do ambiente, a composição bioquímica das microalgas pode ser alterada, fazendo do metabolismo algal uma importante ferramenta biotecnológica para otimizar a produção de biomassa e potencializar a síntese de biomoléculas de alto valor agregado, como lipídeos, carboidratos, proteínas e carotenoides. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do elemento cobre (Cu) e luzes LED de cores branca, azul (λ 420-470 nm) e vermelha (λ 660 nm) nos parâmetros de crescimento, fotossintéticos, e produção de biomoléculas da microalga *Chlorolobion braunii*. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de bancada, com Cu em concentração de relevância ambiental ($5,0 \times 10^{-7}$ mol.L⁻¹). Foram monitorados os parâmetros de crescimento, para os quais maiores taxas de crescimento foram obtidas sob luzes branca e azul ($\sim 1,0$ d⁻¹), do que sob vermelha ($\sim 0,75$ d⁻¹). Os parâmetros fotossintéticos de rendimento quântico máximo e efetivo, e decaimento fotoquímico não foram afetados pelas manipulações, enquanto o decaimento não fotoquímico (NPQ) foi maior sob as cores de luz branca e azul ($\sim 0,3$), do que sob a vermelha ($\sim 0,2$). Observou-se o efeito hormese na produção de proteínas na combinação de luz vermelha e cobre adicional, a qual elevou o teor de proteínas em $\sim 165\%$ em relação ao controle na mesma cor de luz. Os resultados bioquímicos mostraram que a adição de cobre favoreceu a síntese de biomoléculas, com destaque para a produção de óleos, os quais compuseram 80% da biomassa seca (BS), sugerindo o papel de lipídeos como reserva energética preferencial em *Chlorolobion braunii*, o que a torna uma microalga promissora para o setor energético.

Palavras-chave: Microalgas, biomoléculas, fotossíntese.

Lista de Figuras

Figura 1. Curvas de crescimento em função do tempo experimental (dias) em culturas de *C. braunii*. a) Densidade populacional (\ln [células/mL]); b) Concentração de clorofila *a* (mg/L).

Figura 2. Taxas de crescimento (d^{-1}) e biomassa seca (mg/L) em 96 h para todos os tratamentos.

Figura 3. Valores de pH nos cultivos de *C. braunii* durante o período experimental (96 h).

Figura 4. Porcentagem de biomoléculas na biomassa seca (BS). a) Carboidratos; b) Proteínas; c) Lipídeos.

Figura 5. Pigmentos apresentados como porcentagem da biomassa seca.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Rendimentos quânticos máximo (Φ_M) e efetivo (Φ'_M), decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímicos (NPQ) em 96 h de experimento.

Sumário

1. Introdução	8
2. Revisão Bibliográfica	10
3. Objetivos	14
4. Materiais e Métodos	15
4.1. Condições de cultivo	15
4.2. Manipulação bioquímica com cobre e cores de LEDs	15
4.3. Parâmetros de crescimento	16
4.4. Parâmetros fotossintéticos	16
4.5. pH	17
4.6. Composição bioquímica	17
4.7. Análise dos dados	18
5. Resultados	18
5.1. Parâmetros de crescimento	18
5.2. Parâmetros fotossintéticos e pH do cultivo	19
6.3. Composição bioquímica	21
6. Discussão	23
6.1. Parâmetros de crescimento	23
6.2. Parâmetros fotossintéticos	24
6.3. Composição bioquímica	25
7. Conclusões	29
8. Referências	30

1. Introdução

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes de extensa biodiversidade, com número incerto de espécies, mas que foi estimado entre 30.000 e 1.000.000 (BARKIA *et al.*, 2019; DOLGANYUK *et al.*, 2020). Essa variedade contribui para o emprego potencial da sua biomassa em diversos setores industriais, visto que representam uma fonte natural de compostos. Algumas características desses organismos os fazem particularmente interessantes para a indústria, sendo elas a composição bioquímica, rápido crescimento, tolerância a diferentes formas de cultivo, além de constituírem uma fonte de energia sustentável devido à conversão de carbono atmosférico, luz e água em energia armazenada na forma de biomoléculas (LIM e SCHENK, 2017; RUMIN *et al.*, 2020).

O interesse biotecnológico acerca das microalgas se deve à plasticidade da sua fisiologia, que possibilita alterações na composição bioquímica das células dependendo das condições de cultivo (BARACHO *et al.*, 2019; DOLGANYUK *et al.*, 2020). A síntese de biomoléculas específicas pode ser direcionada a partir de manipulações na cultura, principalmente por meio de fatores abióticos, como temperatura, salinidade, cor de luz, pH, fonte de carbono, nutrientes disponíveis e demais compostos do meio, como a presença de metais, que influenciarão nas características da biomassa (MIAZEK *et al.*, 2015; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2021).

Essenciais para o metabolismo celular das microalgas, os micronutrientes são envolvidos em diversas funções celulares e atividades enzimáticas, e podem influenciar também a morfologia celular (DEBELIUS *et al.*, 2009; LOMBARDI e MALDONADO, 2011; MIAZEK *et al.*, 2015). Dentre os metais, o cobre (Cu) é um micronutriente associado a processos fisiológicos e metabólicos como divisão celular e fotossíntese. Em concentrações acima das ambientalmente relevantes, o cobre pode ser tóxico às microalgas (ROCHA *et al.*, 2016; SILVA, ECHEVESTE, LOMBARDI, 2018; BARACHO *et al.*, 2019). Efeitos intracelulares resultantes da adição de Cu no meio de cultura mostram alterações na composição bioquímica e modificam atividades metabólicas. BARACHO *et al.* (2019) observaram que a microalga, Chlorophyta de água doce, *Chlorolobion braunii*, teve a produção de lipídeos aumentada em 8x com adição de $5,7 \times 10^{-9}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ de Cu no meio de cultura, enquanto carboidratos totais em 15x e proteínas em 13x.

A produção de microalgas em escala ampliada passa ainda por problemas relacionados ao custo e, por isso, aumentar o rendimento de biomoléculas por unidade de massa algal pode ser uma maneira eficiente de viabilizar uma relação custo/benefício favorável. A interferência

de fatores físicos, como qualidade da luz, associados a fatores químicos, como concentrações de metais, altera as características da cultura algal, podendo colaborar para maior rendimento de biomassa e biomoléculas, além de influenciar a qualidade destas (CHELONI, COSIO e SLAVEYKOVA, 2014; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2021). Desse modo, manipulações bioquímicas podem viabilizar a produção de microalgas em larga escala devido à possibilidade de maior rendimento de bioprodutos por unidade de massa produzida.

A utilização do Cu como ferramenta para o aumento de biomoléculas, pressupõe que em uma certa concentração do elemento, há maior produção de biomoléculas junto à manutenção ou pouca variação na taxa de crescimento, aumentando assim o rendimento de biomoléculas (BARACHO *et al.*, 2019). Utilizando concentrações de Cu de relevância ambiental, Echeveste *et al.* (2017), Wan *et al.* (2018), Silva *et al.* (2018), e Alho *et al.* (2020) obtiveram o estímulo necessário para a produção de biomoléculas e manutenção ou aumento da taxa de crescimento durante a exposição das microalgas *Chlorolobion braunii*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, e *Raphidocelis subcapitata*, respectivamente, ao metal.

Assim como o micronutriente, a cor, ou qualidade da luz, também podem influenciar a composição bioquímica das microalgas, o que se deve à absorção seletiva das faixas de comprimentos de onda pela clorofila e outros pigmentos (SCHULZE *et al.*, 2014; BAER *et al.*, 2016). Em espécies como *Nannochloropsis salina*, *Nannochloropsis oceanica*, *Nannochloropsis oculata* e *Picochlorum atomus*, o cultivo sob luz verde favoreceu maior síntese de lipídeos, com 56% *N. oculata*, 53% *N. oceanica*, e 52% *N. salina*. Enquanto a luz azul promoveu maior rendimento de biomassa para *N. oculata*, *N. oceanica* e *N. salina* (RA *et al.*, 2016).

A combinação dos dois fatores, um metal (fator químico) e cor de luz (fator físico) para estimular o acúmulo de biomoléculas tem se mostrado uma estratégia promissora para não interferir na taxa de crescimento celular (Depósito Patente INPI BR 1020210197781). Como fonte de luz, propomos o uso de LED por possuírem comprimentos de onda específicos e serem mais eficientes e econômicos que a luz fluorescente convencional (YAN *et al.*, 2013; OLLE e VIRŠILE, 2013). No contexto do equilíbrio entre aumento do rendimento dos produtos e manutenção da taxa de crescimento, busca-se evitar os efeitos negativos dos metais às células, melhorando a síntese e maximizando a produção de compostos de valor agregado (MIAZEK *et al.*, 2015).

Considerando o interesse atual na produção de microalgas visando à obtenção de biomoléculas e bioprodutos de importância comercial, mais a capacidade de promover manipulações para produzir biomassa final com características diferentes (DOLGANYUK *et*

al., 2020), a seleção de novas espécies é um fator importante que impacta diretamente a viabilidade econômica do processo (RIZWAN *et al.*, 2018). Optamos aqui pela microalga verde (Chlorophyta) *Chlorolobion braunii* por ser uma microalga cosmopolita de água doce, capaz de acumular até 73% de lipídeos, e que já apresentou maior rendimento de biomoléculas sob estímulo de cobre, o que a caracteriza como uma espécie robusta de rápido crescimento e tolerante a diversas condições ambientais (WILLIAMS e MCMILLAN, 1961; RIZWAN *et al.*, 2018; BARACHO *et al.*, 2019) e, ainda, possível de ser manipulada.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações de cobre ambientalmente realistas e da exposição a diferentes cores de luz, como fatores isolados e em combinação, na espécie *Chlorolobion braunii*, uma Chlorophyta de água doce.

2. Revisão Bibliográfica

As microalgas possuem habilidades fisiológicas de converter energia solar em compostos bioquímicos essenciais, tanto para seu próprio desenvolvimento, como para os sucessíveis níveis tróficos em ecossistemas naturais. A quantidade e qualidade das moléculas sintetizadas, dependem de fatores físicos e químicos, dentre eles, a composição do meio de cultivo. Logo, a manipulação bioquímica das culturas, permite, através de uma abordagem biotecnológica, otimizar a síntese de biomoléculas visando atender as demandas comerciais e industriais (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013; BARACHO *et al.*, 2019).

Apesar das microalgas possuírem altas taxas de crescimento, essa característica pode ser afetada negativamente quando há variações nas condições de cultivo, como na concentração de nitrogênio, metais, mudanças no pH, luminosidade, salinidade, gerando estresse celular (CHEN *et al.*, 2017). Como consequência, têm-se a queda na taxa de crescimento populacional e conseqüentemente da produtividade final das biomoléculas, o que representa um empecilho para a redução dos custos do processo e ampliação de escala de produção (BARACHO *et al.*, 2019). Por exemplo, no cultivo de *Koliella antarctica*, o aumento da salinidade e luminosidade resultaram na redução na produtividade de biomassa. Os valores ficaram entre 0,50 a 0,53 g.L⁻¹ nas salinidades 0% a 4%, similares às concentrações de água doce, enquanto 0,45 g.L⁻¹ 0,48 g.L⁻¹.d⁻¹ nas salinidades mais altas, 8 a 32%, semelhantes ao ambiente marinho. Já para as intensidades luminosas, a produtividade de biomassa reduziu de 1,04 g.L⁻¹.d⁻¹ em 250 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$, para 0,87 g.L⁻¹.d⁻¹ em 500 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$, ocasionando menor rendimento de biomassa, proteínas e variações no perfil lipídico (SUZUKI *et al.*, 2018). O mesmo foi observado por Roy, Nielsen e Milledge (2021) em *Dunaliella tertiolecta* cultivada em condições de alta luminosidade e depleção de nitrogênio, resultando em menores concentrações

celulares, de $\sim 8 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em 145 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ em 5 mmol de nitrogênio, *versus* $\sim 2 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em 550 $\mu\text{mol photons m}^2 \text{ s}^{-1}$ em 0,5 mmol de nitrogênio. Os autores mostraram que a produtividade de clorofila, carotenoides e polifenóis foi mais baixa na situação com maior luminosidade e menor disponibilidade de nitrogênio (ROY; NIELSEN; MILLEDGE, 2021).

De forma geral, a literatura recente mostra que manipulações nas culturas microalgais favorecem o acúmulo de compostos bioquímicos enquanto reduzem a divisão celular. Breuer *et al.* (2012) investigou os efeitos da limitação de nitrogênio nas culturas de nove espécies de microalgas, das quais *Chlorella vulgaris*, *Nannochloris sp.*, *Neochloris oleoabundans*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricorutum* e *Porphyridium cruentum* apresentaram menor rendimento de biomassa ou inibição completa do crescimento, enquanto acumularam lipídeos. Com a mesma estratégia, *Dunaliella tertiolecta* e *Thalassiosira pseudonana* foram capazes de sintetizar até 2,3 vezes mais lipídeos às custas da queda na taxa de crescimento (JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012).

Como apresentado, manipulações bioquímicas podem ser realizadas por meio de diversos parâmetros no cultivo, combinados ou não, e a resposta fisiológica e bioquímica varia entre as espécies de microalgas. O estresse causado pela depleção de nutrientes é atualmente a estratégia mais utilizada para desencadear o acúmulo de metabólitos nas microalgas. Por exemplo, os teores de carboidratos ou lipídeos podem chegar a mais de 50% com base no peso seco (DW) em microalgas produtoras de amido ou oleaginosas. No entanto, devido ao intenso estresse ocasionado pela depleção de nutrientes, o acúmulo de biomassa é geralmente dificultado, levando à baixa concentração de amido ou lipídeo (HU *et al.*, 2008; RAN *et al.*, 2019). Além disto, a produtividade é limitada devido ao declínio inevitavelmente acompanhado da atividade fotossintética e o consequente comprometimento da produção de biomassa. A principal razão para o declínio da fotossíntese é a geração de ROS em condições de depleção de nutrientes, o que prejudica o aparato fotossintético (SRINIVASAN *et al.*, 2018).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos removem metais das soluções incluem: acumulação ou precipitação extracelular que pode ser facilitada pelo uso de microrganismos viáveis, sorção ou complexação da superfície celular que ocorre com microrganismos vivos ou mortos. Por fim, o acúmulo intracelular que requer atividade microbiana (COSSICH *et al.*, 2002). Embora as células vivas e mortas sejam capazes de acumular metal, os mecanismos envolvidos diferem. Geralmente os íons metálicos são aprisionados na estrutura celular e, subsequentemente, bio-sorvidos nos locais de ligação presentes na estrutura celular. Este

método de captação é independente do ciclo metabólico biológico, conhecido como “biossorção” ou “captação passiva” (MALIK, 2004). Além disso, os íons metálicos podem passar para a célula, através da membrana celular, via ciclo metabólico. Este modo de captação de metal é denominado “captação ativa”. A absorção de metal pelos modos ativo e passivo pode ser denominada por “bioacumulação”. Assim, quando são utilizadas concentrações de metais como variáveis na cultura, o estresse oxidativo gerado pode impulsionar maior síntese de compostos celulares (MIAZEK *et al.*, 2015). Substrato contendo metais como cádmio, cobre, cobalto, mercúrio, em baixas concentrações, utilizado como meio para cultivo de *Scenedesmus obliquus*, aumentou em 61% o rendimento lipídico (NAPAN *et al.*, 2015).

Para contornar esse problema, várias estratégias têm sido desenvolvidas objetivando aliviar o estresse oxidativo causado pela depleção de nutrientes e, conseqüentemente, melhorar a produção de biomassa e de seus metabólitos de armazenamento. O cobre (Cu) é um micronutriente necessário às microalgas para manutenção do metabolismo ideal, afetando o crescimento, fotossíntese e o fluxo de elétrons. Porém, os efeitos visíveis na fotossíntese e crescimento populacional da falta ou excesso de Cu são similares, ou seja, há uma diminuição no fluxo de elétrons, bem como na taxa de crescimento e rendimento quântico. Isso indica que a faixa de concentração ótima possui um limite superior e inferior, onde as microalgas podem adaptar seu maquinário para atingir o melhor desempenho (ROCHA *et al.*, 2021).

O efeito responsável pela resposta fisiológica na qual exposição a baixas dosagens retornam um efeito estimulante, enquanto em altas quantidades são tóxicas ou inibitórias é chamado de hormese (CALABRESE e MATTSON, 2010). O efeito hormese compreende a resposta adaptativa à dosagem do agente químico, que estimula a maquinaria celular a reagir em termos de tolerar as condições impostas, de modo a continuar funcional (CALABRESE e MATTSON, 2010). Para a microalga *Raphidocelis subcapitata*, quando exposta a baixas concentrações do íon cobre e também nanopartículas de cobre, um estímulo no crescimento celular foi observado (ALHO *et al.*, 2020).

Aplicando o princípio do efeito hormese, pode-se manter o estímulo provocado pela adição do cobre ao acúmulo de biomoléculas. Em *Chlorella minutissima*, 0,4 mM de cobre provocou aumento de 34% no rendimento de lipídeos, devido ao aumento na densidade da biomassa e conteúdo lipídico celular (YANG *et al.*, 2015). Baixas concentrações de cobre total, 0,1 e 1 μM (equivalente a cerca de 10^{-9} a 10^{-8} mol.L⁻¹ de cobre livre), estimularam o crescimento de *Chlorolobion braunii*, em 5,3 a 14,1% a mais em relação ao controle, enquanto cádmio afetou esse parâmetro negativamente, com morte celular chegando a 40% em 1 μM de cádmio (ECHEVESTE *et al.*, 2017). Para esta mesma microalga, o cobre, a $2,5 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹, também

promoveu aumento de biomoléculas com pequena influência na taxa de crescimento (~17% menor que o controle), *versus* a queda de ~93% da taxa de crescimento, na maior concentração de cobre testada (BARACHO *et al.*, 2019). Isso resultou em uma maior produtividade de biomoléculas em geral.

A qualidade da luz de exposição também possui influência no desenvolvimento das microalgas (MIAZEK *et al.*, 2015; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2021). Os comprimentos de onda (λ) do espectro luminoso, que são absorvidos dependem do aparato fotossintético e da composição dos pigmentos, que possuem diferentes espectros de absorção (CARVALHO *et al.*, 2010; BAER *et al.*, 2016). Por exemplo, clorofilas absorvem as faixas referentes às cores azul (λ 420-470 nm) e vermelha (λ 660 nm), já os carotenoides absorvem luz entre λ 400–550 nm e ficobilinas λ 500–650 nm (CARVALHO *et al.*, 2010). Por meio da utilização destes diferentes comprimentos de onda, é possível favorecer a fotossíntese com a manipulação do espectro de luz, que pode otimizar os rendimentos de biomassa e bioprodutos (BAER *et al.*, 2016; RAMANNA; RAWAT; BUX, 2017).

Cultivo realizado com *Chlorella vulgaris* exposta a diferentes comprimentos de onda, Yan *et al.* (2013) mostraram que a luz vermelha foi mais favorável à reprodução, com taxas de crescimento entre 119,22 - 135,37%, quando comparada à luz branca (108,72 - 124,42%); amarela (99,32 - 114,56%), roxa (38,63 - 61,83%), azul (32,74 - 60,32%) e verde (5,67 - 2,74%). Autores como Keeling (2013) apontaram que luz vermelha (660 nm) e azul (420-470 nm) são favoráveis ao crescimento de microalgas. De fato, existem evidências que comprovam uma aceleração do ciclo celular, resultando em maiores taxas de crescimento, células menores, com ação na expressão de genes e rotas metabólicas, como estímulo à síntese proteica e regulação de substratos e cofatores enzimáticos (RUYTERS, 1984). A luz verde (550 nm) possui comprimento de onda mais energético e promove maior eficiência fotossintética, propiciando teor máximo de 20,45% de ácidos graxos em *Nannochloropsis* sp., maior que quantidades obtidas sob luzes azuis 19,37%, brancas 18,21% e vermelhas 16,57% (DAS *et al.*, 2011).

A manipulação bioquímica visando maior rendimento de bioprodutos depende da seleção da espécie, a qual deve ser sensível o suficiente para responder às variações nas condições de cultivo, mantendo o crescimento e alterando a composição de biomoléculas. Além disso, espécies nativas, de ambientes aquáticos locais que estão expostos às flutuações ambientais ocasionais, e que já são minimamente aclimatadas ao local no qual se pretende cultivar, podem ser indicadas para manipulação (LIM e SCHENK, 2017). *Chlorobion braunii* é uma espécie de água doce que compõe o fitoplâncton tropical e subtropical, sendo encontrada em sistemas

aquáticos diversos (ECHEVESTE *et al.*, 2017; BARACHO *et al.*, 2019). A cepa utilizada neste trabalho foi selecionada por produzir alta quantidade de lipídeos, ser passível de manipulação com cobre (BARACHO *et al.*, 2019) e já teve cultivo em escala ampliada testado com resposta positiva (TT3, Processo FAPESP 2019/02503-6).

Baracho *et al.* (2019) mostrou que a microalga *Chlorolobion braunii*, cultivada em meio com concentrações de cobre variando de $5,7 \times 10^{-9}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, foi capaz de produzir maiores quantidades de biomoléculas, como 8x mais lipídeos, 15x mais carboidratos, e 13x mais proteínas, na presença de maiores concentrações de cobre do que em concentrações controle do metal. Essa espécie também pode atingir alto teor de lipídeos, como observado por Williams e McMillan (1961), os quais registraram 72,8% de lipídeos na biomassa seca dessa espécie, principalmente ácido palmítico, ácido oleico e ácido linolênico, durante cultivo por 4 a 8 semanas, com iluminação contínua e temperatura controlada.

A necessidade de otimização de processos de manipulação bioquímica para aumento das biomoléculas produzidas por microalgas pode partir de possibilidades desde a seleção da espécie para maior rendimento, até a combinação de parâmetros de cultivo, como sinergismo de diferentes qualidades de luz e concentrações de cobre. Essas abordagens podem contribuir para a viabilidade econômica e sustentabilidade da produção. Estudos são necessários para investigar respostas específicas de diferentes espécies para as condições de cultivo, tais como a caracterização das biomoléculas produzidas, velocidade de crescimento e geração de biomassa, possibilitando melhorias nas técnicas empregadas para manipulação e ampliação de escala do processo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do micronutriente cobre e de luz LED de diferentes cores no crescimento, fotossíntese e produção de biomoléculas na microalga *Chlorolobion braunii*. Levaremos em consideração a possibilidade de indução do efeito hormese e de uma ação sinérgica/interativa dos dois fatores (cobre e cores de luz) na produção e acúmulo de biomoléculas, nos parâmetros fotossintéticos, crescimento e composição bioquímica da microalga.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar possível efeito hormese: cobre e/ou luminosidade;
- Avaliar os efeitos da concentração de cobre e qualidades de luz (LEDs branco, vermelho e azul) no crescimento, concentração de clorofila *a in vivo* e densidade populacional da microalga;
- Examinar os parâmetros fotossintéticos da microalga sob influência de cobre e da exposição às diferentes cores de LED (branco, vermelho e azul);
- Avaliar os efeitos sinérgicos da concentração de Cu e diferentes cores de LED, quanto ao rendimento de biomoléculas (lipídeos, proteínas, carboidratos, clorofila *a* e carotenoides) em *Chlorobion braunii*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Condições de cultivo

A microalga *Chlorobion braunii*, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Inessa L. Bagatini, curadora da Coleção de Culturas de Microalgas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (CCMA 477), foi cultivada em meio BG11 (RIPPKA *et al.*, 1979), autoclavado (20 min, 121 °C, 1 bar; AV Phoenix Lufenco, Brasil), com pH inicial ajustado para 7,0, em fotobiorreator de bancada (garrafa PET) de 1000 mL incolor e transparente. Utilizamos 800 mL de volume de cultura, o que resultou em uma altura de coluna de 16 cm. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e as culturas borbulhadas com CO₂ 1% em argônio. As culturas foram mantidas sob luminosidade de 300 μmol photons m⁻² s⁻¹, fotoperíodo 12:12 h (ciclo claro:escuro) e temperatura controlada (24 °C ± 1), independente das cores de LED (branco, vermelho e azul). Para minimizar contaminações, a cultura foi manipulada em um gabinete de fluxo laminar (Veco, modelo VLFS 12, Brasil).

4.2. Manipulação bioquímica com cobre e cores de LEDs

Para a manipulação bioquímica, a microalga *C. braunii* foi exposta à concentração de cobre 5x10⁻⁷ mol.L⁻¹, a qual possui relevância ambiental e demonstrou efeitos na mesma espécie em estudos prévios (Baracho *et al.*, 2019), em todas as cores de LED (branco, azul e vermelho). O inóculo inicial, realizado 24 h após a adição de cobre, foi de 10⁴ células mL⁻¹ a partir de uma cultura em crescimento exponencial.

O cobre foi adicionado ao meio BG11 24 h antes do início dos experimentos. Uma solução diluída (10^{-3} mol.L⁻¹) para uso com culturas foi feita a partir da solução padrão de cobre comercial (AAS/ICP, 1000 mg.L⁻¹, 38996 Sigma-Aldrich, EUA).

4.3. Parâmetros de crescimento

O crescimento populacional foi monitorado diariamente por meio de contagem de células feita em citômetro de fluxo (MUSE CELL ANALYZER; Merck Millipore Billerica, MA, EUA), método que se baseia na fluorescência natural do pigmento de clorofila *a*. A taxa de crescimento específica foi obtida por meio de uma regressão linear, plotando-se o logaritmo natural da densidade celular (célula mL⁻¹) *versus* o tempo experimental (dias), onde o coeficiente angular da reta representa a taxa de crescimento.

Por meio de um fluorímetro digital (Turner Designs AU-10 Fluorômetro, Trilogy, EUA) foi feito o monitoramento da concentração de clorofila *a* baseada em uma curva de calibração padrão (unidades de fluorescência relativa, RFU, *versus* concentração de clorofila *a*) realizada com clorofila *a* extraída de uma cultura de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento.

A determinação de biomassa seca foi feita diariamente para acompanhamento do crescimento durante a manipulação bioquímica com os LEDs branco, azul e vermelho. Filtros de acetato celulose, previamente secos em estufa a 40 °C, foram utilizados para filtrar uma alíquota de 5 mL com auxílio de seringa e Swinnex (Millipore). Os filtros com a cultura foram secos a 40 °C por 24h e a massa aferida em balança microanalítica (Mettler Toledo – precisão de 10⁻⁶ g).

4.4. Parâmetros fotossintéticos

O monitoramento dos parâmetros fotossintéticos foi feito por meio da fluorescência de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz, Alemanha). O rendimento quântico máximo (Φ_M) foi monitorado diariamente a partir de amostras aclimatadas no escuro por 20 min para a oxidação completa do fotossistema II (PSII) em todos os experimentos. O rendimento quântico efetivo (Φ'_M) e os decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímico (NPQ) foram determinados no dia final dos experimentos (96 h), por meio de células adaptadas à luz de intensidade do cultivo a cada 20 s durante 10 min.

Os cálculos dos parâmetros fotossintéticos foram realizados conforme as equações 1, 2, 3 e 4, apresentadas em Lombardi e Maldonado (2011). O valor de fluorescência em células adaptadas à luz (F'_M) é determinado a partir da fluorescência em estado estável ($F'S$), e o

rendimento quântico efetivo (Φ_M), decaimentos fotoquímicos (qP) e o NPQ, foram calculados pelas equações 2, 3 e 4, de Juneau, Berdey, e Popovic (2002) e Oxborough e Baker (1997).

$$\Phi_M = (FM - FO) / FM \quad (1)$$

$$\Phi'_M = (F'M - F'S) / F'M \quad (2)$$

$$qP = (F'M - F'S) / (F'M - F'O) \quad (3)$$

$$NPQ = [FM - F'M] / F'M \quad (4)$$

4.5. pH

Uma alíquota de 3 mL de cada cultivo foi analisada no pHmêtro de bancada (Bel Engineering PHS3BW) para acompanhamento diário do pH.

4.6. Composição bioquímica

A determinação de biomoléculas foi feita em 96 h de cultivo, em fase exponencial de crescimento. Para proteínas, foram centrifugados 20 mL, em uma centrífuga refrigerada (Thermo Scientific/Sorvall, Legend XTR, EUA) por 20 min em 4400 rpm. Os pellets foram mantidos congelados em ultrafreezer (-81 °C) até o momento de análise. As proteínas totais foram extraídas e quantificadas de acordo com o método de Slocombe *et al* (2013) modificado.

Para carboidratos foram centrifugados 30 mL. Os carboidratos totais foram determinados baseado no método colorimétrico com ácido sulfúrico-UV, segundo Albalasmeh *et al.* (2013), e a curva de calibração foi realizada com glicose como padrão.

Os lipídeos totais foram determinados por gravimetria. Filtros de fibra de vidro foram previamente muflados a 400 °C por 12 horas e utilizados para filtrar amostras de 50 mL. Frascos de vidro também muflados e contendo 2 mL de clorofórmio foram utilizados para armazenamento dos filtros no freezer até o momento de análise. Os lipídeos foram extraídos pelo método de Folch (1957) modificado, com clorofórmio:metanol (2:1) como descrito em Parrish (1999). Uma alíquota de 400 μ L foi evaporada em um cadinho de alumínio previamente muflado e com sua massa aferida em balança microanalítica com 10^{-6} g precisão (Mettler Toledo, Suíça). Após o processo de secagem da amostra, o cadinho teve sua massa novamente aferida.

As concentrações de carotenoides totais e clorofilas totais foram determinadas de acordo com Wellburn (1994). Amostras de 10 mL foram separadas. As quantificações de clorofila total foram feitas pelos métodos com DMSO propostos por Shoaf e Lium (1976), a

partir de leituras de espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 664 e 647 nm (NANOCOLOR, Macherey-Nagel, Alemanha).

4.7. Análise dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA TWO WAY e teste de Tukey com 95% de confiança, e a normalidade dos resíduos testada por Shapiro-Wilk. O software MiniTab 17 foi utilizado para realização das análises e comparação dos resultados. O programa IgorPro 6.0.5 (WaveMetrics, EUA) foi usado para as representações gráficas.

5. Resultados

5.1. Parâmetros de crescimento

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento obtidas nos tratamentos, sendo a Fig. 1a representada pelo logaritmo natural do número de células mL^{-1} em função do tempo (dias), enquanto na Figura 1b a curva de crescimento é representada pela concentração de clorofila *a in vivo* (mg/L). A partir da Fig. 1a calculou-se a taxa de crescimento, utilizando-se os pontos do dia 1 até o dia 3 (Fig. 2b). A maior concentração de clorofila *a in vivo* foi obtida para o cultivo sob luz branca com adição de cobre ($0,75 \pm 0,06 \text{ mg/mL}$) (ANOVA, $p < 0,05$); seguido do cultivo controle na luz branca ($0,63 \pm 0,12 \text{ mg/mL}$), o qual foi similar ao controle na luz azul ($0,64 \pm 0,08 \text{ mg/mL}$). Concentrações mais baixas de clorofila *a in vivo* foram observadas para os cultivos sob luz vermelha controle ($0,38 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$) e com adição de cobre ($0,38 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$).

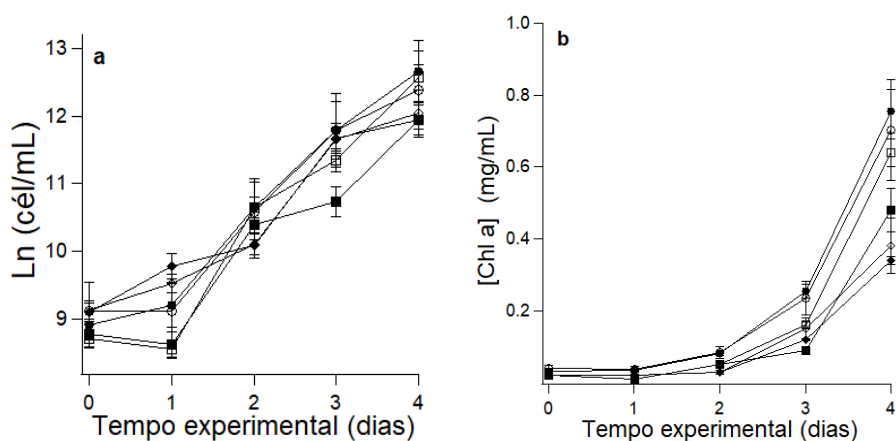


Figura 1. Curvas de crescimento em culturas de *C. braunii*. (a) Densidade populacional (Ln [células/mL]) e (b) Concentração de clorofila *a in vivo*, ambas em função do tempo experimental. Os símbolos aplicam-se a cada tratamento: círculo aberto controle luz branca, círculo fechado cobre luz branca, quadrado aberto controle luz azul, quadrado fechado cobre luz azul, losango aberto controle luz vermelha, losango fechado cobre luz vermelha. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3).

A biomassa seca (mg/L) ao final do tempo experimental (96 h) e as taxas de crescimento (d^{-1}) para todos os tratamentos são mostradas na Figura 2. Os valores de biomassa seca obtidos ao final das 96 horas ficaram em torno de 21 a 32 mg/L, não apresentando diferenças estatísticas (ANOVA, $p > 0,05$). As maiores taxas de crescimento foram observadas para os tratamentos envolvendo cobre e luz branca ($1,11 \pm 0,17 d^{-1}$), e luz azul sem adição extra do metal ($1,05 \pm 0,17 d^{-1}$ na luz azul) (ANOVA, $p < 0,05$). O controle na luz branca apresentou taxa de crescimento $0,94 \pm 0,18 d^{-1}$, similar ao cultivo na luz azul com adição extra de cobre ($0,87 \pm 0,15 d^{-1}$). Os cultivos sob luz vermelha apresentaram as menores taxas de crescimento, sendo $0,79 \pm 0,11 d^{-1}$ no controle e $0,73 \pm 0,1 d^{-1}$ com adição extra de cobre (ANOVA, $p < 0,05$).

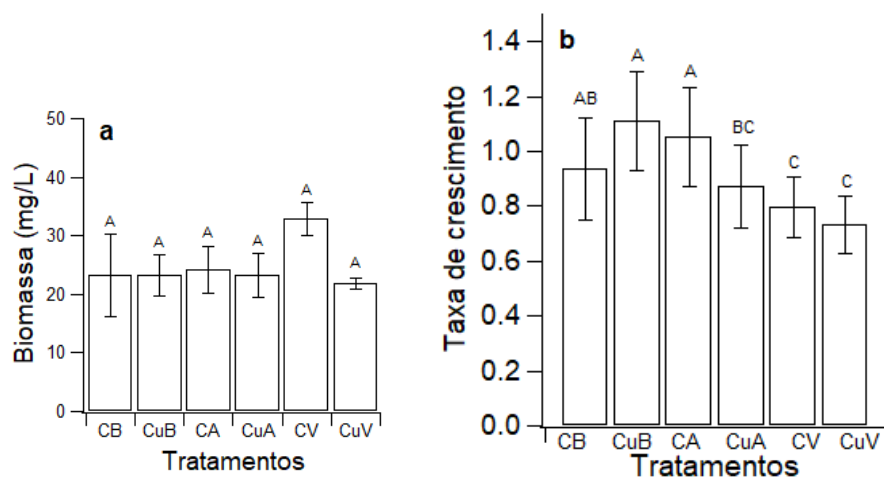


Figura 2. (a) Biomassa seca em 96 h; (b) Taxas de crescimento e para todos os tratamentos: CB controle luz branca, CuB cobre luz branca, CA controle luz azul, CuA cobre luz azul, CV controle luz vermelha, CuV cobre luz vermelha. Barra de erro representa o desvio padrão da média ($n=3$). Letras iguais sobrescritas indicam diferença não sigficativa estatisticamente (ANOVA, $p > 0,05$).

5.2. Parâmetros fotossintéticos e pH do cultivo

Os parâmetros fotossintéticos, rendimentos quânticos máximo (Φ_M) e efetivo (Φ'_M), decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímicos (NPQ) em 96 h de experimento são mostrados na Tabela 1. Os valores de rendimentos máximo mantiveram-se próximos de 0,70, e de efetivo $\sim 0,50$ em todos os tratamentos, não apresentando diferenças estatísticas (ANOVA, $p > 0,05$). Os decaimentos fotoquímicos mantiveram-se próximos de 1, e os decaimentos não

fotoquímicos (NPQ), em geral, foram maiores sob as cores de luz branca e azul, do que sob a vermelha (ANOVA, $p < 0,05$).

Tabela 1. Rendimentos quânticos máximo (ΦM) e efetivo ($\Phi' M$), decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímicos (NPQ) em 96 h de experimento. Os valores representam a média ($n=3$). Letras iguais sobrescritas indicam diferença não sigficativa estatisticamente (ANOVA, $p > 0,05$).

		ΦM	$\Phi' M$	qP	NPQ
Luz branca	Controle	0,73 ($\pm 0,01$) ^A	0,51 ($\pm 0,04$) ^A	1,24 ($\pm 0,06$) ^B	0,34 ($\pm 0,01$) ^A
	Cobre	0,70 ($\pm 0,04$) ^A	0,55 ($\pm 0,03$) ^A	1,30 ($\pm 0,04$) ^B	0,31 ($\pm 0,04$) ^A
Luz azul	Controle	0,68 ($\pm 0,04$) ^A	0,53 ($\pm 0,03$) ^A	1,43 ($\pm 0,1$) ^A	0,19 ($\pm 0,1$) ^{AB}
	Cobre	0,71 ($\pm 0,00$) ^A	0,56 ($\pm 0,003$) ^A	1,33 ($\pm 0,01$) ^{AB}	0,32 ($\pm 0,006$) ^A
Luz vermelha	Controle	0,72 ($\pm 0,00$) ^A	0,53 ($\pm 0,004$) ^A	1,16 ($\pm 0,09$) ^B	0,01 ($\pm 0,3$) ^B
	Cobre	0,69 ($\pm 0,01$) ^A	0,51 ($\pm 0,01$) ^A	1,34 ($\pm 0,07$) ^{AB}	0,19 ($\pm 0,02$) ^{AB}

Os valores de pH durante o cultivo de *C. braunii* são mostrados na Figura 3. A faixa de pH foi $7,47 \pm 0,65$ para o controle na luz branca, $7,0 \pm 0,53$ na luz azul, e $7,6 \pm 0,63$ na luz vermelha. Nos cultivos com adição de cobre, a faixa de pH observada foi $7,7 \pm 0,69$ na luz branca, $7,4 \pm 0,45$ na luz azul, e $7,2 \pm 0,72$ na luz vermelha.

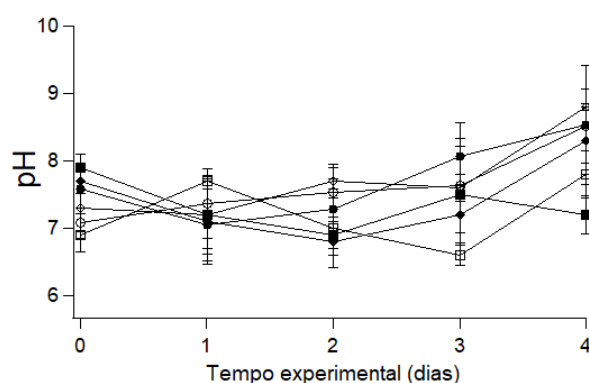


Figura 3. Valores de pH nos cultivos de *C. braunii* durante o período experimental (96 h). Os símbolos aplicam-se aos tratamentos: círculo aberto, controle luz branca; círculo fechado, cobre luz branca; quadrado aberto, controle luz azul; quadrado fechado, cobre luz azul; losango aberto, controle luz vermelha; losango fechado, cobre luz vermelha. Barras de erro representam o desvio padrão da média ($n=3$).

6.3 Composição bioquímica

O conteúdo de biomoléculas na biomassa seca obtida a partir de cultivos com 96 h está apresentado na Figura 4, para a qual chamamos a atenção para a diferença na amplitude de valores dos eixos Y. A maior concentração de carboidratos totais (Figura 4a) foi observada no tratamento com luz azul (17% da biomassa seca - BS), no qual o controle apresentou 1,9x mais carboidratos que o cultivo com adição de cobre na mesma luz (ANOVA, $p < 0,05$). Nota-se que, para cultivo sob luz branca e adição de cobre, o resultado foi similar ao da luz azul sem cobre (15% BS) (ANOVA, $p > 0,05$), porém foi 1,2x maior que o controle na luz branca. Ambos os cultivos realizados sob luz vermelha mostraram menores conteúdos de carboidratos (~ 4% BS) (ANOVA, $p < 0,05$).

Diferente dos carboidratos, as proteínas totais (Figura 4b) no tratamento com a luz vermelha e adição de cobre resultou no maior valor (41% BS), o que equivale a 2,6x mais proteínas do que o controle na respectiva cor de luz. Este resultado é similar aos resultados obtidos nos cultivos com a luz azul (28-36% BS) (ANOVA, $p > 0,05$). Os cultivos sob luz branca apresentaram concentrações de proteínas totais estatisticamente semelhantes (ANOVA, $p > 0,05$).

Para os lipídeos, a adição de cobre estimulou a produção da biomolécula nas três cores de luz (Figura 4c) (ANOVA, $p < 0,05$). O valor máximo ocorreu no cultivo com cobre e luz azul (~ 76% BS), 2,8x maior que o controle na luz azul. Na luz branca, o tratamento com cobre induziu 2,6x mais lipídeos do que o controle na mesma luz. Para a luz vermelha, foi observado um aumento de 2,2x na quantidade de lipídeos na presença do cobre adicional, em relação ao controle na mesma luz.

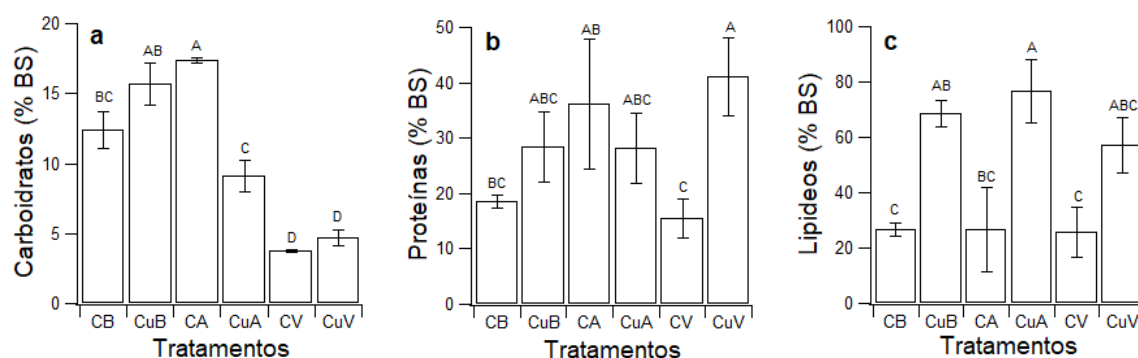


Figura 4. Porcentagem de biomoléculas na biomassa seca (BS). Em (a) carboidratos; (b) proteínas; (c) lipídeos: CB controle na luz branca; CuB cobre adicionado na luz branca; CA controle na luz azul; CuA cobre adicionado na luz azul; CV controle na luz vermelha; CuV cobre adicionado na luz vermelha. Barras de erro representam o desvio padrão da média (n=3). Letras iguais sobrescritas indicam diferença não significativa estatisticamente (ANOVA, $p > 0,05$).

Os pigmentos carotenoides, clorofila *a* e *b*, e a relação clorofila *a*/clorofila *b*, são mostrados na Figura 5. A concentração de carotenoides (Figura 5a) não variou entre os tratamentos, exceto pelo menor valor obtido na condição cobre luz vermelha. Em média 1,4 a 2% de pigmentos na biomassa seca, enquanto os cultivos sob luz vermelha acumularam cerca de ~ 1% de carotenoides no controle e 1,4% na adição de cobre. O teor de clorofila *a* (Figura 5b) foram similares nos cultivos com luz branca e azul (ANOVA, $p > 0,05$). Para a luz vermelha, foram observados menores valores de clorofilas *a* e *b* (ANOVA, $p < 0,05$). A relação de conteúdo de clorofila *a* por clorofila *b* (Figura 5c) foi maior entre os tratamentos com a luz vermelha; para a luz branca e azul, os resultados foram similares nas condições testadas (ANOVA, $p > 0,05$).

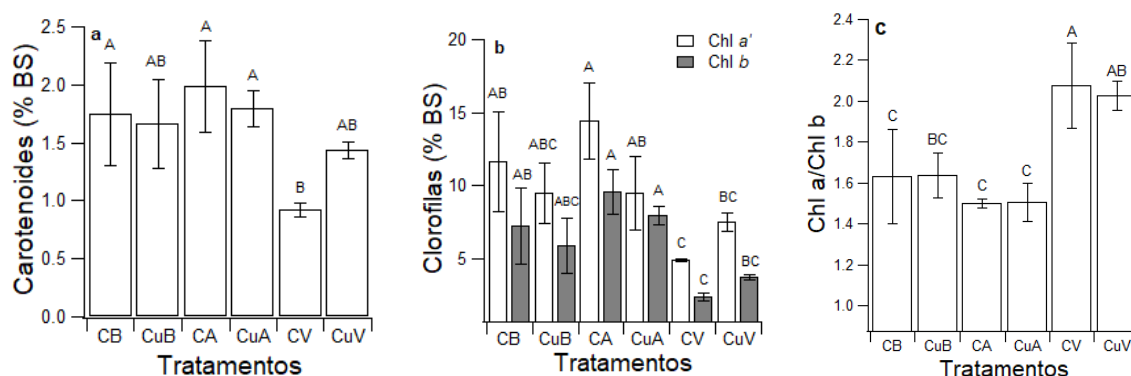


Figura 5. Pigmentos apresentados como porcentagem da biomassa seca (% BS). Em (a) porcentagem de carotenoides na biomassa seca (BS). Em (b) clorofilas *a* e *b* (% BS). Barras brancas clorofila *a*; Barras cinzas clorofila *b*. (c) Relação clorofila *a* por clorofila *b*. CB controle na luz branca; CuB cobre adicionado na luz branca; CA controle na luz azul; CuA cobre adicionado na luz azul; CV controle na luz vermelha; CuV cobre adicionado na luz vermelha. Barras de erro representam o desvio padrão da média. Letras iguais sobrescritas indicam diferença não significativa estatisticamente (ANOVA, $p < 0,05$).

6. Discussão

6.1. Parâmetros de crescimento

Nossos resultados mostraram que a luz branca com adição de cobre resultou nas maiores taxas de crescimento, concordando com ZHAO *et al.* (2015). No estudo, os autores mostraram que cultivos de *Chlorella vulgaris* sob luz branca cresceram melhor do que em outras cores de luz. Os autores obtiveram taxas de crescimento de $0,267 \text{ d}^{-1}$ na luz branca, de $0,174 \text{ d}^{-1}$ na luz azul e $0,213 \text{ d}^{-1}$ na vermelha. A luz branca também promoveu taxas de crescimento de 2 a 3 vezes maiores para *Scenedesmus obliquus* ($0,282 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$) e *Neochloris oleoabundans* ($0,216 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$) em comparação com luz LED azul e vermelha (ZHAO *et al.*, 2015). Segundo Bialon e Rath (2018), a luz branca, por combinar os comprimentos de onda presentes no espectro da luz visível (vermelho, alaranjado, amarelo, verde, azul e violeta), permite às células uma conversão mais eficaz da energia em biomassa se comparada às cores isoladas, e por isso a maior taxa de crescimento.

De acordo com os resultados observados para os tratamentos envolvendo adição de cobre, as taxas de crescimento foram menores do que as obtidas para os controles, exceto para luz branca. O estímulo no crescimento provocado pela adição de cobre também foi observado em *Chlorella vulgaris* cultivada em baixas concentrações do metal (10^{-9} a $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$), que apresentou maior taxa de crescimento em relação ao controle (AFKAR; ABABNA; FATHI, 2010). Os autores relacionam tal efeito ao papel do cobre em processos metabólicos. Os autores não descartam a possibilidade de produção de algum composto orgânico pela microalga, que diminuiria a toxicidade do metal (AFKAR; ABABNA; FATHI, 2010). Mas, como isso poderia ter estimulado a taxa de crescimento obtida, não é esclarecido. Em cultivo de *Chlorolobion braunii*, o cobre adicionado na concentração de $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ provocou um aumento de 5,3% na densidade celular e 14,1% em $1 \text{ }\mu\text{M}$ (ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017). Entretanto, sob luz branca, Baracho *et al.* (2019) mostrou que a taxa de crescimento foi $\sim 17\%$ menor do que o controle em $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de cobre livre.

Sob as diferentes cores de luz usadas nesta pesquisa, mostramos que *C. braunii*, com ou sem adição extra de cobre, teve crescimento similar. De acordo com a literatura, os comprimentos de onda da luz azul (λ 420 – 470 nm) e vermelha (λ 660 nm) estão nas faixas de absorção seletiva pela clorofila. Além disso, o vermelho ao vermelho longo (630 – 750 nm) é apontado como indutor de altas taxas de crescimento e formação de células de menor tamanho

em várias cepas de microalgas (BAER *et al.*, 2016; SCHULZE *et al.*, 2014). Comparado aos resultados de Zhao *et al.* (2015) ($0,174 \text{ d}^{-1}$ *Chlorella vulgaris*) e Duarte e Costa (2018), que analisaram *Chlorella fusca* sob $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em luz azul ($\sim 0,05 \text{ d}^{-1}$), nosso estudo mostrou taxas de crescimento mais altas sob essa mesma cor de luz.

Os resultados obtidos quanto à concentração de clorofila *a* mostram que quando *C. braunii* foi cultivada sob luz branca e aumento de cobre no meio, houve um estímulo na síntese desse pigmento. Resultado similar foi observado no cultivo de *Raphidocelis subcapitata* com nanopartículas de cobre e, a maior concentração de clorofila *a* na presença do metal foi associada a uma estratégia adaptativa das microalgas para otimizar a utilização da luz (SILVA; ECHEVESTE; LOMBARDI, 2018; ALHO *et al.*, 2020). Quando *C. braunii* foi exposta à luz vermelha em combinação com o cobre, a concentração de clorofila *a* foi 50% menor em relação ao controle luz branca, o que evidencia a ação direta desse comprimento de onda sobre a quantidade de moléculas de clorofila *a*. Um estudo comparando três diferentes cores de LED (branco, azul e vermelho) no crescimento de quatro espécies de microalga também mostrou menores conteúdos de clorofila *a* em *Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus* cultivadas sob LED vermelho, comparado com as outras cores de LED (ZHONG; JIN; CHENG, 2018).

A divisão celular, um dos parâmetros do crescimento populacional obtidos a partir de culturas de microalgas é afetada por fatores como pH e disponibilidade de CO_2 . Sabe-se que o fornecimento de CO_2 no meio pode diminuir o pH, alterando a especiação dos elementos químicos no meio de cultura e afetando o metabolismo da microalga (KASSIM; MENG, 2017). Na faixa de pH deste estudo (7 – 8), o CO_2 estava presente na forma de bicarbonato, tornando possível que as microalgas utilizem seus mecanismos para o transporte do carbono e concentram na célula, permitindo o uso deste pelo ciclo de Calvin e, conseqüentemente, promovendo o crescimento populacional (HERZOG; GOLOMB, 2004).

6.2. Parâmetros fotossintéticos

O rendimento quântico máximo (ΦM) possibilita inferir sobre o estado fisiológico da microalga, e de acordo com Lombardi e Maldonado (2011) se $\Phi\text{M} \sim 0,70$, pode-se sugerir que as células estavam em situação saudável. Neste estudo, todos os cultivos mantiveram média diária $\Phi\text{M} \geq 0,70$, um indicativo de que os mecanismos de fotossíntese não foram afetados pela concentração de cobre usada. Nossos resultados estão de acordo com os de Echeveste

et al. (2017), Baracho *et al.* (2019), Silva *et al.* (2018), e Alho *et al.* (2020) que também não observaram alteração do rendimento fotossintético em microalgas expostas a baixas concentrações de cobre. As microalgas estudadas foram *Chlorolobion braunii*, *Scenedesmus quadricauda*, e *Raphidocelis subcapitata*, respectivamente.

No último dia de experimento, em 96 h, além do rendimento quântico máximo (Φ_M), o rendimento quântico efetivo (Φ^*M) foi medido e, sem variação, sugerimos que nem as concentrações subletais do cobre usadas, nem as cores de luz, influenciaram a fotoquímica da fotossíntese. Baracho *et al.* (2019) e Lombardi e Maldonado (2011) observaram efeitos parecidos nesse parâmetro mediante exposição de *Chlorolobion braunii* (Baracho *et al.*, 2019) e *Phaeocystis cordata* (Lombardi e Maldonado, 2011) a baixas concentrações de cobre.

Os decaimentos fotoquímicos (qP) próximos de 1, obtidos para todos os tratamentos neste estudo, indicam que a energia luminosa estava seguindo para a fotoquímica da fotossíntese (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Os decaimentos não fotoquímicos (NPQ), indicadores da dissipação do excesso de energia para proteção celular contra danos no aparelho fotossintético, foram maiores para os cultivos sob luz branca e azul, o que pode indicar que mecanismos de fotoproteção possam ter sido ativados (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Similarmente, a ativação do sistema de fotoproteção indicada pelo aumento do NPQ foi observado para *C. braunii* em concentrações ambientais de cobre (BARACHO *et al.*, 2019; ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017).

6.3. Composição bioquímica

Analisando os efeitos das manipulações bioquímicas empregadas neste estudo, a luz azul favoreceu o acúmulo de carboidratos na microalga *Chlorolobion braunii*, resultado também observado para *Arthrospira platensis*, que acumulou 11,3% BS cultivada sob luz azul, enquanto nas luzes rosa e branca 8,8% BS foi acumulado em ambas (MARKOU, 2014). Vários autores observaram efeito similar. A luz azul aumentou a produção de carboidratos em *Rhodella* sp. quando comparado aos cultivos sob luzes branca, verde e vermelha, atingindo 41% BS (MCGEE *et al.*, 2019). O mesmo efeito ocorreu em *Chlorella pyrenoidosa*, que apresentou 1,07 mg/g de carboidratos na biomassa derivada da exposição à luz azul, maior que o observado para as luzes branca (0,04 mg/g), verde (0,32 mg/g) e vermelha (0,48 mg/g) (MCGEE *et al.*, 2019; YADAVALLI *et al.*, 2016). A maior energia fornecida pelo LED azul, em comparação com as outras cores de LED utilizadas neste estudo, poderia estar relacionada ao direcionamento do consumo de energia para o metabolismo de carboidratos, os quais

requerem menores rotas para síntese do que as outras biomoléculas aqui analisadas, como as proteínas e os lipídeos (YADAVALLI *et al.*, 2016).

A combinação entre os fatores *cobre e luz branca* na produção de carboidratos em *C. braunii* foi mostrada neste estudo. Sabe-se que o cobre, assim como outros metais, impacta os processos celulares, alterando a energia para a produção de biomoléculas (Lombardi e Maldonado 2011), o que justifica o estímulo na produção de carboidratos durante a exposição da microalga ao cobre. Esse resultado concorda com os obtidos por Baracho *et al.* (2019) para a mesma espécie de microalga, que quando cultivada em 5×10^{-6} mol L⁻¹, um aumento de 15 vezes no total de carboidratos por célula em relação ao controle foi obtido. O efeito de metais no meio de cultura impulsionando a produção de carboidratos é relatado em outros estudos. Chia, Lombardi e Melão (2013) obtiveram o aumento da concentração dessa biomolécula em cultivo de *Chlorella vulgaris* com cádmio. Silva *et al.* (2018) observaram aumento de 15 vezes do conteúdo de carboidratos em *Scenedesmus quadricauda* cultivada em 10^{-6} mol L⁻¹ de cobre. Os mecanismos que determinam a produção de biomoléculas durante variações nas condições ambientais podem ser uma resposta adaptativa contra a toxicidade do metal, visto que carboidratos podem ligar-se aos íons metálicos, diminuindo a biodisponibilidade destes (AFKAR; ABABNA; FATHI, 2010; SILVA, ECHEVESTE, LOMBARDI, 2018).

Apesar das maiores concentrações de carboidratos observadas nos cultivos nas luzes branca e azul, as porcentagens obtidas estão, em geral, dentro do encontrado para microalgas verdes na literatura. Em luz branca, *Chlorella miniata* apresentou 11,5 % BS de carboidratos, *Ankistrodesmus falcatus* 11,9% BS, *Scenedesmus wisconsinensis* 13,8%, *Mychonastes* sp. 16,5% BS, e *Desmodesmus* sp. 17,2% BS (SCHULZE *et al.*, 2017). Já sob luz vermelha, *C. braunii*, neste estudo, apresentou redução no conteúdo de carboidratos, indicando que nesta condição de cultivo, os carboidratos podem ser consumidos em maior intensidade e a síntese de proteínas, não de carboidratos, pode ser estimulada, como será discutido adiante. Os fótons providos pela luz precisam da captura pela clorofila para serem utilizados, e isto depende da organização intracelular, como a composição de pigmentos dos complexos de captação de luz em seus cloroplastos (SCHULZE *et al.*, 2014). De acordo com dados da literatura a respeito de cultivo de microalgas em diferentes qualidades de luz, o melhor espectro de luz para uma espécie não necessariamente se aplica para outras espécies, portanto, recomenda-se a realização de estudos sob diferentes cores de luz visando ao conjunto espécie/bioproduto de interesse.

Quanto às proteínas, estas foram significativamente influenciadas pelas cores de luz. Expor *C. braunii* à combinação de cobre e luz vermelha resultou em um aumento de ~ 165% no teor de proteínas em relação ao cultivo na mesma luz sem adição extra de cobre. Isso indica

a utilização dessas biomoléculas em uma resposta adaptativa da célula na exposição ao metal, uma vez que não houve aumento equivalente na biomassa. As microalgas respondem aos níveis de estresse causado por metais exibindo um efeito de super compensação, que é promovido por seu sistema regulatório homeostático. Esse efeito desencadeia a ativação de mecanismos metabólicos e de produção de antioxidantes que auxiliam a célula contra a toxicidade dos metais. Esse fenômeno também é conhecido como efeito hormético (NAPAN *et al.*, 2015; SPOLJARIC *et al.*, 2011). Similar aos nossos resultados, maior produção de proteínas por microalgas sob luz vermelha foi descrito por Abiusi *et al.* (2014) em estudos com *Tetraselmis suecica*, alcançando cerca de 45% de proteínas na biomassa seca nessa qualidade de luz, *versus* 42% BS na luz branca, e ~ 40% BS nas luzes azul e verde. DA FONTOURA PRATES *et al.* (2020) obteve rendimento 2x maior de proteínas na luz vermelha, em comparação com a luz branca em *Spirulina sp.*, efeito semelhante ao observado neste estudo - ~1,5x mais proteínas na manipulação realizada com cobre e luz vermelha em comparação ao cobre e luz branca. De acordo com os autores, a energia contida na luz vermelha pode ser melhor aproveitada devido ao comprimento de onda absorvido pela clorofila, beneficiando a fotossíntese e o rendimento dessas biomoléculas. O aumento de proteínas em situação de exposição ao cobre tem sido relatado na literatura. *Scenedesmus quadricauda* cultivada em $8,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre apresentou 6x mais proteínas que o controle, com manutenção da taxa de crescimento (SILVA *et al.*, 2018), assim como ocorreu neste estudo. Estudos com a microalga Chlorophyta *Chlorolobion braunii* realizados por Baracho *et al.* (2019) verificaram um aumento de 13x no conteúdo de proteínas em exposição a 5×10^{-6} mol L⁻¹ de cobre em relação ao controle. Os autores sugerem que as moléculas responsáveis por esse acúmulo sejam proteínas, tais como as fitoquelatinas, responsáveis por diminuir a biodisponibilidade do metal (BARACHO *et al.*, 2019; SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

A luz azul resultou em maior conteúdo de proteínas, semelhante ao observado na combinação de luz vermelha e cobre. Nossos resultados estão de acordo com outros da literatura. Baidya *et al.* (2021) obteve ~ 46% BS em *Chlorella ellipsoidea* sob luz azul, 41% BS em luz branca, 42% BS em verde, e 33% BS em luz vermelha. Os efeitos de diferentes cores de luz no conteúdo de proteínas também foram observados em *Chlorella pyrenoidosa*, que acumulou 1,38 mg/g de proteínas na biomassa (0,14% BS) sob luz vermelha e 1,50 mg/g (0,15% BS) sob luz azul, mas apenas 0,60 mg/g sob luz verde e 0,07 mg/g sob luz branca (YADAVALLI *et al.*, 2016). Em contraste com o observado para *C. braunii* nesta pesquisa, em *Stauroneis sp.*, as luzes azul e vermelha resultaram nos menores valores de proteínas (~ 20-25% BS), enquanto a luz branca o maior (~ 32% BS) (MCGEE *et al.*, 2019).

Nesta pesquisa observamos que o efeito da combinação cobre e luz azul, e cobre com luz vermelha resultaram nos maiores valores de proteínas totais. Entretanto, menores conteúdos de proteínas foram encontrados nos cultivos sob luz branca (18% BS) e sob luz vermelha (15% BS). Assim, concluímos que as condições de cultivo, tais como as cores de luz e concentração de cobre, além do fator espécie-específico, podem ser manipulados a depender dos objetivos de cada estudo e aplicações.

Quanto aos lipídeos, um efeito estimulante foi obtido pelo cobre, independente da cor de luz usada. Na ausência do cobre adicional, essa biomolécula está presente em cerca de 20% BS, mas atingiu o valor de 60 a 80% na presença do metal. Sabe-se que o cobre é um micronutriente essencial às microalgas e está envolvido em processos fisiológicos e metabólicos das células, sendo cofator enzimático. Assim, é capaz de alterar atividades intracelulares, tais como rotas metabólicas e fotossíntese, que se refletem em mudanças na composição bioquímica desses organismos (DEBELIUS *et al.*, 2009; LOMBARDI e MALDONADO, 2011). Consideramos que na presença de um fator de estímulo, no caso o cobre, o acúmulo de lipídeos pode ser decorrente da ativação de mecanismos de defesa contra possível estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2016; DAUDA, 2022). Esses resultados são coerentes com outros estudos envolvendo metais e microalgas. Baracho *et al.* (2019) observaram um aumento de 8x nos lipídeos totais de *C. braunii*, em detrimento da taxa de crescimento, em 5×10^{-6} mol L⁻¹ de cobre; Silva *et al.* (2018) obtiveram 5x mais lipídeos em *S. quadricauda* exposta a 5×10^{-9} mol L⁻¹. Com adição de 2×10^{-8} mol L⁻¹ de cádmio livre, *C. vulgaris* produziu 3,5x mais lipídeos de acordo com Chia *et al.* (2013). Para *Chlorella minutissima* exposta à concentrações de zinco, cobre e cádmio da ordem de 10^{-4} mol L⁻¹ aumento no conteúdo lipídico foi obtido (YANG *et al.*, 2015). Salientamos que as concentrações usadas pelos autores são cerca de 1000 vezes maior do que a que usamos nesta pesquisa. Nossos resultados destacam o papel dos lipídeos como biomolécula de reserva energética em *Chlorolobion braunii*, visto que, na presença de maior concentração de cobre, o conteúdo lipídico aumentou em torno de 2x para todos os tratamentos e, além disso o conteúdo de lipídeos em situação controle também foi maior do que o comumente observado em microalgas Chlorophyta, que fica em torno de 10 a 20% BS (CHIA *et al.*, 2013).

Apesar de não termos obtido efeito das cores de luz sobre a produção de lipídeos, alguns autores mostram que sob luz azul, pode haver aumento de lipídeos em algumas microalgas. Cultivada sob luz azul, *Tetraselmis sp.* e *Nannochloropsis sp.* acumularam mais lipídeos do que quando mantidas sob luz branca, vermelha e azul-vermelha (TEO *et al.*, 2014). LED azul também promoveu aumento lipídico em *Chlorella fusca*, atingindo 23% BS, mas não na

cianobactéria *Synechococcus nidulans* (DUARTE; COSTA, 2018). Já em *Chlorella sp.*, o cultivo em luz branca resultou em maior conteúdo lipídico (15 % BS) do que em luz vermelha (~ 14% BS) ou azul (~ 10% BS). Entretanto, a luz azul induziu maior acúmulo de ácidos graxos saturados do que as outras cores de luz (LI *et al.*, 2019). Isto evidencia o impacto das manipulações bioquímicas na qualidade de biomoléculas produzidas; dependendo da aplicação da biomassa microalgal, o perfil bioquímico deve ser considerado. Com uma produção lipídica de 80% BS equivalente a 4x mais do que nos controles, o cobre foi indutor da síntese de lipídeos em *C. braunii*, sendo uma condição promissora para uso de sua biomassa no setor energético.

A respeito dos carotenoides, observa-se que a qualidade de luz foi responsável pela concentração dessas biomoléculas na luz azul e branca, e redução na luz vermelha, não tendo qualquer relação com o cobre. Enzimas envolvidas na síntese de pigmentos e fotorrespiração têm seus substratos e cofatores influenciados positivamente pela luz azul, acelerando o ciclo celular (RUYTERS, 1984). Assim como aqui observado para *C. braunii*, *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa*, *S. quadricauda* e *S. obliquus* apresentaram maiores quantidades de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*, e o carotenoide luteína) quando cultivadas sob luz azul em comparação à luz branca e vermelha (ZHONG; JIN; CHENG, 2018). Esses autores apontam que nas microalgas, ao se adaptarem à qualidade de luz, os pigmentos que possuem comprimentos de onda similares ao espectro da luz fornecido no cultivo têm sua regulação favorecida.

A luz vermelha prejudicou a síntese de pigmentos em *C. braunii*. Dentre as qualidades de luz utilizadas neste estudo, a luz vermelha é a que fornece menor energia, logo, menor quantidade de fótons, os quais, na fotossíntese, são utilizados pelos pigmentos no complexo antena, que desempenha um papel na absorção de luz (TORRES-FRANCO *et al.*, 2021; STÄBLEIN *et al.*, 2021). Portanto, hipotetizamos que a maior razão clorofila *a* por clorofila *b*, obtida para os tratamentos com luz vermelha, sugere uma adaptação para maximizar a captação de luz, que modificou a composição de pigmentos do complexo antena nos cloroplastos, visto que nas reações fotoquímicas, a clorofila *a* é o pigmento de principal atuação (STÄBLEIN *et al.*, 2021).

7. Conclusões

Este estudo mostrou que a microalga Chlorophyta *Chlorolobion braunii* é uma cepa promissora para o setor energético, produzindo cerca de 25% de sua biomassa seca como lipídeos na condição controle. Mediante manipulação das condições de cultivo, sem interferir

na taxa de crescimento, a cepa produziu cerca de 80% da biomassa seca como óleo. A manipulação bioquímica constou da adição de 5×10^{-7} mol.L⁻¹ cobre, independente da cor de luz. Esse resultado sugere o papel dos lipídeos como reserva energética preferencial em *Chlorolobion braunii*.

O efeito hormese foi demonstrado na combinação de 5×10^{-7} mol.L⁻¹ cobre e luz vermelha, o qual promoveu um aumento de ~ 165% no teor de proteínas em relação ao controle na mesma qualidade de luz.

A luz vermelha prejudicou a síntese de carboidratos e pigmentos em *C. braunii*, condição na qual uma adaptação na composição bioquímica e na função de captação de luz pode ter ocorrido nas células da microalga.

As manipulações bioquímicas empregadas neste trabalho, em geral, não afetaram os parâmetros fotossintéticos da microalga, com rendimentos máximos próximos a 0,70 e efetivos 0,50, apenas os decaimentos fotoquímicos foram afetados, podendo ser consequência da energia fornecida pelas luzes branca e azul.

Com taxa de crescimento específica elevada (~ 1,0 d⁻¹) na condição da produção de otimizada de óleos, crescimento em intensidade de luz relativamente elevada, 300 μ mol fótons m⁻² s⁻¹, e condições de CO₂ controladas, esta cepa de *Chlorolobion braunii* pode ser considerada vigorosa e indicada para cultivos ampliados.

8. Referências

- ABIUSI, F., SAMPIETRO, G., MARTURANO, G., BIONDI, N., Rodolfi, L., D'OTTAVIO, M., & TREDICI, M. R. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and bioengineering*, v. 111, n. 5, p. 956-964, 2014.
- AFKAR E., ABABNA H., FATHI A. (2010) Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals. *American J. Environmental Sciences* 6: 230–237.
- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.
- ALHO, Lays de Oliveira Gonçalves; SOUZA, Jaqueline Pérola; ROCHA, Giseli Swerts; MANSANO, Adrislaine da Silva; LOMBARDI, Ana Teresa; SARMENTO, Hugo; MELÃO, Maria da Graça Gama. Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper

- oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114856, 2020.
- AL-QASMI, Maryam; RAUT, Nitin; TALEBI, Sahar; AL-RAJHI, Sara; AL-BARWANI, Tahir. A Review of Effect of Light on Microalgae Growth. **Proceedings of the World Congress on Engineering**, v. 1, 2012.
- ASLAM, Ambreen; FAZAL, Tahir; ZAMAN, Qamar uz; SHAN, Ali; REHMAN, Fahad; IQBAL, Javed; RASHID, Naim; UR REHMAN, Muhammad Saif. Biorefinery of Microalgae for Nonfuel Products. *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 197–209.
- BAER, Sascha; HEINING, Martin; SCHWERNA, Philipp; BUCHHOLZ, Rainer; HÜBNER, Holger. Optimization of spectral light quality for growth and product formation in different microalgae using a continuous photobioreactor. *Algal Research*, vol. 14, p. 109–115, 2016.
- BAIDYA, Arpan; AKTER, Taslima; ISLAM, Md Rabiul; SHAH, A. K. M. Azad; HOSSAIN, Md Amzad; SALAM, Mohammad Abdus; PAUL, Sulav Indra. Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. *Heliyon*, vol. 7, no. 12, 2021.
- BALASUBRAMANIAM, Vimala; GUNASEGAVAN, Rathi Devi-Nair; MUSTAR, Suraiami; LEE, June Chelyn; MOHD NOH, Mohd Fairulnizal. Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules*, v. 26, n. 4, p. 943, 2021.
- BARACHO, Douglas H.; SILVA, Jaqueline C.; LOMBARDI, Ana T. The effects of copper on photosynthesis and biomolecules yield in *Chlorolobion braunii*. *Journal of Phycology*, v. 55, n. 6, p. 1335–1347, 2019.
- BARKIA, Ines; SAARI, Nazamid; MANNING, Schonna R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs*, v. 17, n. 5, p. 304, 2019.
- BEAUVAIS-FLÜCK, Rebecca; SLAVEYKOVA, Vera I.; COSIO, Claudia. Comparative study of Cu uptake and early transcriptome responses in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* and the macrophyte *Elodea nuttallii*. **Environmental Pollution**, v. 250, p. 331–337, 2019.
- BIALON, Johannes; RATH, Thomas. Growth rates and photon efficiency of *Chlorella vulgaris* in relation to photon absorption rates under different LED-types. *Algal Research*, vol. 31, p. 204–215, 2018.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BREUER, G., DE JAEGER, L., ARTUS, V. G., MARTENS, J. S., SPRINGER, J., DRAAISMA, R. B., EGGINK, G., WIJFELLS, R. H., LAMERS, P. P. Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (II) evaluation of TAG yield and productivity in controlled photobioreactors. **Biotechnol Biofuels**, v. 7, n. 70, p.1-11, 2014.

- BOSSUYT, Bart T.A.; JANSSEN, Colin R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology*, vol. 68, no. 1, p. 61–74, 2004.
- CHELONI, Giulia; COSIO, Claudia; SLAVEYKOVA, Vera I. Antagonistic and synergistic effects of light irradiation on the effects of copper on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, v. 155, p. 275–282, 2014.
- CHEN, Hua-Bing; WU, Jiun-Yan; WANG, Chin-Feng; FU, Chun-Chong; SHIEH, Chwen-Jen; CHEN, Chih-I; WANG, Chih-Yu; LIU, Yung-Chuan. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 53, no. 1, p. 52–56, 2010b.
- CHEN, Zunwei; SONG, Shufang; WEN, Yuezhong; ZOU, Yuqin; LIU, Hui. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, no. 18, p. 17910–17918, 2016.
- CHEN, Bailing; WAN, Chun; MEHMOOD, Muhammad Aamer; CHANG, Jo-Shu; BAI, Fengwu; ZHAO, Xinqing. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. ***Bioresource Technology***, v. 244, p. 1198–1206, 2017.
- CHIA, MATHIAS A.; LOMBARDI, ANA T.; MELAO, MARIA DA GRACA G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 85, no. 4, p. 1427–1438, 2013.
- CHIA, M. A., LOMBARDI, A. T., MELÃO, M. G. G., PARRISH, C. C. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). ***Aquatic Toxicology***, v. 160, n. 1, p. 87-95, 2015.
- DAS, Probir; LEI, Wang; AZIZ, Siti Sarah; OBBARD, Jeffrey Philip. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. ***Bioresource Technology***, v. 102, n. 4, p. 3883–3887, 2011.
- DAUDA, Suleiman. Physiological responses of chlorophyta microalgae under environmentally relevant copper concentrations: biomolecules, oxidative stress and photosynthesis. 2022. 84 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2022.
- DA FONTOURA PRATES, Denise; DUARTE, Jessica Hartwig; VENDRUSCOLO, Raquel Guidetti; WAGNER, Roger; BALLUS, Cristiano Augusto; DA SILVA OLIVEIRA, Wellington; GODOY, Helena Teixeira; BARCIA, Milene Teixeira; DE MORAIS, Michele Greque; RADMANN, Elisângela Martha; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Role of light emitting diode (LED) wavelengths on increase of protein productivity and free amino acid profile of *Spirulina sp.* cultures. ***Bioresource Technology***, vol. 306, p. 123184, Jun. 2020.

- DEBELIUS, Bibiana; FORJA, Jesús M.; DELVALLS, Ángel; LUBIÁN, Luis M. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 5, p. 1503–1513, 2009.
- DUARTE, Jessica Hartwig; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Blue light emitting diodes (LEDs) as an energy source in *Chlorella fusca* and *Synechococcus nidulans* cultures. *Bioresource Technology*, vol. 247, p. 1242–1245, 2018.
- DOLGANYUK, Vyacheslav; BELOVA, Daria; BABICH, Olga; PROSEKOV, Alexander; IVANOVA, Svetlana; KATSEROV, Dmitry; PATYUKOV, Nikolai; SUKHIKH, Stanislav. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, p. 1153, 2020.
- ECHEVESTE, Pedro; SILVA, Jaqueline C.; LOMBARDI, Ana T. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 143, p. 228–235, 2017.
- HERZOG, Howard; GOLOMB, Dan. Carbon Capture and Storage from Fossil Fuel Use. *Encyclopedia of Energy*, vol. 1, p. 1–11, 2004.
- HO, Shih-Hsin; CHAN, Ming-Chang; LIU, Chen-Chun; CHEN, Chun-Yen; LEE, Wen-Lung; LEE, Duu-Jong; CHANG, Jo-Shu. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology*, vol. 152, p. 275–282, Jan. 2014.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New Spectrophotometric Equations for determining Chlorophylls a, b, c and c in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. **Biochem. Physiol. Pflanzen**, p. 191–194, 1975.
- JIANG, Y., YOSHIDA, T., QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, 2012.
- JUNEAU, Philippe.; BERDEY, A. EL; POPOVIC, R. Environmental Contamination and PAM Fluorometry in the Determination of the Sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to Copper. v. 164, p. 155–164, 2002.
- KASSIM, Mohd Asyraf; MENG, Tan Keang. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Science of The Total Environment*, vol. 584-585, p. 1121–1129, 2017.
- KEELING, Patrick J. The Number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, n. 1, p. 583–607, 2013.
- KOYANDE, Apurav Krishna; SHOW, Pau-Loke; GUO, Ruixin; TANG, Bencan; OGINO, Chiaki; CHANG, Jo-Shu. Bio-processing of algal bio-refinery: a review on current advances and future perspectives. *Bioengineered*, v. 10, n. 1, p. 574–592, 2019.
- K. Y. LIM, David; M. SCHENK, Peer. Microalgae selection and improvement as oil crops: GM vs non-GM strain engineering. *AIMS Bioengineering*, v. 4, n. 1, p. 151–161, 2017.

- LEVASSEUR, Wendie; PERRÉ, Patrick; POZZOBON, Victor. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, v. 41, p. 107545, 2020.
- LEVY, Jacqueline L.; STAUBER, Jennifer L.; JOLLEY, Dianne F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Science of The Total Environment*, v. 387, n. 1-3, p. 141–154, 2007.
- LI, Dengjin; YUAN, Yizhong; CHENG, Dujia; ZHAO, Quanyu. Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10. *Bioresource Technology*, vol. 291, p. 121783, 2019.
- LOMBARDI, Ana T.; HIDALGO, Thais M. R.; VIEIRA, Armando A. H.; SARTORI, Antonio L. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia*, v. 46, n. 1, p. 74–78, 2007.
- LOMBARDI, Ana T.; VIEIRA, Armando A. H. Copper complexation by Cyanophyta and Chlorophyta exudates. *Phycologia*, v. 39, n. 2, p. 118–125, 2000.
- LOMBARDI, Ana T.; MALDONADO, Maria T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis Research*, v. 108, n. 1, p. 77–87, 2011.
- MARKOU, Giorgos. 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*, vol. 172, no. 5, p. 2758–2768, 17 Jan. 2014.
- MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
- MATTSON, Mark P.; CALABRESE, Edward J. *Hormesis: A Revolution in Biology, Toxicology and Medicine*. [S.l.]: Humana Press, 2010.
- MC GEE, Dónal; ARCHER, Lorraine; FLEMING, Gerard T. A.; GILLESPIE, Eoin; TOUZET, Nicolas. Influence of spectral intensity and quality of LED lighting on photoacclimation, carbon allocation and high-value pigments in microalgae. *Photosynthesis Research*, vol. 143, no. 1, p. 67–80, 8 Nov. 2019.
- MIAZEK, Krystian; IWANEK, Waldemar; REMACLE, Claire; RICHEL, Aurore; GOFFIN, Dorothee. Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 10, p. 23929–23969, 2015.
- NAPAN, Katerine; TENG, Lihong; QUINN, Jason C.; WOOD, Byard D. Impact of heavy metals from flue gas integration with microalgae production. *Algal Research*, vol. 8, p. 83–88, 2015.
- OLLE, Margit; VIRŠILE, Akvile. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. *Agricultural and Food Science*, v. 22, n. 2, p. 223–234, 2013.

- PARRISH, Christopher C. Determination of Total Lipid, Lipid Classes, and Fatty Acids in Aquatic Samples. **Lipids in Freshwater Ecosystems**, p. 4–20, 1 Jan. 1999. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0_2. Accessed on: 7 Jul. 2023.
- PILON, Laurent; BERBEROĞLU, Halil; KANDILIAN, Razmig. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, v. 112, n. 17, p. 2639–2660, 2011.
- PLATT, T., GALLEGOS, C. L., HARRISON, W. G. (1980). Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. mar Res.* 38: 687-701.
- RA, Chae-Hun; KANG, Chang-Han; JUNG, Jang-Hyun; JEONG, Gwi-Taek; KIM, Sung-Koo. 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.
- RAMANNA, Luveshan; RAWAT, Ismail; BUX, Faizal. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 80, p. 765–773, 2017.
- RAN, Wenyi; WANG, Haitao; LIU, Yinghui; QI, Man; XIANG, Qi; YAO, Changhong; ZHANG, Yongkui; LAN, Xianqiu. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. *Bioresource Technology*, v. 291, p. 121894, 2019.
- RAUSCH, Thomas. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, v. 78, n. 3, p. 237–251, 1981.
- RIPPKA, Rosmarie; STANIER, Roger Y.; DERUELLES, Josette; HERDMAN, Michael; WATERBURY, John B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.
- RIZWAN, Muhammad; MUJTABA, Ghulam; MEMON, Sheraz Ahmed; LEE, Kisay; RASHID, Naim. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 92, p. 394–404, 2018.
- ROCHA, Giseli S.; PARRISH, Christopher C.; LOMBARDI, Ana T.; DA G. G. MELÃO, Maria. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). *Ecotoxicology*, v. 25, n. 8, p. 1468–1477, 2016.
- ROCHA, Giseli S.; TONIETTO, Alessandra E.; LOMBARDI, Ana T.; MELÃO, Maria da G.G. Effect of copper contaminated food on the life cycle and secondary production of *Daphnia laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 235–242, 2016.
- ROCHA, Giseli S.; PARRISH, Christopher C.; ESPÍNDOLA, Evaldo L.G. Effects of copper on photosynthetic and physiological parameters of a freshwater microalga (Chlorophyceae). *Algal Research*, v. 54, p. 102223, 2021.

- ROY, Uttam K.; NIELSEN, Birthe V.; MILLEDGE, John J. Tuning *Dunaliella tertiolecta* for Enhanced Antioxidant Production by Modification of Culture Conditions. *Marine Biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 482–500, 2021.
- RUMIN, Judith; NICOLAU, Elodie; GONÇALVES DE OLIVEIRA JUNIOR, Raimundo; FUENTES-GRÜNEWALD, Claudio; PICOT, Laurent. Analysis of Scientific Research Driving Microalgae Market Opportunities in Europe. *Marine Drugs*, v. 18, n. 5, p. 264, 2020.
- RUYTERS, G. Effects of Blue Light on Enzymes. *Proceedings in Life Sciences*, p. 283–301, 1984.
- SHARMA, Kalpesh K.; SCHUHMANN, Holger; SCHENK, Peer M. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies*, v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012.
- SALAMA, El-Sayed; KIM, Hyun-Chul; ABOU-SHANAB, Reda A. I.; JI, Min-Kyu; OH, You-Kwan; KIM, Seong-Heon; JEON, Byong-Hun. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, n. 6, p. 827–833, 2013.
- SCHULZE, Peter S.C.; BARREIRA, Luísa A.; PEREIRA, Hugo G.C.; PERALES, José A.; VARELA, João C.S. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014.
- SCHULZE, Christian; STREHLE, Armin; MERDIVAN, Simon; MUNDT, Sabine. Carbohydrates in microalgae: Comparative determination by TLC, LC-MS without derivatization, and the photometric thymol-sulfuric acid method. *Algal Research*, v. 25, p. 372–380, 2017.
- SHOAF, W. Thomas; LIUM, Bruce W. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, v. 21, n. 6, p. 926–928, 1976.
- SILVA, Jaqueline Carmo; ECHEVESTE, Pedro; LOMBARDI, Ana Teresa. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 57–63, 2018.
- SLOCOMBE, Stephen P.; ROSS, Michael; THOMAS, Naomi; MCNEILL, Sharon; STANLEY, Michele S. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, vol. 129, p. 51–57, 2013.
- SPOLJARIC, Dubravka; CIPAK, Ana; HORVATIC, Janja; ANDRISIC, Luka; WAEG, Georg; ZARKOVIC, Neven; JAGANJAC, Morana. Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis. *Aquatic Toxicology*, vol. 105, no. 3-4, p. 552–558, 2011.
- STÄBLEIN, Michael; BARACHO; Douglas Henrique; WATSON, Jamison; SILVA; Jaqueline Carmo; ZHANG, Yuanhui; LOMBARDI, Ana Teresa. Microalgal photosynthetic inhibition and mixotrophic growth in Post Hydrothermal Liquefaction Wastewater (PHW). *Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, vol. 60, p. 102548–102548, 2021.

- SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *Science of the Total Environment*, v. 902 219, n. 2–3, p. 165–181, 1998.
- SURESH KUMAR, K.; DAHMS, Hans-Uwe; WON, Eun-Ji; LEE, Jae-Seong; SHIN, Kyung-Hoon. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 113, p. 329–352, 2015.
- SUZUKI, H., HULATT, C. J., WIJFFELS, R. H. KIRON, V. Growth and LC-PUFA production of the cold-adapted microalga *Koliella antarctica* in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 2, p. 981–997, 2018.
- TEO, Chee Loong; ATTA, Madiha; BUKHARI, Attaullah; TAISIR, Mohamad; YUSUF, Afendi M.; IDRIS, Ani. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*, vol. 162, p. 38–44, 2014.
- TORRES-FRANCO, Andrés Felipe; SILVA, Gabriela; PASCOAL FREITAS, Matheu; PASSOS, Fabiana; MOTA, Cesar R; CUNHA FIGUEREDO, Cleber. Effect of digestate loading rates on microalgae-based treatment under low LED light intensity. *Environmental Technology*, vol. 43, no. 20, p. 3023–3036, 2021.
- WAN, Jun-Kit; CHU, Wan-Loy; KOK, Yih-Yih; CHEONG, Kok-Whye. Assessing the toxicity of copper oxide nanoparticles and copper sulfate in a tropical *Chlorella*. *Journal of Applied Phycology*, v. 30, n. 6, p. 3153–3165, 2018.
- WILLIAMS, V. R.; MCMILLAN, R. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. *Science*, v. 133, n. 3451, p. 459–460, 17 Feb. 1961.
- WELLBURN, Alan R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.
- YADAVALLI, Rajasri; ASUTHKAR, Mounica; GUNTI, Yamini; RAO S, Ramgopal; RAO, C S. EFFECT OF DIFFERENT WAVELENGTHS OF LIGHT ON THE GROWTH OF *CHLORELLA PYRENOIDOSA*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 13, no. 2, p. 116, 2016.
- YAN, Cheng; ZHANG, Li; LUO, Xingzhang; ZHENG, Zheng. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. *Ecological Engineering*, vol. 51, p. 24–32, Feb. 2013.
- YANG, JinShui; CAO, Jing; XING, GuanLan; YUAN, HongLi. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, vol. 175, p. 537–544, 2015.
- ZHAO, Yongjun; SUN, Shiqing; HU, Changwei; ZHANG, Hui; XU, Jie; PING, Lifeng. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various

mixed light-emitting diode light wavelengths. *Bioresource Technology*, vol. 187, p. 338–345, 2015.

ZHONG, Yu; JIN, Peng; CHENG, Jay J. A comprehensive comparable study of the physiological properties of four microalgal species under different light wavelength conditions. *Planta*, vol. 248, no. 2, p. 489–498, 2018.