**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**ESCOLA POLITÉCNICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL**

**SONIA MILENA VILLAMIZAR GÓMEZ**

# CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENÓIDES E LIPIDEOS DE MICROALGAS *IN VIVO* UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

**SALVADOR, BAHIA**

**2013**

**SONIA MILENA VILLAMIZAR GÓMEZ**

# CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENÓIDES E LIPIDEOS DE MICROALGAS *IN VIVO* UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia–UFBA, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia Industrial

Orientadores:
Prof. Dr. Emerson Andrade Sales
Prof. Dr. Marcus Vinicius Santos da Silva

**SALVADOR, BAHIA**

**2013**

**CARACTERIZAÇÃO DE CAROTENÓIDES E LIPIDEOS DE MICROALGAS *IN-VIVO* UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN**

**SONIA MILENA VILLAMIZAR GOMEZ**

Dissertação submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Engenharia Industrial.

Examinada por:

Prof. Emerson Andrade Sales _____
Pós-Doutorado em Ciências Exatas e da Terra, Université Toulouse III Paul Sabatier, Fraça, 2008;

Prof. Marcus Vinicius Santos da Silva _____
Doutor em Física, UFBA, Brasil, 2010;

Prof. Louisa Wessels Perelo _____
Doutor em Biologia, TUM, Alemanha, 2003;

Prof. André Bellin Mariano _____
Doutor em Ciências (Bioquímica) UFPR, Brasil, 2005;

Salvador, BA - BRASIL
Setembro/2013

## AGRADECIMENTOS

A minha amada família, meus pais e meus irmãos, que sempre longe ou perto eu posso contar com sua ajuda e amor, pois mesmo longe nunca pensei que estava sozinha. A Tiago Barbosa, por estar ao meu lado com muita paciência e sempre pensando na minha felicidade e tranqüilidade. A minha querida amiga Sara Ines Parra, por sua amizade e comprometimento. A Manuel Jose Saltarin, por ser um compatriota amigo e colega não só de aula, mas também de aventuras na investida de explorar juntos este lindo país juntos com suas dificuldades de idioma e costumes. A Dominique Silveira da Hora, por me abrir as portas de sua casa, sua família e se preocupar tanto comigo, pelos tantos momentos compartilhados. A Emma Lyngedal, por sua amizade, companhia, ajuda e por tantos momentos felizes e um carinho sincero.

Agradeço profundamente a meus companheiros do LABEC, Louise Lins Sousa, Cíntia Jesus Almeida, Dominique Silveira da Hora, Camila Andrade, Nádia Carmo dos Santos e Darlan Azevedo Pereira, pelos conselhos, apoio acadêmico, pelas várias vezes que com vontade ou sem leram e releram a minha dissertação,pela consideração e amizade, por me fazerem sentir como uma parte importante de vocês e por ser ótimos professores de português.

Aos Professores: Cristian Blanco Tirado, Enrique Mejia Ospino, Rafael Cabanzo Hernandez, já que com eles teve a introdução na área de pesquisa com espectroscopia. Ao Professor Emerson Andrade Sales, por ter dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, e ter depositado sua confiança nas minhas capacidades acadêmicas. Ao Professor Marcus Vinicius Santos, por toda sua paciência, pela sua ajuda e todo o aprendizado que tenho sobre espectroscopia Raman e Fotoacústica. Ao Dr Orlando Jorquera pelos aportes realizados neste trabalho.

Ao laboratório LAMUME (Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica) do Instituto de Física da UFBA, por me permitir a realização deste trabalho de mestrado.

VILLAMIZAR, G. Sonia Milena. Caracterização de carotenóides e lipídeos de microalgas in-vivo utilizando espectroscopia Raman. 76 f. il. 2013. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## RESUMO

Neste trabalho duas espécies de microalgas, *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp*, foram caracterizadas quanto ao conteúdo de carotenóides e lipídeos utilizando espectroscopia Raman como método de análise *in-vivo*. Os principais sinais para identificação dos carotenóides foram de flexão C-H (1008 $cm^{-1}$), tensão da ligação C-C (1155 $cm^{-1}$) e tensão da ligação C=C (1524 $cm^{-1}$). Foram identificados sinais harmônicos destas mesmas vibrações na região de 2312 $cm^{-1}$ e 2667 $cm^{-1}$. Para lipídeos, os principais sinais gerados pelas vibrações intermoleculares foram deformação no plano *cis* da ligação=C-H(1266 $cm^{-1}$), movimento de torque $CH_2$ (1302 $cm^{-1}$), vibração tipo tesoura do $CH_2$ (1443 $cm^{-1}$), vibração de extensão *cis* C=C (1660 $cm^{-1}$), vibração de extensão C=O (1748 $cm^{-1}$), e vibração de extensão C-H (2845-3107 $cm^{-1}$). Após identificados dos sinais de interesse, foram determinados os fatores que influenciam positiva e negativamente a intensidade dos sinais Raman. Para esta análise foi levado em consideração o esgotamento dos nutrientes ao longo dos dias de cultivo. Outro fator estudado foi a influência do tempo de exposição ao laser, assim como a variabilidade da intensidade dos sinais entre células do mesmo meio de cultura. A partir dos resultados, concluiu-se que o esgotamento dos nutrientes gera um aumento na intensidade dos sinais. Em relação ao efeito do tempo de exposição ao laser, quando se aumenta o tempo de exposição diminui a intensidade dos sinais. Através da espectroscopia Raman, foi possível quantificar a concentração máxima de 8,4% de carotenóides presentes na espécie de microalga *Haematococcus pluvialis*.

PALAVRAS-CHAVE: Caracterização, quantificação, espectroscopia Raman, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis sp*.

VILLAMIZAR, G. Sonia Milena. Characterization of carotenoids and lipids from microalgae in-vivo using Raman spectroscopy. 76 f. il. 2013. Master Dissertation – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

## ABSTRACT

In this study *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp* were characterized according the carotenoid and lipid content using Raman spectroscopy as a method of analysis *in vivo*. The main signals for identifying the carotenoids were flexion C-H (1008 $cm^{-1}$), stretching C-C (1155 $cm^{-1}$) and stretching C=C (1524 $cm^{-1}$). It was identified harmonic signs of these same vibrations on 2312$cm^{-1}$ and 2667$cm^{-1}$regions. For lipids, the main signals generated by intermolecular vibrations were in plane deformation *cis* =C−H (1266 $cm^{-1}$), twisting motion $CH_2$ (1302 $cm^{-1}$), scissoring deformation $CH_2$ (1443 $cm^{-1}$), stretching C=C (1660 $cm^{-1}$), stretching C=O (1748 $cm^{-1}$) and stretching C-H (2845-3107 $cm^{-1}$). After identified the signals of interest, the factors that may influence positively and negatively the intensity of the Raman signals were determined. For this analysis was taken into account the depletion of nutrients throughout the days of cultivation. Another factor evaluated was the influence of the time of laser exposure, as well as the variability of intensity of signals between cells of the same culture medium. The results show the depletion of nutrients leads to an increase in the intensity of the signals. It was observed that increasing the exposure time it decreases the signal strength. Using Raman spectroscopy it was possible to quantify the maximum concentration of 8.4% of carotenoids present in the species of microalgae *Haematococcus pluvialis*.

KEYWORDS: Carotenoids, Raman spectroscopy, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis sp*.

**LISTA DE FIGURAS**

Fig. 1: Bioprodutos potenciais obtidos de microalgas. ..... 19
Fig. 2: Esquema da reação de transesterificação para produção de biodiesel. 20
Fig. 3: a) Estrutura da astaxantina, b) estrutura do β-caroteno ..... 21
Fig. 4: Diagrama dos mecanismos de espalhamento Raman..... 28
Fig. 5: Regiões espectrais de alguns grupos funcionais característicos. ..... 30
Fig. 6: Fotografia da célula onde foi utilizado o corante *NileRed*. ..... 33
Fig. 7: Fotografia da célula *Trachydis cusminutus*. ..... 35
Fig. 8: Esquema da metodologia do trabalho de Tsung-Hua Lee, et. al. ..... 36
Fig. 9: Espectros Raman da microalga *Chlorella vulgaris* ..... 37
Fig. 10: Disposição dos Erlenmeyer na prateleira. ..... 41
Fig. 11: Esquema do espectrômetro Raman (JASCO NRS-5100)..... 43
Fig. 12: Fotografia do espectrômetro Raman utilizado nas análises. ..... 43
Fig. 13: Curvas de crescimento das espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp* ..... 47
Fig. 14: Espectros Raman da biomassa seca e úmida de microalgas ..... 48
Fig. 15: Fotografia dos cultivos de microalgas no dia 10, após o estresse por esgotamento de nutrientes. ..... 49
Fig. 16: Espectros Raman de (1) astaxantina; (2) β-caroteno ..... 52
Fig. 17: Esquema dos estádios da biossíntese de carotenóides. ..... 53
Fig. 18: Espectro Raman de ômega-3, e óleos de milho, girassol, soja, canola e oliva. ..... 54
Fig. 19: Espectros Raman de amostras comerciais de ômega-3 e óleo de soja. ..... 56
Fig. 20: Espectros Raman dos padrões: a) β-caroteno, b) Ácido oleico. ..... 57
Fig. 21: Espectros Raman de: a) microalga *Nannochloropsis sp*; b) microalga *Haematococcus pluvialis*; c) β-caroteno; d) ácido oleico ..... 58
Fig. 22: Espectros Raman da espécie *Nannochloropsis sp*, para diferentes dias ..... 60
Fig. 23: Espectros Raman da espécie *Haematococcus pluvialis*, para diferentes dias..... 61
Fig. 24: Espectros Raman da espécie *Haematococcus pluvialis*com diferentes tempos de exposição ao laser. ..... 62
Fig. 25: a) Espectros Raman de 43 células de *Haematococcus pluvialis*; b) histogramas do sinal em 1524 $cm^{-1}$ ..... 64
Fig. 26: a) Espectros Raman de amostras de biomassa após extração; b)histogramas do sinal em 1524 $cm^{-1}$ ..... 65
Fig. 27: a) Espectros Raman de extrato de carotenóides; b) histogramas do sinal em 1524 $cm^{-1}$ ..... 67

Fig. 28: Espectros Raman do padrão de β-caroteno em diferentes concentrações ..... 68
Fig. 29: Curva de calibração do sinal Raman das soluções de β-caroteno..... 69
Fig. 30: Espectros Raman de quatro células da espécie *Haematococcus pluvialis* ..... 70

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1: Conteúdo de óleo em peso seco de algumas espécies de microalgas.....17
Tabela 3. 2: Comparação da espectroscopia Raman, infravermelho perto e meio. ..... 31
Tabela 3. 3: Sinais Raman do β-caroteno e lipídeos..... 35
Tabela 4.1: Meio de cultura utilizado para a espécie *Nannochloropsis sp*. ..... 39
Tabela 4.2: Solução de vitaminas, dissolver as três vitaminas em 1L de água destilada. ..... 40
Tabela 4.3: Meio de cultura para a espécie *Haematococcus pluvialis* ..... 40
Tabela 4.4: Solução estoque de metais utilizado na espécie *Haematococcus pluvialis*. ..... 40
Tabela 4.5: Sinais Raman de carotenóides e lipídeos encontrados nas microalgas analisadas in-vivo..... 45
Tabela 5.1 Sinais Raman dos lipídeos..... 52

**SUMÁRIO**

INTRODUÇÃO ..... 12
2. Objetivo Geral ..... 15
2.1. Objetivos Específicos ..... 15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 16
3.1 O biodiesel ..... 16
3.2 As microalgas ..... 17
3.3 Métodos de caracterização e quantificação utilizados ..... 23
3.3.1 Espectroscopia Raman ..... 26
3.3.1.1 Princípio físico ..... 27
3.3.1.2 Características da espectroscopia Raman ..... 29
3.3.1.3 Vantagens e desvantagens ..... 30
3.3.1.4 Estudos publicados utilizando espectroscopia Raman ..... 31
4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 39
4.1 microalgas e condições de cultura ..... 39
4.2 Preparação do inóculo ..... 40
4.2.1 *Nannochloropsis sp* ..... 41
4.2.2 *Haematococcus pluvialis* ..... 42
4.3 Espectroscopia Raman como método de caracterização e quantificação de lipídeos e carotenóides. ..... 42
4.3.1 Análise da biomassa. ..... 44
4.3.2 Caracterização dos lipídeos e carotenóides. ..... 44
4.3.3 Quantificação de carotenóides. ..... 45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 48
5.1 Curvas de crescimento das microalgas ..... 48
5.2 Caracterização de lipídeos e carotenóides ..... 51
5.2.1 Caracterização de carotenóides: ..... 51
5.2.2 Caracterização de lipídeos: ..... 53
5.3 Fatores que influenciam a intensidade do sinal Raman nas microalgas. 59
5.3.1 Efeitos do esgotamento dos nutrientes nos espectros Raman ..... 59
5.3.2 Efeito do tempo de exposição ao laser nos espectros Raman ..... 62
5.3.3 Efeito da variabilidade da intensidade dos sinais em células individuais do meio de cultura. ..... 63

5.4 Quantificação de carotenoides ..... 68
6. CONCLUSÕES ..... 71
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ..... 73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 74

## INTRODUÇÃO

O petróleo ocupa um papel importante no desenvolvimento da sociedade, já que muitos dos produtos oferecidos para a população são derivados do petróleo e o transporte global utiliza preferencialmente este combustível fóssil. O ritmo de crescimento da população e o desenvolvimento econômico fazem do petróleo uma fonte limitada de energia, e segundo dados recentes [1], as reservas de combustível estão chegando ao limite, gerando um aumento no seu custo. Por outro lado, o processo de obtenção e refinamento do petróleo gera um impacto negativo ao meio ambiente [2]. Devido a isto, pesquisas que tem como finalidade a obtenção de novas fontes de combustíveis estão se desenvolvendo há varias décadas, visando atender a demanda energética global como baixo impacto ao meio ambiente, com o fim de garantir a energia para as gerações futuras, sem comprometer a qualidade da biosfera.

Neste contexto, se destacam os cultivos de plantas oleaginosas como o milho, canola, girassol. No entanto, este tipo de plantação não gera quantidades elevadas de biocombustíveis, e não supre completamente as necessidades energéticas de uma região, e por outro lado requerem grandes extensões de terra, diminuindo assim a capacidade de produção agrícola para o consumo humano, gerando conflitos relacionados ao uso da terra, [2-3].

As microalgas comparadas a estas matérias-primas não requerem muito espaço para seu cultivo e podem ser cultivadas em dois sistemas principais: lagoas abertas e fotobioreatores. A depender da espécie e das condições iniciais de cultura, as microalgas podem acumular biomassa com um alto conteúdo de lipídeos e ácidos graxos, componentes fundamentais para a produção de biocombustíveis [4]. Além de ser uma excelente fonte de óleos, as microalgas também contêm uma infinidade de moléculas que podem servir de insumo para a indústria química, com possibilidade de substituir as fontes atuais [5]. Portanto,

é imperativo de desenvolver métodos de caracterização e quantificação para a biomassa de microalgas que atendem a estes objetivos.

A produção e acumulação de lipídeos neutros pelas microalgas podem ser aproveitadas para a produção de biodiesel através da reação de transesterificação. Assim, torna-se fundamental a caracterização e quantificação de lipídeos em microalgas [6].

Alguns estudos reportados na literatura utilizam processos de extração por solvente para a quantificação de lipídeos. Estes métodos requerem quantidades significativas de biomassa,e um pré-tratamento das amostras para a posterior análise do extrato utilizando técnicas instrumentais como cromatografia de gases ou espectrometria de massas, técnica de alto custo [1].

Outros estudos sugerem o uso de corantes como *NileRed* para identificar a acumulação de lipídeos neutros diretamente sobre a célula utilizando a espectroscopia de fluorescência. No entanto, neste método pode variar a eficiência do *NileRed* como corante em algumas espécies de microalgas além de não dar uma resposta quantitativa, o que faz com que esta técnica só seja útil na identificação dos lipídeos neutros [1].

Recentemente, a dispersão Raman, que é uma técnica de espectroscopia vibracional utilizada comumente como complemento da espectroscopia infravermelha, vem sendo utilizada para caracterizar e quantificar lipídeos e carotenóides provenientes das microalgas, já que com os avanços da tecnologia tem se desenvolvido espectrômetros com microscópio acoplado que permitem obter espectros e imagens das amostras em frações de segundos.

No caso das microalgas, este método permite não só identificar o sinal dos lipídeos a nível celular, como também dos carotenóides e carboidratos, sem precisar da acumulação de biomassa para seguidamente fazer processos de extração com solventes, o que faz desta técnica espectroscópica uma ferramenta que permite desenvolver métodos de análises mais completos e rápidos em comparação aos métodos comumente utilizados [6].

Neste projeto foi utilizada a espectroscopia Raman como método para caracterizar carotenóides e lipídeos de microalgas porque é uma técnica instrumental fácil e rápida, pois não exige pré-tratamento das amostras para se obter os espectros e requer quantidades pequenas de amostras. Foram escolhidas as espécies de microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp,* porque apresentam um alto teor de carotenóides e lipídeos respectivamente. Favorecendo a produção de biocombustíveis. E se estima que no futuro a metodologia exposta neste trabalho possa ser utilizada para outras espécies de microalgas.

## 2. Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método de análise para caracterizar lipídeos e carotenóides e quantificar carotenóides em microalgas *in vivo*.

### 2.1. Objetivos Específicos

1. Caracterizar lipídeos neutros na espécie de microalga *Nannochloropsis sp,* usando espectroscopia Raman;
2. Caracterizar e quantificar carotenóides na espécie de microalga *Haematococcus pluvialis,* usando espectroscopia Raman;
3. Analisar os fatores que influenciam os espectros Raman;

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A base energética do desenvolvimento apoia-se fortemente no uso do petróleo que é altamente poluente desde sua extração até seu produto final e seu consumo, o que gera um impacto negativo no meio ambiente, e não é uma fonte de energia renovável. As microalgas surgem como uma boa alternativa para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos devido a sua alta capacidade de produção e acumulação de lipídeos e carotenóides e também à alta taxa de crescimento fotossintético onde cerca de 3 a 8% da energia solar pode ser transformada em biomassa, enquanto que este rendimento é de aproximadamente 0,5% para vegetais superiores [7].

### 3.1 O biodiesel

Quimicamente o biodiesel é formado por ésteres de ácidos graxos obtidos a partir do processo de esterificação ou transesterificação de óleos vegetais e animais. A transesterificação é uma reação química na qual os lipídeos reagem com um álcool geralmente na presença de um catalisador [8]. O principal motivo pelo qual os óleos vegetais não podem ser usados diretamente nos motores a diesel como combustíveis é sua viscosidade, porque é maior que a do petróleo; os ésteres de ácidos graxos obtidos na reação de transesterificação apresentam viscosidade e poder calorífico compatíveis com estes motores.

Os biocombustíveis estão tomando importância no âmbito ambiental e econômico devido ao fato que surgem como uma tentativa de energia limpa e renovável que pode substituir parcial ou totalmente os combustíveis derivados do petróleo ou outras fontes não renováveis.

Nos estudos de produção de biocombustíveis diversas fontes vegetais estão sendo continuamente pesquisadas, segundo o site biodieselbr, “Em 1980, o Conselho Nacional de Energia, instituiu o programa nacional de produção de

óleos vegetais para fins energéticos (Proóleo). Dentro das políticas desta resolução buscava-se substituir óleo diesel por óleos vegetais em mistura de até 30% em volume e incentivar a pesquisa tecnológica para promover a produção de óleos vegetais nas diferentes regiões do país. Neste período, o Brasil produzia 15% do petróleo consumido e o preço internacional do combustível se cotou como dos mais elevados de toda a história, o que motivou a continuação das pesquisas sobre biocombustíveis, principalmente" [9].

Nos primeiros anos, as pesquisas no Brasil foram focadas no óleo de soja, e com o tempo se fizeram estudos com óleos de amendoim, canola e girassol. O objetivo era produzir 1,6 milhão de metros cúbicos de óleos para fins energéticos em cinco anos, mas a viabilidade econômica destes combustíveis era questionável, já que o tempo de cultivo e o processamento da matéria prima aumenta consideravelmente o custo do biocombustível. Com a queda dos preços do petróleo a partir de 1985, a viabilidade econômica ficou ainda mais prejudicada e este programa foi progressivamente esvaziado, embora oficialmente não tenha sido desativado.

### 3.2 As microalgas

As microalgas são organismos unicelulares que existem individualmente ou em grupos, e fazem parte da cadeia alimentar como produtores primários em rios e mares, e em conjunto com outros tipos de microorganismos são conhecidos como plankton. Além de ser um grupo diversificado, as microalgas são consideradas um grupo de organismos altamente especializados,capazes de sobreviver em uma variedade de condições extremas como: temperatura, luminosidade, salinidade, agentes contaminantes industriais e domésticos, entre outros [10].

As microalgas são reconhecidas por sua versatilidade biotecnológica, já que contem na sua composição ácidos graxos, carboidratos, pigmentos, proteínas e vitaminas, tornando-se uma fonte importante de bioprodutos utilizados na indústria alimentar humana e animal assim como também da indústria farmacêutica, cosmética e de biocombustíveis [11].

Graças às suas características, estes organismos possuem uma alta taxa de crescimento quando comparadas com outras espécies vegetais. As microalgas podem ser cultivadas em espaços fechados como fotobioreatores ou em sistemas abertos como lagoas abertas, possibilitando a utilização de vários tipos de água para sua cultura.

As microalgas são microrganismos com uma alta capacidade de produção de óleo, alcançando até 77% de seu peso seco a depender da espécie. Esta característica torna as microalgas uma matéria-prima com alto potencial para a produção de biodiesel. A Tabela 3.1 apresenta uma lista de microalgas e seu teor de lipídeos em peso seco.

Tabela 3.1: Conteúdo de óleo em peso seco de algumas espécies de microalgas [10,11].

| **Espécie** | **Conteúdo de óleo (% peso seco)** |
|---|---|
| *Chorella sp* | 28-32 |
| *Nannochloropsis sp* | 31-68 |
| *Neochloris oleoabundans* | 35-54 |

Além do potencial das microalgas para produzir e acumular óleos e outros bioprodutos, também são estudadas porque elas contribuem na solução de problemas ambientais como o efeito estufa e a contaminação de fontes hídricas por poluição industrial, devido a que as microalgas tem a capacidade de fixar o $CO_2$ durante o processo de fotossíntese. Adicionalmente, as microalgas também possuem a capacidade de fixar compostos de nitrogênio e fósforo [12].

### 3.2.1 Cultura e crescimento de microalgas

O cultivo de microalgas em grandes quantidades é realizado utilizando comumente dois sistemas de cultivo: Abertas (lagoas e tanques) e fechados (fotobioreatores). Os sistemas de lagoas abertas são pouco favoráveis em quanto às limitações para controlar as condições de cultura, características que podem ser facilmente monitoradas em fotobioreatores. No entanto, os fotobioreatores implicam um custo inicial mais elevado para a cultura de

microalgas [13]. O sistema de lagoas abertas é um método de cultura comumente utilizado em nível industrial. Estes sistemas são construídos geralmente em formas circulares. O local onde vão se situar os tanques é um fator determinante no tipo de tanque a utilizar, já que as microalgas são organismos fotossintéticos e a luminosidade terá contribuições importantes no crescimento do cultivo.

Por outro lado, os sistemas de lagoas abertas estão fortemente limitados por parâmetros como temperatura, pH, nutrientes dissolvidos no meio, intensidade luminosa, e a contaminação por causas externas ao meio de cultura, o que faz com que este tipo de sistema seja adotado unicamente por espécies de microalgas que não precisem de condições muito controladas para sua cultura [13].

Por outra parte, o desenvolvimento de fotobioreatores surgiu para atingir as condições de espécies de microalgas que requerem um maior controle para sua cultura. Assim como os sistemas de lagoas abertas, os fotobioreatores são desenhados em função das variáveis ambientais especificas de uma área determinada.

Basicamente são construídos dois tipos de fotobioreatores, tubulares e de placas planas. Os fotobioreatores de placas planas são comumente utilizados ao ar livre, e apresentam uma alta relação área superficial/volume. Ambos tipos de fotobioreatores podem ser construídos com diferentes materiais a depender das condições do meio, do custo e do processo de fabricação. Os materiais mais comumente utilizados são fibra de vidro, PET e PVC [13].

### 3.2.2 Produtos das microalgas

As microalgas são consideradas como uma fonte rica em bioprodutos, e vem despertando o interesse de uma amplia gama de setores industriais. Por seu grande potencial biotecnológico, as microalgas são utilizadas na produção de biocombustíveis e também na produção de pigmentos e carotenóides.

As características e a versatilidade das microalgas mostram que elas apresentam um papel fundamental no desenvolvimento de novas tecnologias que proporcionem produtos de alto valor agregado. A Fig. 1 apresenta um diagrama com alguns bioprodutos obtidos a partir de microalgas. As microalgas precisão basicamente de luz, nutrientes e $CO_2$ para serem cultivadas.

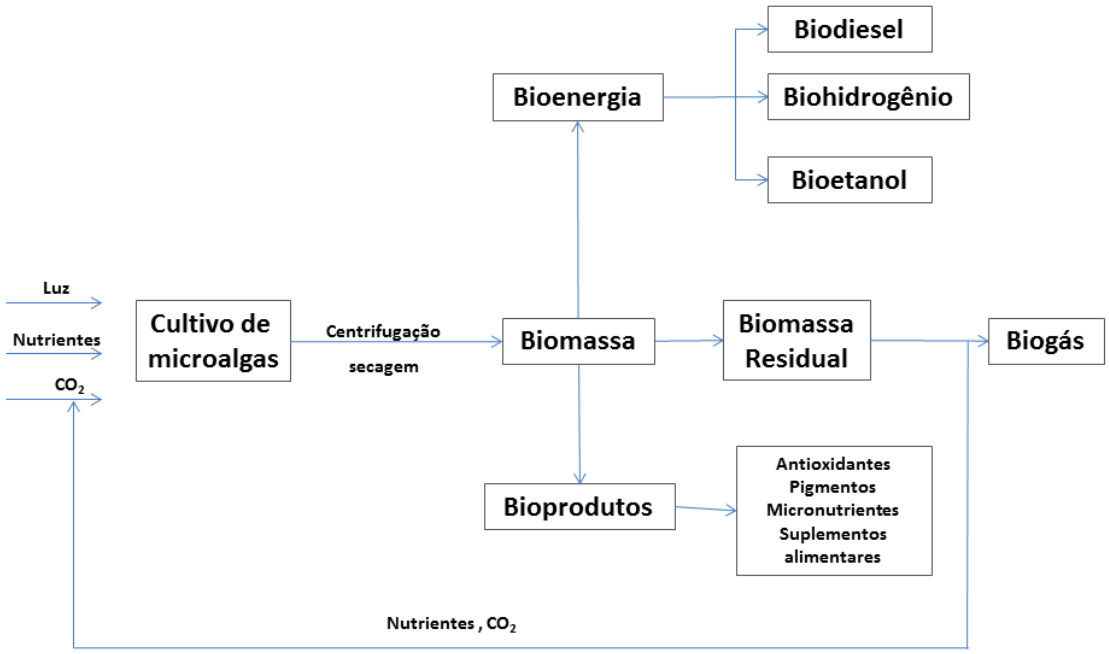



Fig.1: Bioprodutos potenciais obtidos de microalgas.
Fonte: adaptação a partir das referências[10,12].

O potencial biotecnológico das microalgas pode ser classificado a depender das aplicações industriais. Assim por exemplo, na produção de energia as microalgas são estudadas como fonte de biodiesel, biohidrogênio e bioetanol, sendo o biodiesel um de seus principais focos.

O biodiesel é obtido a partir de óleos vegetais e graxas animais, principalmente triglicerídeos. Os triglicerídeos são constituídos principalmente por três cadeias de ácidos graxos unidos a uma molécula de glicerol. No processo de produção do biodiesel, o óleo extraído das microalgas reage com um álcool formando ésteres de ácidos graxos e liberando glicerol, a Fig. 2 apresenta o esquema da reação de produção de biodiesel.

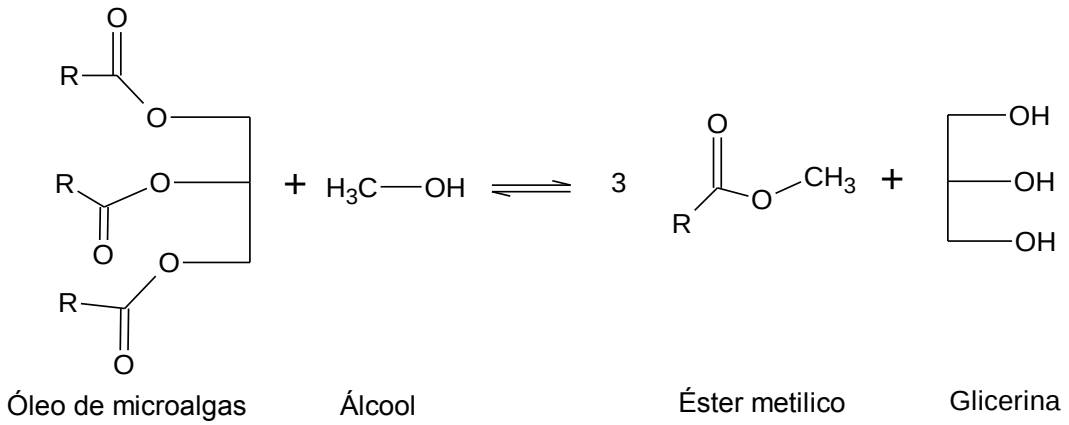



Fig. 2: Esquema da reação de transesterificação para produção de biodiesel [11,14].

Os lipídeos das microalgas são compostos principalmente por lipídeos neutros com um baixo grau de insaturação. Esta característica faz que com que as microalgas sejam uma fonte potencial para substituir os combustíveis atuais.

Por outra parte, as microalgas são organismos fotossintéticos que contêm clorofila que pode ser utilizada em alimentos e cosméticos; também podem ser usadas na indústria farmacêutica, já que algumas espécies produzem compostos ativos tais como antioxidantes, antibióticos e toxinas, [15].

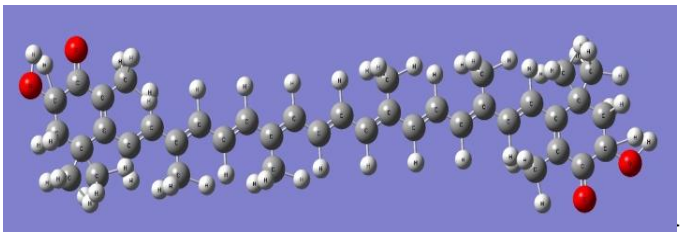
Os carotenóides são outros dos bioprodutos gerados a partir do cultivo de microalgas, sendo a espécie *Haematococcus pluvialis* a que consegue acumular mais carotenóides em condições de crescimento adversas [16]. Nos organismos fotossintéticos, os carotenóides desenvolvem um papel importante, já que participam do processo de transferência de energia, contribuindo na estabilização dos centros de reação fotossintéticos, os carotenóides também funcionam como filtro quando há um excesso de radiação incidindo sobre o centro.

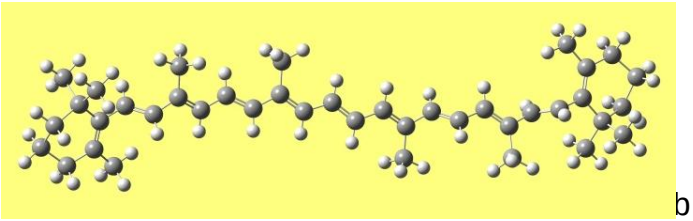
Os carotenóides são compostos orgânicos que fazem parte de uma classe de pigmentos lipofílicos formados por uma estrutura de cadeia conjugadas de poliinsaturados associada a grupos cíclicos. A estrutura química dos carotenóides rica em elétrons é a responsável de que estas moléculas absorvam facilmente energia proveniente do sol durante o processo de fotossínteses e

apresentem diferentes colorações que vão desde o amarelo até tons vermelhos intensos.

Os carotenóides podem se dividir em dois grupos, as estruturas que contem átomos de oxigênio presentes em grupos oxi ou grupos hidroxila (OH) conhecidos como xantofilas e as estruturas que não contem átomos de oxigênio chamados carotenos.

Os esquemas da Fig. 3 apresentam duas moléculas que pertencem aos grupos de carotenóides, a astaxantina e o β-caroteno. Os carotenóides como a astaxantina e o β-caroteno são produtos de alto valor agregado com aplicações farmacológicas, cosméticas e nutricionais. Na área nutricional se utilizam para o alimento de peixes e também como suplemento alimentar para humanos já que atuam como provitamina A e como antioxidantes biológicos. Na indústria cosmética e farmacêutica são utilizados como pigmentos para fabricar produtos que possam oferecer uma proteção dos efeitos negativos do sol, já que são considerados antioxidantes.





b

Fig.3: a) Estrutura química da astaxantina, b) estrutura química do β-caroteno.

Além dos bioprodutos obtidos do cultivo de microalgas, também se publicaram trabalhos nos quais se utiliza a biomassa residual, para produzir outros diferentes tipos de biocombustíveis como bioetano, biometano e biohidrogênio [10].

## 3.3 Métodos de caracterização e quantificação utilizados

Na metodologia utilizada para caracterizar e quantificar os produtos provenientes das microalgas como os lipídeos e pigmentos, é importante estudar os passos que fazem parte do processo para garantir uma produção mais eficiente. Na atualidade existe o interesse em produzir biodiesel a partir de microalgas, mas em condições que tornem o processo energeticamente e financeiramente viável. Com esta finalidade, se estuda por meio de técnicas analíticas o impacto das condições de cultivo sobre o crescimento de biomassa e acumulação de lipídeos, carotenóides e demais biomoléculas que fazem parte da biomassa das microalgas [10,15].

Para fazer uma analise qualitativo ou quantitativo tanto de lipídeos como de carotenóides é comumente realizada um processo de extração dos compostos de interesse. Seguidamente, e realizada uma analise utilizando técnicas analíticas como cromatografia de gases e espectrometria de massas. Sendo os métodos de extração um passo necessário das analises das biomoléculas provenientes das microalgas, e importante considerar os métodos de extração que comumente são utilizados.

Entre as metodologias comumente utilizadas para a extração de compostos lipossolúveis, se encontram a metodologia Folch publicada pela primeira vez em 1957, e a metodologia de Bligh e Dyer publicada em 1959. Para realizar um processo de extração dos lipídeos é recomendável a utilização de uma mistura de solventes o suficientemente polar para remover as associações entre os compostos graxos e as membranas celulares [17,18].

O método Folch para a extração de lipídeos consiste principalmente na adição de uma mistura de clorofórmio metanol, seguida da adição de uma solução de cloreto de potássio para ter uma melhor separação de fases. O método de extração proposto por Bligh e Dyer, também utiliza a mistura de solventes, sendo utilizada a mistura clorofórmio, metanol e água [17,18].

As metodologias desenvolvidas por Folch e Bligh e Dyer, são largamente utilizadas, mesmo com as desvantagens que apresentam, como o grão de toxicidade dos solventes utilizados e a extração de outros compostos não lipídicos, mas solúveis na fase orgânica. Para otimizar a extração de lipídeos pelos métodos Folch e Bligh e Dyer, vários trabalhos desenvolvidos nos últimos anos pesquisam o método mais eficiente com a finalidade de extrair a maior quantidade de lipídeos, sem alterar a qualidade dos mesmos e evitando a utilização de solventes muito tóxicos como clorofórmio ou metanol.

Assim, um dos métodos sugere uma mistura 1:1 v/v dos solventes clorofórmio-metanol adicionada numa proporção com a amostra de 1:1. A mistura é então agitada por cinco minutos e finalmente o solvente é separado por evaporação, e a composição de ácidos graxos é analisada [19].

Em outros métodos, utilizam ultrassom durante a extração por solventes, para aumentar a extração dos lipídeos. O ultrassom é uma onda mecânica que pode ser gerada a partir de uma corrente elétrica. Esta energia é convertida em vibrações de alta intensidade que gera ondas de ultrassom no material estudado. Se a amostra é liquida geram milhões de borbulhas microscópicas que sofrem rapidamente processos de expansão e compressão. O ultrassom tem diversas aplicações, no caso das microalgas é utilizado para romper a parede celular o que faz com que o processo de extração seja mais eficiente [20,21].

No trabalho de Jin-Yu H, *et.al*. se apresenta o processo de extração assistida por micro-ondas que tem características vantajosas sobre os métodos de extração tradicionais, já que o tempo de extração diminui de horas a apenas alguns minutos, além de diminuir a quantidade de solvente necessário e por outra parte as porcentagens do extrato aumentam [22].

As análises após a extração por solventes se têm por diversas técnicas instrumentais comumente utilizadas, o trabalho de Jae-Yon L,*et.al.* Utiliza a cromatografia de gases como método de análise. Na utilização desta técnica são necessários alguns miligramas da amostra e os solventes utilizados devem atender as características da coluna [19]. Utilizaram GC-MS para a análise do

extrato [7].

Outra metodologia amplamente utilizada na quantificação de lipídeos é utilizando o corante vermelho de Nilo (*NileRed)* para fluorescência. Este método consiste em misturar concentrações específicas do corante diretamente com as células de microalgas o qual marca as partes da célula que contém lipídeos. Este método pode ser utilizado em células animais e vegetais.

No caso das microalgas em algumas espécies o conteúdo de lipídeos é determinado com sucesso, mas em outras espécies o conteúdo de lipídeos encontrado por fluorescência e por gravimétrica diferem consideravelmente. A causa desta variação é a dificuldade que apresenta o corante em penetrar as paredes das células de certas espécies. Com a finalidade de resolver este problema, Wei Chen. *et.al.* utilizaram diferentes concentrações de dimetil sulfóxido (DMSO) a temperaturas elevadas para conseguir que o corante (*NileRed*) atravesse a parede celular o que garante a quantificação de lipídeos [23].

A quantificação de lipídeos usando fluorescência tem a vantagem de não requerer um processo de extração de lipídeos para sua análise, mas, ao mesmo tempo o uso de corantes como o (*NileRed*) entre outros não garante que a metodologia só quantifique lipídeos neutros ou que a concentração do corante não atinja outra partes da célula, o que torna difícil o processo de quantificação [24].

Nos estudos de Gao C *et. al.* utilizaram a técnica TD-NMR (time-domain nuclear magnetic ressonance) como método de quantificação de lipídeos. Esta técnica se destaca por não precisar da extração dos lipídeos. Ela se baseia nos tempos de relaxação dos núcleos de hidrogênio em diferentes fases da amostra a ser estudada; os sólidos como os carboidratos e as proteínas tem tempo de relaxação mais curtos da ordem de ms ou µs. Para a análise, as microalgas só precisam ser centrifugadas e secadas e a biomassa seca é inserida nos tubos onde se faz a análise [25].

Além dos métodos já mencionados, os estudos mais recentes utilizam espectroscopia Raman como método de análise das biomoléculas presentes nas microalgas. Esses estudos se destacam na análise *in vivo* das microalgas e dos compostos no interior celular.

Os avanços na espectroscopia Raman, permitiram a elaboração de novas metodologias.Como resultados, na espectroscopia Raman são utilizados detectores multicanais (CCD) e microscópio acoplado ao espectrofotômetro. Esses permitiram a obtenção de espectros em frações de segundos e uso de lasers de baixa potência. No tópico a seguir é apresentado uma breve descrição da espectroscopia Raman, o princípio físico, e aportes na área das microalgas e seus bio produtos.

### 3.3.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Nas moléculas, a região do espectro onde as transições são observadas depende do tipo de nível energético envolvido no processo. Sem levar em consideração a energia das moléculas devido aos movimentos translacionais, a energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional onde a energia dos níveis eletrônicos é maior se situando na região do ultravioleta e o visível, e a energia dos níveis vibracionais e rotacionais em um estado energético menor encontrando os sinais na região espectral do infravermelho e na região de microondas. Várias técnicas instrumentais permitem determinar as estruturas moleculares, níveis energéticos e ligações químicas, entre estas técnicas se encontra a espectroscopia Raman [26].

Em uma perspectiva histórica o efeito Raman foi previsto teoricamente por Smekal (1923), e descoberto por Raman (1928), o efeito Raman despertou o interesse dos físicos que naquela época obtinham e comparavam espectros, e em alguns casos atribuíam frequências a modos vibracionais. Na década de (1940) os químicos utilizaram a espectroscopia Raman para estudar a simetria das moléculas e as ligações químicas. O método de obtenção de espectros

Raman consistia na utilização de radiação em comprimento de onda de 435,8 nm, de arcos de mercúrio para a excitação dos espectros e de espectrógrafos com prismas como elemento dispersor, com detecção fotográfica.

A espectroscopia Raman é utilizada para estudar os modos energéticos de baixa frequência, transições energéticas vibracionais e rotacionais. Esta técnica instrumental se baseia na dispersão inelástica de luz monocromática que se faz incidir sobre uma amostra. Os espectros Raman fornecem informações sobre a estrutura molecular e dinâmica do sistema em estudo.

#### 3.3.1.1 Princípio físico

A espectroscopia Raman se define como o espalhamento inelástico de uma radiação monocromática que incide em uma molécula. O processo envolve uma ressonância entre a diferença dos níveis energéticos da molécula estudada e a radiação eletromagnética incidente. O fenômeno ocorre quando o campo elétrico de uma radiação monocromática com uma frequência inicial $\nu_0$ induz uma variação na polarizabilidade da molécula incidida durante a vibração.

O momento de dipolo induzido na molécula pode ser representado como **P =** α**E**, onde **α** é a polarizabilidade da molécula e **E** a componente elétrica da radiação incidente, α pode ser escrita em termos das coordenadas internas **q**, e ser desenvolvida em série de Taylor [26]:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{1}{2}\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \cdots \qquad \textbf{(1)}$$

Considerando a coordenada **q** e o campo **E** descritos por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_\nu t) \text{ e} \qquad \mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \textbf{(2)}$$

Sendo as frequências vibracionais $\nu_\nu$ e da radiação incidente $\nu_0$. O momento dipolar induzido na aproximação harmônica pode ser escrito como:

$$\mathbf{P} = \alpha_0\, \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0\, \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t)\cos(2\pi\nu_v t) \quad \textbf{(3)}$$

Lembrando que:

$$\boldsymbol{\cos(a)\cos(b) = \frac{1}{2}[\cos(a+b) + \cos(a-b)]},$$

podemos escrever a equação **(3)** como:

$$\mathbf{P} = \alpha_0\, \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2}\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \{\cos(2\pi(\nu_0+\nu_v)t) + \cos(2\pi(\nu_0-\nu_v)t)\} \quad \textbf{(4)}$$

O primeiro termo da equação (4) contem somente a frequência da radiação do espalhamento elástico conhecido como espalhamento Rayleigh, o segundo termo da equação representa a radiação espalhada com a frequência $\nu_0 + \nu_v$ conhecido como espalhamento Raman anti-Stokes onde a radiação incidida na amostra tem uma energia menor do que a energia da radiação emitida, e o terceiro termo da equação $\nu_0 - \nu_v$ corresponde ao espalhamento Stokes, onde a energia da radiação incidente é maior do que a energia da radiação emitida pela molécula. O esquema apresentado na Fig. 4 representa os mecanismos de espalhamento descritos na equação (4).

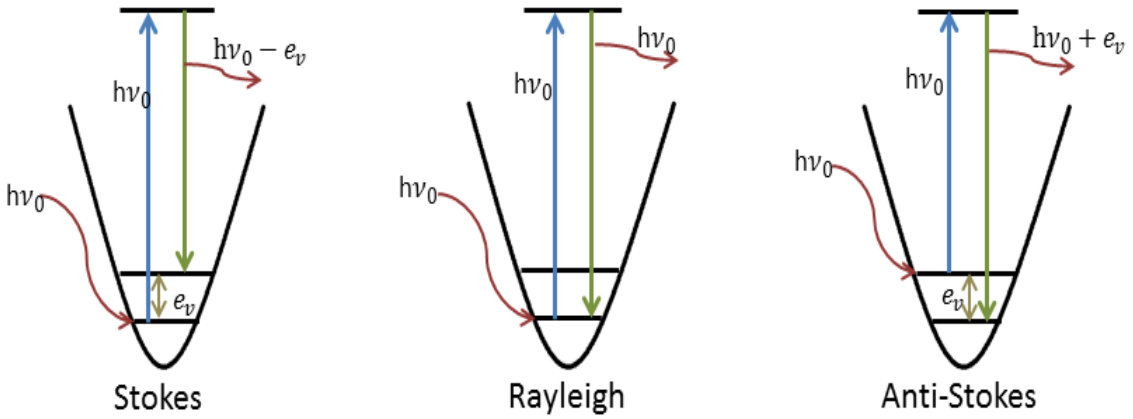



Fig.4: Diagrama dos mecanismos de espalhamento.
Fonte adaptada das ref [26].

No efeito Raman, as moléculas diatômicas heteronucleares e homonucleares apresentam atividade devido a que em ambos casos ocorre uma variação da polarizabilidade.

### 3.3.1.2 Características da espectroscopia Raman

Os espectros Raman relacionam a intensidade do sinal obtido com as frequências energéticas onde acontece cada vibração. A intensidade do sinal Raman depende tanto da intensidade da radiação incidente como do tipo de amostras a serem analisadas. Por outro lado, as frequências vibracionais obtidas dependem de três fatores especificamente: as massas atômicas da amostra, os arranjos geométricos moleculares e as forças entre estes enlaces químicos. Os espectros Raman provem informação acerca da estrutura molecular e a dinâmica da amostra [27].

Existem dois enfoques utilizados na interpretação de espectros vibracionais e elucidação da estrutura molecular. O primeiro consiste no uso da teoria de grupos e os métodos computacionais para determinar as frequências das vibrações moleculares, e a segunda metodologia utiliza as frequências características dos grupos funcionais [27].

Geralmente, muitos problemas de identificação e caracterização de amostras são resolvidos utilizando a metodologia empírica, já que as vibrações dos grupos funcionais são mecanicamente independentes das outras partes que compõem a molécula, apresentando-se estas vibrações nas mesmas frequências ou com deslocamentos significativamente pequenos e com perfis espectrais facilmente identificáveis [27].

Usualmente, as análises por frequências são utilizadas para determinar a presença ou ausência de grupos funcionais em uma determinada molécula ajudando assim na elucidação da estrutura molecular. As frequências vibracionais dos grupos funcionais podem ser encontradas no espectro em diferentes regiões, a Fig. 5 apresenta as regiões onde se encontram alguns grupos funcionais característicos [27].

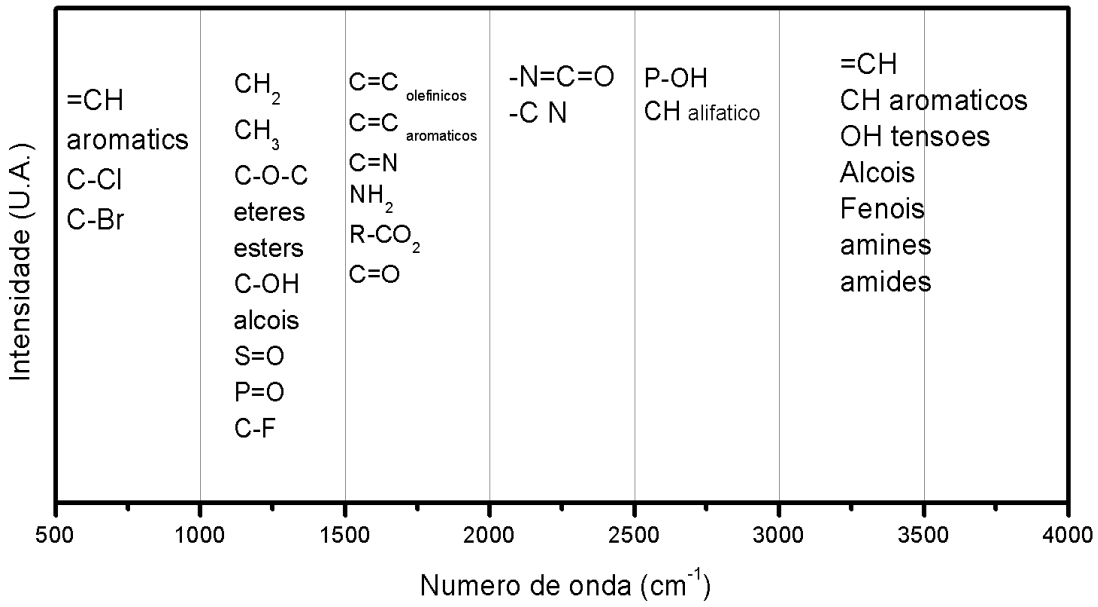



Fig.5: Regiões espectrais de alguns grupos funcionais característicos.
Fonte adaptada das ref [27].

### 3.3.1.3 Vantagens e desvantagens

Espectroscopia vibracional é usada para estudar um amplo tipo de amostras e podem ser realizados desde um teste de identificação simples a uma análise em profundidade do espectro completo. A depender das configurações dos equipamentos utilizados nas análises, a quantidade de amostra requerida para o estudo é da ordem de micras, o estado físico das amostras também varia desde gases, líquidos, látex, pós, filmes, fibras, ou como uma camada de superfície ou embutido. Espectroscopia vibracional tem uma gama muito ampla de aplicações e fornece soluções para uma série de importantes e difíceis problemas analíticos [27].

Dentro das técnicas de análise vibracional podemos encontrar além de Raman, a espectroscopia infravermelha na região media e próxima do espectro, estas técnicas oferecem informação complementar acerca de uma estrutura molecular. A Tabela 3.2 apresenta as diferenças e semelhanças da espectroscopia Raman em comparação com as técnicas espectroscópicas IR e NIR. Como se observa na Tabela 3.2, a espectroscopia Raman sobressai em todos os tópicos levados em consideração, sendo a preparação da amostra o que mais favorece as análises das microalgas, já que é precisamente aqui onde

o tempo de análise diminui de horas para só alguns minutos, em comparação às metodologias comumente utilizadas na área de caracterização dos lipídeos, devido não requer nenhum pré-tratamento abarcando um processo de extração para as análises. No caso das outras duas espectroscopias, a depender do tipo de amostra a ser estudada, serão escolhidos ou adaptados os prétratamentos das amostras, com a finalidade de obter sempre os melhores resultados.

Nas análises dos espectros obtidos, a espectroscopia Raman também sobressai, já que permite obter bons resultados quantitativos, assim como a identificação de vibrações características de cada espécie molecular, estas vibrações características se conhecem como fingerprinting.

Tabela 3.1: Comparação da espectroscopia Raman, infravermelho perto e meio [27].

| | **Raman** | **Infravermelho medio** | **Infravermelho próximo** |
|---|---|---|---|
| Preparação da amostra | Não requer | Variável | Simples |
| Liquidas | Não requer | Não requer | Não requer |
| Pó | Não requer | Simples | Simples |
| Polímeros | Não requer | Simples | Simples |
| Soluções aquosas | Muito bom | Muito difícil | Resultados bons |
| Analise quantitativo | Bons resultados | Bons resultados | Excelentes resultados |
| Modos de baixas frequências | Excelente resultados | Difícil de obter | Não se consegue |
| Identificação de Fingerprinting | Excelente | Excelente | Boa |

### 3.3.1.4 Estudos publicados utilizando espectroscopia Raman para análise de microalga

Devido às vantagens que apresenta a espectroscopia Raman em comparação a outras técnicas instrumentais, principalmente em relação ao pré tratamento de amostras, esta técnica vem sendo muito explorada nos últimos anos para estudos em amostras biológicas. Estudos publicados utilizam espectroscopia Raman em microalgas para: determinação do grau de insaturação dos lipídeos presentes ao interior celular, acompanhar o processo de estresse em função da intensidade dos sinais em lipídeos como pigmentos, caracterização e quantificação tanto de lipídeos como de carotenoides. O

alcance dos estudos que podem ser realizados utilizando esta metodologia dependerá das características do equipamento Raman, a energia do laser ou o alcance do sistema ótico utilizado, assim como da sensibilidade do detector. Seguidamente, serão citados alguns trabalhos publicados utilizando espectroscopia Raman na área das microalgas.

A espectroscopia Raman foi utilizada para analisar em amostras vivas a influencia que exerce a exposição da espécie *Dunaliella tertiolecta* ao estresse por falta de nutrientes. Aqui os autores utilizaram diferentes concentrações de nitrogênio nos meios de cultura da microalga e identificaram variações nos níveis de clorofila *a* e β-caroteno nas células individuais de *Dunaliella tertiolecta,* devido que a diminuição dos níveis de espécies cromóforas nestas células freia a capacidade fotossintética das mesmas, diminuindo assim seu crescimento e sua produtividade, este estudo foi complementado utilizando métodos quimiométricos para a análise dos dados colhidos por espectroscopia Raman [28].

Os espectros foram tomados com uma fonte laser de 782 nm utilizando um microscópio com objetiva de imersão em água para enfocar as células, a região do espectro analisada foi de (200-1800 $cm^{-1}$) e foram analisadas 30 células para cada concentração de nitrogênio. No processamento dos dados foi utilizado o software UNSCRANBLER 9.2 para realizar uma análise por componentes principais.

O estudo demonstrou que a espécie *Dunaliella tertiolecta* quando submetida a estresse por ausência de nitrogênio diminui proporcionalmente os sinais que correspondem à clorofila *a* e β-caroteno, diminuindo assim a velocidade de crescimento do cultivo.

Em outro trabalho publicado utilizando espectroscopia Raman, se realizou um análise *in vivo* para determinar o grau de insaturação dos lipídeos sintetizados e acumulados ao interior da célula das espécies de microalga *Trachydiscus minutus, Brotryococcus sudeticus*e *Chlamydomonas sp*. As microalgas estudadas foram cultivadas em um meio propicio para obter a maior acumulação de ácidos graxos [29].

As células foram tingidas utilizando o corante *NileRed* (9-diethylamino-5H-benzo[α]phenoxazine-5-one) para visualizar as partes da célula onde se acumulam os lipídeos, seguidamente a área dos lipídeos foi focada pelo laser para realizar o espectro Raman, a Fig. 6 é uma fotografia da célula antes e depois de ser tingida com o corante *NileRed.*

A região de interesse para esta análise foi de (1000-1800 $cm^{-1}$), e os sinais do espectro Raman característicos utilizados para o estudo foram 1656 $cm^{-1}$ correspondente ao modo de tensão (*cis* C=C) e 1445 $cm^{-1}$ correspondente ao modo de vibração tesoura do ($CH_2$); com a intensidade do sinal destas duas frequências, pode-se calcular a razão do grau de insaturação entre as ligações carbono-carbono dos ácidos graxos acumulados nas microalgas.

Para este estudo foi utilizado o método do índice de iodo que é uma escala utilizada para definir o grau de insaturação de um composto orgânico que contém ligações duplas e triplas.

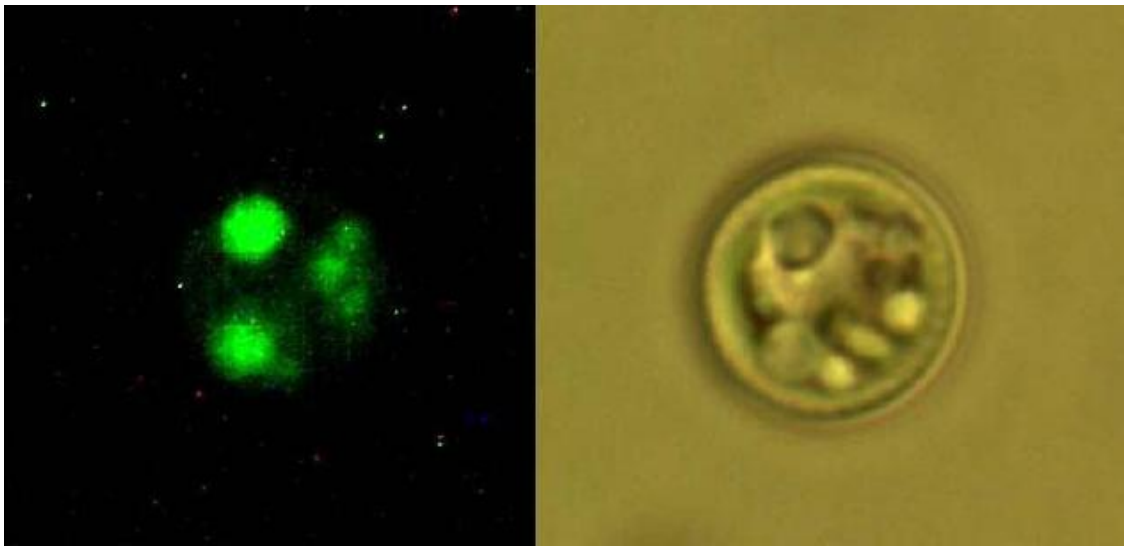


Fig. 6: Fotografia da célula antes e depois de ser utilizado o corante *NileRed* para visualizar os lipídeos ao interior da célula. Fonte da Ref. [29]

Os padrões utilizados para esta análise foram uma mistura dos ácidos graxos palmítico, oleico, linoleico, arachidonico e EPA, com diferentes graus de insaturação. Os dados obtidos por espectroscopia Raman foram validados utilizando GM-MS. As microalgas foram imobilizadas com um gel de agarosa e a

fonte de excitação laser utilizada foi de Ti:Sapphire com um λ = 785 nm e um diâmetro de 0.6 mm.

Inicialmente se realizou uma curva de calibração que relaciona a intensidade dos sinais de $N_{C=C}/_{NCH2}$ com os valores de insaturação teóricos dos padrões de ácidos graxos e com diferentes misturas entre eles. Posteriormente, com os dados encontrados com a curva de calibração se construiu uma outra curva que relacionava a intensidade dos sinais $N_{C=C}/N_{CH2}$ dos padrões e suas misturas, com os índices de iodo e os valores teóricos, e finalmente se determinaram os valores de iodo para a células das microalgas. As medidas determinaram que a espécie *Trachydiscus minutus,* apresenta um maior grau de insaturação que as outras duas espécies analisadas.

Entre os trabalhos publicados utilizando espectroscopia Raman na área das microalgas, também se destaca o estudo onde se utiliza a espectroscopia Raman como um método simples para quantificar o β-caroteno produzido pela espécie de microalga *Trachydiscus minutus* [30].

No experimento os autores utilizam uma gradiente de luz intensa para induzir um incremento na produção de β-caroteno na célula, ao realizar as medidas de Raman *in vivo*, foram imobilizadas as células utilizando uma solução de agarosa, e as medidas foram realizadas com um tempo de integração de 10 segundos, e o comprimento de onda do laser utilizado foi de 785 nm.

Para realizar a quantificação do β-caroteno, construíram uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações de β-caroteno diluído em óleo de oliva comercial, a correlação encontrada entre a intensidade dos sinais do padrão β-caroteno e as concentrações foi linear com um coeficiente de correlação de $R^2$= 0.9961. Os sinais levados em consideração para este estudo são apresentados na Tabela 3.3.

Os espectros obtidos são apresentados na Fig. 7. Com o estudos os autores conseguiram determinar uma concentração máxima de β-caroteno de 8 $g.L^{-1}$ para a espécie de microalga *Trachydiscus minutus.*

Tabela 3. 2: Sinais Raman do β-caroteno e lipídeos [30]

| Sinal Raman | Desplazamento Raman ($cm^{-1}$) |
|---|---|
| β-caroteno C-C tensão | 1157 |
| β-caroteno C=C tensão | 1525 |
| Vibração tipo tesoura $CH_2$ dos lipídeos | 1445 |
| Tensão C-C dos lipídeos | 1656 |

O estudo também permitiu concluir que a concentração de β-caroteno nas células é estimulada pela exposição à luz. Os resultados obtidos utilizando espectroscopia Raman foram corroborados utilizando HPLC dos pigmentos e GC-MS dos acudis graxos.

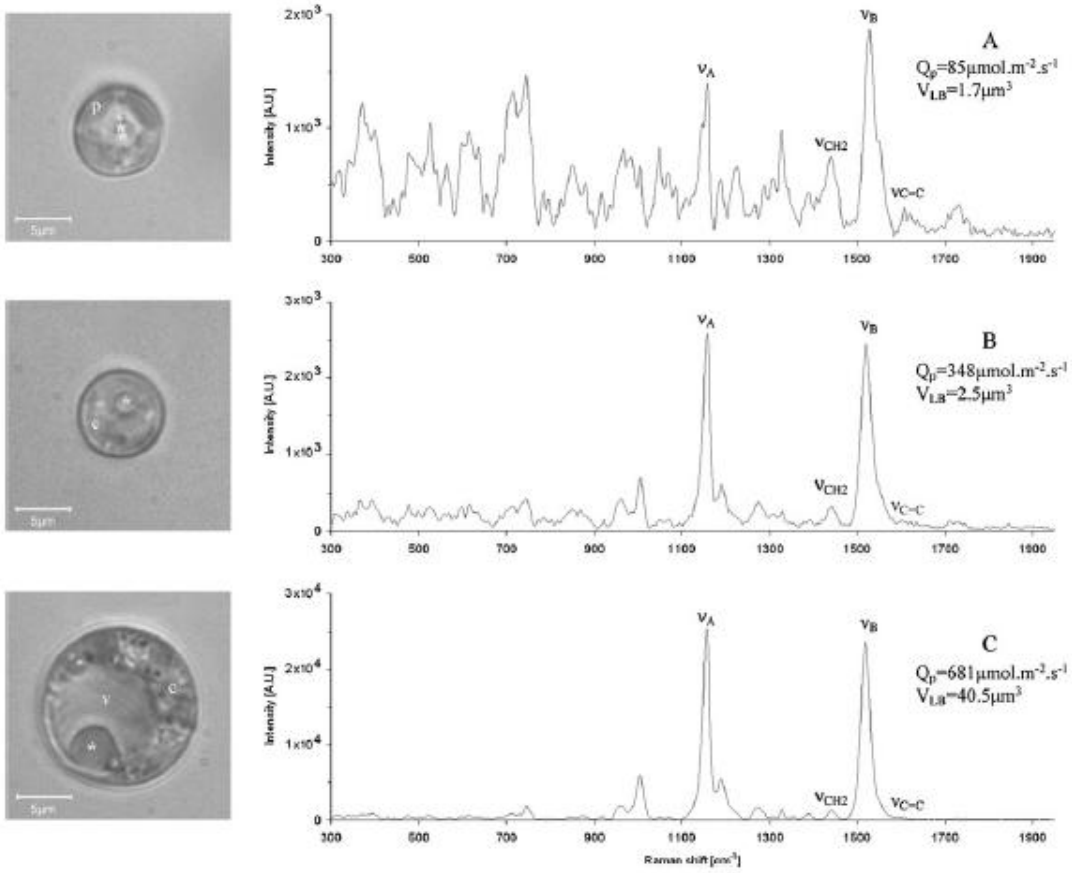



Fig.7: Fotografia e espectros Raman da célula *Trachydiscus minutus*, em diferentes intensidades de luz durante o processo de cultura [30].

Num trabalho mais recente publicado em 2013 por Lee, *et. al.* também se utilizou a espectroscopia Raman como método de quantificação *in vivo* de lipídeos nas células da microalga da espécie *Chlorella vulgaris*. Neste trabalho o objetivo principal foi utilizar a espectroscopia Raman para monitorar a mudança

na intensidade dos sinais correspondentes aos lipídeos durante um processo de estresse por ausência de nitrogênio [31].

A metodologia utilizada neste estudo consistiu em cultivar a cepa da microalga *Chlorella vulgaris* em um meio com ausência de nitrogênio para estimular a síntese e acumulação de lipídeos na célula. O tratamento para a análise das células por espectroscopia Raman avaliou duas formas de pré tratamento das amostras. A primeira consistiu em um tratamento de centrifugação e liofilização por 48 horas e a segunda em um processo simples onde se tomou uma alíquota de 1mL do cultivo e se centrifugou por 5 minutos a 13500 rpm e posteriormente remover o sobrenadante. Posteriormente uma quantidade de 5µl da amostra foi colocada em uma lamina de Au, a metodologia se representa no esquema da Fig. 8.

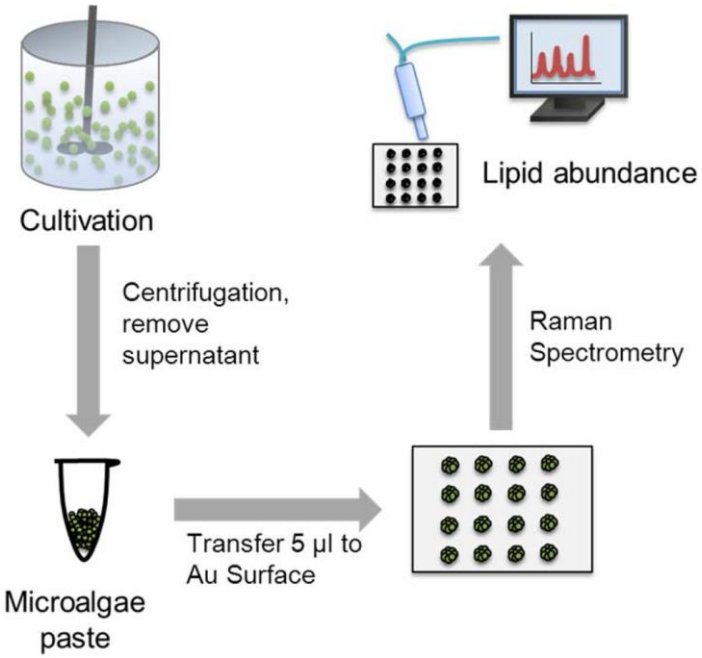



Fig.8: Esquema representativo da metodologia utilizada no trabalho de Lee, *et. al*. para quantificar lipídeos [31].

O estudo publicou a caracterização dos sinais correspondentes aos lipídeos e os carotenóides que apresenta esta espécie, que corroboram os sinais publicados em outras referencias, também espectros comparativos das microalgas antes e depois do processo de liofilização, encontrando-se que uma vez realizado o processo de liofilização a intensidade dos sinais aumenta

consideravelmente. Os espectros apresentados na Fig. 9 correspondem a diferentes porcentagens de abundancia dos lipídeos presentes na microalga *Chlorella vulgaris*, os sinais utilizados para determinar as porcentagens de abundancia são 1440 $cm^{-1}$, 1660 $cm^{-1}$, 2845-3107 $cm^{-1}$.

Com os sinais dos lipídeos se construiu uma curva de calibração que relacionou a intensidade dos sinais dos lipídeos com a porcentagem de abundância dos lipídeos na microalga, encontrando-se valores similares aos encontrados utilizando cromatografia de gases.

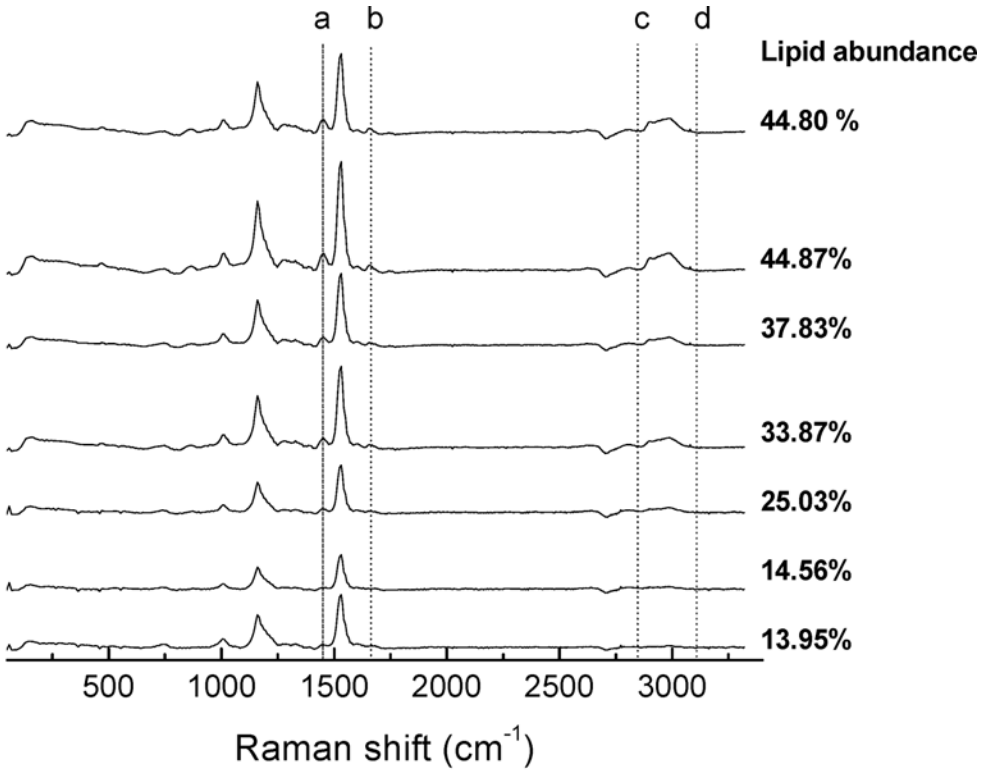



Fig.9: Espectros Raman da microalga *Chlorella vulgaris* onde se apresentam as porcentagens abundância dos lipídeos em função da concentração de nitrogênio no meio de cultura [31].

Os estudos apresentados neste trabalho demonstram que a espectroscopia Raman pode ser utilizada como método de caracterização e quantificação *in vivo* de diferentes espécies de microalgas, apresentando resultados similares aos encontrados com metodologias convencionais como cromatografia de gases, fluorescência entre outros, com a vantagem de não precisar de processos de extração por solvente nem quantidades consideráveis de amostrar, permitindo fazer análises em tempo real do material biológico de

interesse, já que não só é útil para estudar lipídeos como também para estudar carotenóides, carboidratos e proteínas, todos estes bioprodutos sintetizados e acumulados pelas microalgas.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os matérias e métodos utilizados para levar ao fim o desenvolvimento dos objetivos expostos anteriormente. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioenergética e Catálise (LABEC) da Escola Politécnica, e nos laboratórios de Fotoacústica e LAPO/LAMUME do Instituto de Física na Universidade Federal da Bahia.

## 4.1 Microalgas e condições de cultura

Neste estudo foram utilizadas duas espécies de microalgas, a *Nannochloropsis sp* proveniente de Bahia pesca e *Haematococcus pluvialis*, provenientes do laboratório de fisiologia e cultivos de algas da Universidade Federal Fluminense, coordenado pelo professor Sergio Lourenço.

Os microrganismos são mantidos em uma incubadora de fotoperíodo (411 FDP, Nova ética), com uma temperatura em torno de 22$^{o}$C e iluminação contínua com lâmpadas fluorescentes de 30 Watts fornecendo luminosidade de cerca 35 µmol de fótons $m^{-2}$ $s^{-1}$.

As espécies são cultivadas em meios de culturas já estabelecidos e descritos na literatura, tendo estes composições características para cada microalga. *Nannochloropsis sp.* é cultivada em Meio Conway (WALNE, 1966 *apud* LOURENÇO, 2006) e *Haematococcus pluvialis* em Meio Rudic – RM (RUDIC, 2000), cujas composições são apresentadas nas Tabelas 4.1 a 4.4,respectivamente [32-34].

Tabela 4. 1: Meio de cultura utilizado para a espécie *Nannochloropsis sp*.

| **Componentes** | **Quantidade** |
|---|---|
| Solução principal estoque (tabela 6) | 1 ml |
| Solução de vitaminas | 1 ml |
| Agua deionizada | 200 ml |
| Agua de mar ou saloubra | 800 ml |

Tabela 4. 2: Solução de vitaminas para o meio Conway, dissolver as três vitaminas em 1L de água destilada.

| **Componentes** | **Quantidade** |
|---|---|
| Tiamina | 100 mg |
| Cianocobalamina | 2 mg |
| Biotina | 1 ml |

Tabela 4. 3: Meio Rudic (RM) de cultura utilizado para a espécie *Haematococcus pluvialis*.

| **Componentes** | **Quantidade** |
|---|---|
| Agua deionizada | 1 L |
| $NaNO_3$ | 0,3 g |
| $K_2HPO_4$ | 0,08 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,02 g |
| $MgSO_4$ | 0,01 g |
| $Cl_2Ca$ | 0,0585 g |
| EDTA | 0,0075 g |
| NaCl | 0,02 g |
| Solução estoque de metais | 1 ml |

Tabela 4. 4: Solução estoque de metais utilizado no meio Rudic.

| **Componentes** | **Quantidade** |
|---|---|
| $H_3BO_3$ | 0,3 g |
| $MnSO_4.H_2O$ | 1,5 g |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0,1 g |
| $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ | 0,3 g |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,08 g |
| $Co(NO_3)_2.6H_2O$ | 0,26 g |
| $FeCl_3.6H_2O$ | 17 g |

Para pesar a quantidade dos nutrientes utilizados nos meios, foi utilizada uma balança analítica (Satorious, TE2145), com uma incerteza na medida de ±0,0001 g.

## 4.2 Preparação do inoculo

Os inóculos foram preparados em duas partes. A primeira parte consistiu no inóculo de um cultivo mãe das espécies *Nannochloropsis sp*. e *Haematococcus pluvialis,* com a finalidade de garantir que a maior população de

células estivesse na mesma fase de crescimento que foi acompanhado até a fase estacionária. Na segunda parte, o cultivo mãe das duas espécies, foi utilizado como inóculo dos cultivos utilizados para os experimentos com espectroscopia Raman.

Os cultivos das duas espécies utilizadas foram realizadas em triplicata, e o acompanhamento do crescimento foi até a fase de declínio ou morte celular, fase terminada em 12 dias, os cultivos se prepararam em volumeis de 300 mL.

### 4.2.1 *Nannochloropsis sp.*

Inicialmente foi preparado um cultivo mãe que serviu como inóculo para os experimentos. O meio de cultura Conway foi preparado em um erlenmeyer de 1L e esterilizado em autoclave(autoclave Vertical *plus* Phoenix) a 121°C, 1atm durante 15 minutos. Oinóculo do cultivo mãe foi realizado em bancada de fluxo laminar vertical (Pachane), pela transferência de um volume correspondente ao 50% do meio fresco de células da espécie *Nannochloropsis sp.*

Para garantir o crescimento celular, os erlenmeyer foram colocado em uma prateleira iluminada com lâmpadas fluorescentes de 15 Watts, obtendo-se uma luminosidade aproximada de 70 µmol de fótons $m^2.s^{-1}$ na superfície do erlenmeyer, mantendo-se uma temperatura média do meio de 24°C.

Fig.10: Disposição dos Erlenmeyer na prateleira.

O borbulhamento constante de ar no cultivo se obteve a partir do uso de bombas de ar conectadas a pipetas através de mangueiras, a exposição do cultivo na prateleira se apresenta na Fig. 10. O crescimento do inóculo foi

acompanhado diariamente ate a fase de crescimento, utilizando o método de contagem celular na câmara de Neubauer com o microscópio ótico (Axiostar*plus,* Zeiss).

### 4.2.2 *Haematococcus pluvialis*

O procedimento seguido para esta espécie foi similar ao exposto para a *Nannochloropsis sp*., se preparou um cultivo mãe que serviu como inóculo para os cultivos dos experimentos. O meio de cultura utilizado foi o RM e foi preparado em um erlenmeyer de 1L que posteriormente foi esterilizado utilizando a autoclave (autoclave Vertical *plus* Phoenix), mantendo as mesmas condições de esterilização da *Nannochloropsis sp*., o volume transferido do cultivo mãe para os cultivos dos experimentos correspondeu ao 50% do meio fresco de células da espécie *Haematococcus pluvialis*.

O cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis*, também foi posto em prateleiras utilizando as condições de iluminação, temperatura e borbulhamento da microalga *Nannochloropsis sp.*O monitoramento do crescimento celular também se realizou com ajuda da contagem celular na câmara de Neubauer com o microscópio (Axiostar*plus,* Zeiss).

Já que as células de *Haematococcus pluvialis*, têm flagelos que permitem sua mobilidade o que dificulta a contagem celular, foi necessário o uso da solução fixadora Transeau, que se compõe de (água: álcool: formaldeído = 6:3:1) [35]. As curvas de crescimento representam o número de células/mL em função do tempo de cultivo, os gráficos foram construídas no software OriginPro.

## 4.3 Espectroscopia Raman como método de caracterização e quantificação de lipídeos e carotenóides.

Para os estudos realizados tanto de caracterização como quantificação de lipídeos e carotenóides principalmente, assim como de sinais provenientes a outras substâncias produzidas no interior da célula foi utilizada a técnica de espectroscopia Raman. O equipamento utilizado foi um espectrômetro dispersivo

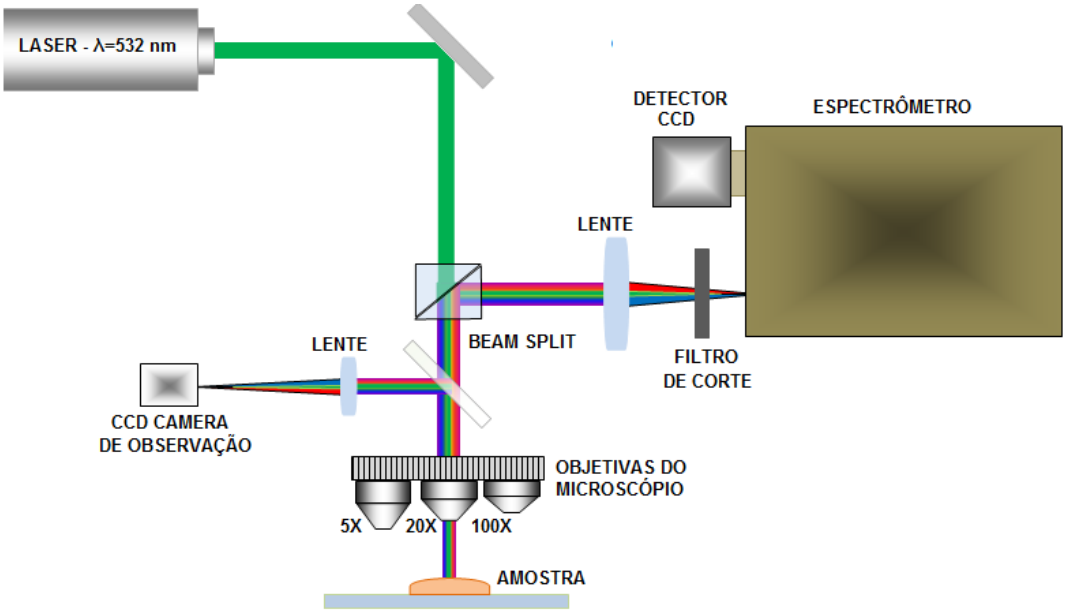



Fig.11: Esquema do espectrômetro Raman (JASCO NRS-5100) utilizado nos analises apresentados neste trabalho.

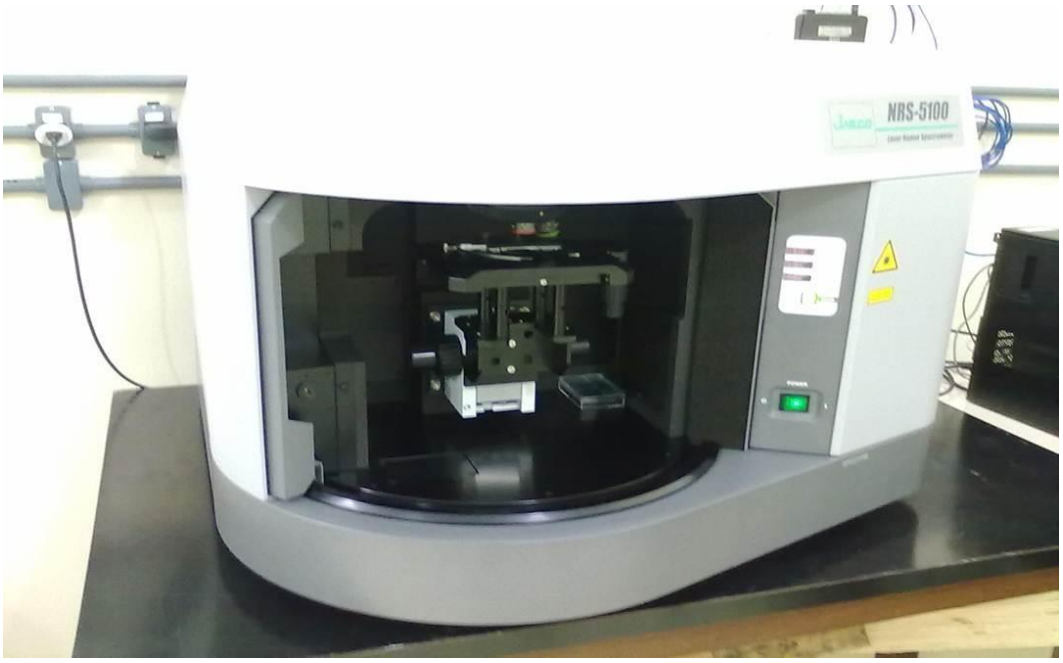



Fig.12: Fotografia do espectrômetro Raman (JASCO NRS5-100) do laboratório LAPO/LAMUME/IF da UFBA utilizado nas análises apresentadas neste trabalho.

Raman (JASCO NRS-5100) do laboratório LAPO/LAMUME do Instituto de Física da UFBA. O equipamento conta com microscópio acoplado com três objetivas (5x, 20x, 100x µm), a fonte laser emite em 532 nm com uma potencia máxima de 50 mW. A região espectral utilizada em todas as medições foi de (800-3050 $cm^{-1}$). A Fig. 11 apresenta um esquema representativo do espectrômetro Raman

utilizado nas análises. Na Fig. 12 se apresenta uma fotografia do espectrômetro Raman. Devido a que as amostras apresentam um alto conteúdo de clorofila, foi utilizado o sistema automático de correção da fluorescência com a finalidade de evitar o solapamento de sinais de interesse.

### 4.3.1 Análise da biomassa.

Para caracterizar e posteriormente quantificar os sinais correspondentes a lipídeos e carotenóides, foi preciso fazer testes preliminares para determinar as condições nas quais o espectrômetro Raman apresentava a melhor resolução dos sinais de interesse. As microalgas foram analisadas com dois métodos diferentes: o primeiro foi analisada a biomassa seca e o segundo a análise das microalgas *in vivo*.

**Análise da biomassa seca:**

Inicialmente se realizaram testes com biomassa seca proveniente de *Haematococcus pluvialis,* cultivada no laboratório em condições de crescimento favoráveis para a produção de biomassa, o seja com condições de temperatura, luminosidade e concentração de nutrientes aptas para o crescimento.

A biomassa seca se obteve após centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos a solução do inóculo, posteriormente, se descartou o sobrenadante e seguidamente foi levada a biomassa para a estufa a 100 °C por 24 horas, logo a biomassa seca foi macerada e secada novamente a 100 °C por 24 horas para sua posterior análise por espectroscopia Raman.

**Análise das células de microalgas in vivo:**

O pré-tratamento para a análise das células in vivo utilizando espectroscopia Raman foi mais simples.Se tomou uma amostra de 1mL da solução do cultivo e se centrifugou  a 4000 rpm durante 5 minutos para descartar o sobrenadante. Finalmente a biomassa úmida foi colhida em uma lamina de vidro para levar a análise por espectroscopia Raman.

O estudo das microalgas in vivo, pode obter informação detalhada sobre as características de cada cultivo, as condições físico-químicas que alteram positivamente ou negativamente as espécies objeto de estudo. Permitindo assim, fazer um acompanhamento dia a dia dos cultivos, e aperfeiçoar as condições a partir dos resultados obtidos.

Os espectros foram realizados na região de (800-3050 $cm^{-1}$), devido a que é nessa região do espectro onde se encontram os sinais de interesse tanto de carotenóides como de lipídeos [31].

### 4.3.2 Caracterização dos lipídeos e carotenóides.

Os sinais das microalgas foram identificados com ajuda da literatura e também com padrões e amostras comerciais para lipídeos e carotenóides [30,31]. No caso dos carotenóides se utilizou uma amostra padrão de β-caroteno (Sigma-Aldrish) e uma amostra comercial de astaxantina. Para a caracterização dos lipídeos se utilizou uma amostra padrão de ácido oleico (Sigma-Aldrish) e amostras de óleos comercias: óleo de milho, ômega-3, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de canola, óleo de oliva extra virgem. Na Tabela 4.5 se apresenta uma lista dos sinais mais relevantes que foram identificados durante o processo.

Tabela 4. 5: Sinais Raman de carotenóides e lipídeos encontrados nas microalgas analisadas in-vivo.

| **Sinal Raman** | **Desplazamiento Raman ($cm^{-1}$)** |
|---|---|
| β-caroteno C-C tensão | 1157 |
| β-caroteno C=C tensão | 1525 |
| Vibração tipo tesoura $CH_2$ dos lipídeos | 1445 |
| Tensão C-C dos lipídeos | 1656 |
| Tensão C-H dos lipídeos | 2845-3107 |

### 4.3.3 Quantificação de carotenóides.

No processo de quantificação, foi importante levar em consideração os fatores que influenciam a intensidade do sinal. Para este fim se estudou o efeito do estresse por esgotamento dos nutrientes para as duas espécies de

microalgas utilizadas no estudo, o tempo de exposição ao laser, e a variabilidade do sinal entre varias células.

Para quantificar os carotenóides se utilizou o sinal em 1525 $cm^{-1}$ correspondente à vibração de tensão C=C do β-caroteno. Este sinal foi escolhido já que a intensidade do mesmo é associada unicamente ao β-caroteno, o que descarta qualquer contribuição de outras espécies moleculares apresentadas nas diluições.

Para as medidas de calibração se utilizou o padrão de β-caroteno (Sigma-AldrichCorp., USA) e óleo de soja para preparar uma solução estoque ao 10% em g $L^{-1}$. Seguidamente, se tomaram alíquotas a partir da solução principal para preparar diluições com o óleo de soja, resultando em 7 soluções padrões que continham concentração de β-caroteno (0.2; 1; 3; 5; 7; 8; 10)% em g $L^{-1}$.

Na avaliação da curva obtida se utilizaram 4 amostras de *Haematococcus pluvialis,* com tempo de cultura diferentes, para determinar a concentração de carotenóides nas fases inicial, onde a concentração de pigmentos deve ser baixa, e em estagio de cisto, onde a concentração de pigmentos se espera que seja elevada em comparação ao primeiros dias de cultura. Duas amostras foram tomadas de um meio de cultura no primeiro dia, as outras duas amostras foram tomadas de um cultivo que se encontrava em estágio de cisto.

Um dos fatores que influencia a variação do sinal Raman nas microalgas, é a concentração dos pigmentos. As células em uma mesma condição de cultura podem apresentar variações na produção e acumulação de carotenóides. Para determinar esta variação se tomaram 2 mL de meio de cultura da microalga *Haematococcus pluvialis* em estágio de cisto, a amostra foi centrifugada por 4 minutos a 4,4 rpm, o sobrenadante foi retirado e se realizaram espectros de 43 células deste meio. Seguidamente foi realizada a extração dos carotenoides, pelo qual a amostra foi secada a 100°C, por duas horas, seguidamente foi esfriada no desecador, pesada e macerada, a extração dos carotenóides foi realizada seguindo o processo de extração por solventes, utilizando um solvente

orgânico. Após a extração a biomassa residual foi examinada novamente por espectroscopia Raman e secada para comparação por análise gravimétrica.

Todas os gráficos correspondentes, curvas de crescimento de cultivo, espectros e curvas de calibração foram construídas no software OriginPro 8.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes ao acompanhamento do crescimento da biomassa, os perfis espectrais da biomassa úmida e das amostras de padrões de β-caroteno, ácido oléico e amostras comerciais de astaxantina, e óleos comerciais. Os resultados obtidos da análise de carotenóides e lipídeos em microalgas serão comparados com trabalhos publicados na literatura.

### 5.1 Curvas de crescimento das microalgas

A Fig. 13 apresenta as curvas de crescimento do inóculo do cultivo mãe das espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp*.

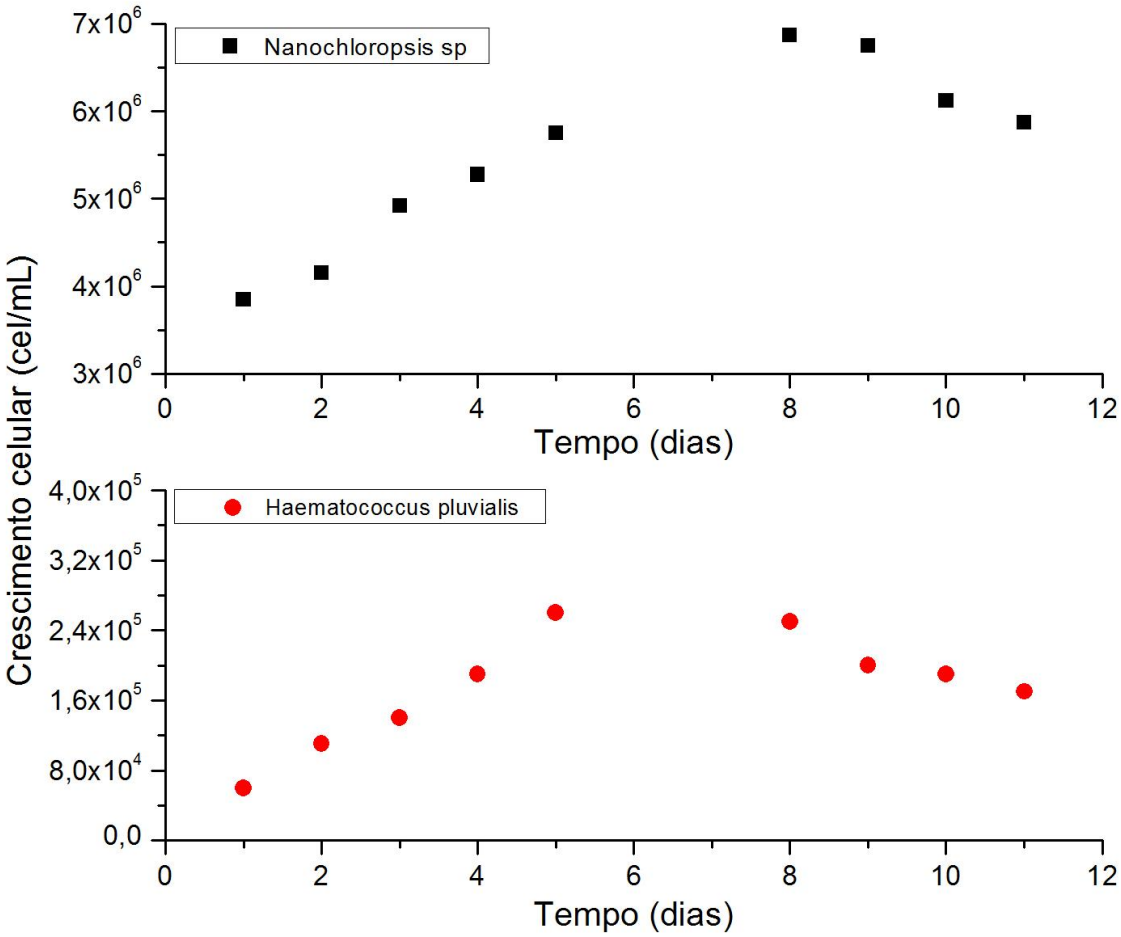



Fig.13: Curvas de crescimento para as microalgas das espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp*.

O cultivo do inoculo mãe foi parado na fase de crescimento, devido a que é a fase ideal para inocular os cultivos dos quais se fizeram os experimentos de caracterização. Os cultivos feitos a partir do inoculo mãe foram acompanhados nos primeiros 10 dias quando a curva de crescimento começou a diminuir.

O processo de estresse se reflete no decaimento da curva de crescimento celular no tempo. Este processo pode ocorrer por vários fatores, como o esgotamento dos nutrientes necessários para o crescimento e a divisão celular.

O processo de estresse nas microalgas não só e visível através das curvas de crescimento, também é possível observar o nível de estresse com a mudança na coloração do cultivo. Assim, por exemplo, a espécie *Haematococcus pluvialis* passa de uma coloração verde intensa nos primeiros dias de cultura a uma coloração marrom avermelhada do oitavo dia em diante, esta coloração reflete na produção e acumulo de astaxantina ao interior celular, resultante do esgotamento dos nutrientes.No caso da espécie *Nannochloropsis sp*, sua coloração varia do verde intenso dos primeiros dias de cultura ao amarelo do oitavo dia em diante, esta coloração é um indicativo do acumulo de β-caroteno, assim como também do acumulo de lipídeos.

A Fig. 14 apresenta duas fotografias do cultivo de *Haematococcus pluvialis Nannochloropsis sp*, no décimo dia de cultura.

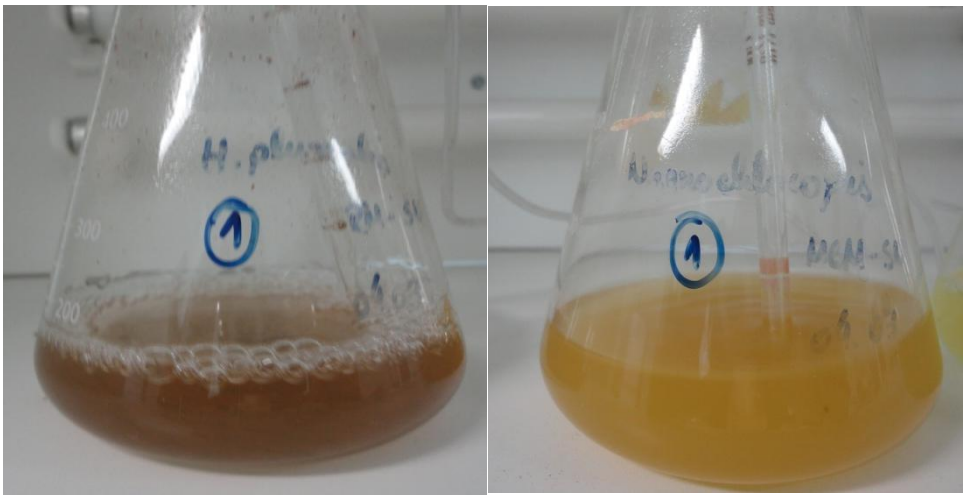
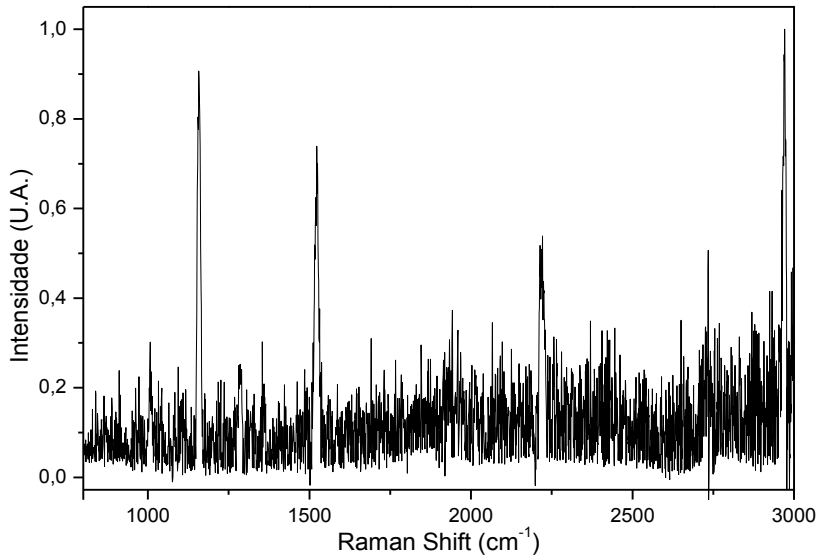


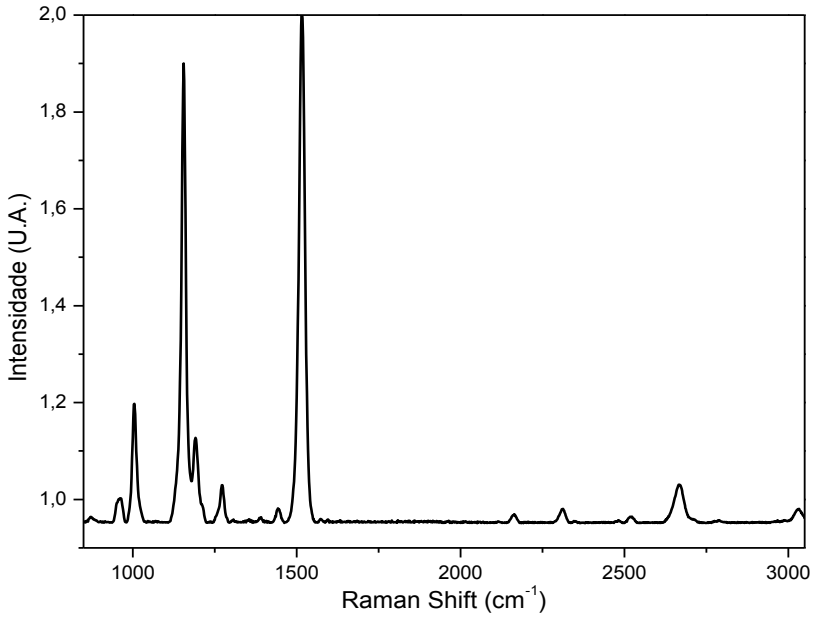
Fig.14: Fotografia dos cultivos de microalgas no dia 10, após o estresse por esgotamento de nutrientes. Na esquerda, cultivo da *Haematococcus pluvialis*, com uma coloração marrom avermelhado. Na direita o cultivo da *Nannochloropsis sp*, de cor amarela.

## 5.2 Análises da biomassa.

A Fig. 15 apresenta os espectros obtidos com a biomassa seca e com as microalgas *in vivo* da espécie *Nannochloropsis sp*. onde se observa um melhoramento na resolução dos sinais de interesse quando é utilizada a biomassa úmida, o mesmo padrão de comportamento foi observado para a espécie *Haematococcus pluvialis.*




(a)




(b)

Fig.15: Na imagem a) se encontra o espectro Raman da biomassa seca da microalga da espécie *Haematococcus pluvialis*, na imagem b) se encontra o espectro Raman da célula da microalga da mesma espécie.

Os espectros obtidos a partir da biomassa seca apresentaram uma relação sinal/ruído baixa, dificultando a identificação dos sinais de interesse, tanto de lipídeos como de carotenóides. No caso da biomassa úmida, a relação sinal/ruído encontrada nos espectros Raman foi visivelmente melhor.

Levando em consideração estes resultados preliminares, os experimentos realizados posteriormente foram todos utilizando unicamente biomassa úmida. O que diminuiu consideravelmente o tempo de pré-tratamento das amostras, permitindo assim a obtenção de informação do cultivo em tempo real.

## 5.2 Caracterização de lipídeos e carotenóides

Nesta etapa se reportam os espectros Raman de amostras comerciais e padrões de lipídeos e carotenóides, com a finalidade de identificar os sinais que correspondem a estas espécies moleculares. Igualmente, também se apresentam os espectros das espécies de microalgas escolhidas para este estudo.

### 5.2.1 Caracterização de carotenóides:

Para a caracterização de carotenóides se utilizou uma amostra comercial de astaxantina e uma amostra de padrão de β-caroteno (Sigma-Aldrich). Os espectros obtidos destas amostras se apresentam na Fig. 16. A espectroscopia Raman é uma técnica que mede as frequências vibracionais de um sistema. Devido às estruturas químicas da astaxantina e o β-caroteno serem similares, estas apresentam perfis espectrais similares.

Os sinais mais relevantes correspondentes aos carotenóides são da flexão C-H (1008 $cm^{-1}$), tensão da ligação C-C (1155 $cm^{-1}$) e tensão da ligação C=C (1524 $cm^{-1}$). Além dos sinais principais, também se observam nos espectros os principais harmônicos destas mesmas vibrações na região de 2312 $cm^{-1}$ e 2667 $cm^{-1}$ [30,31].

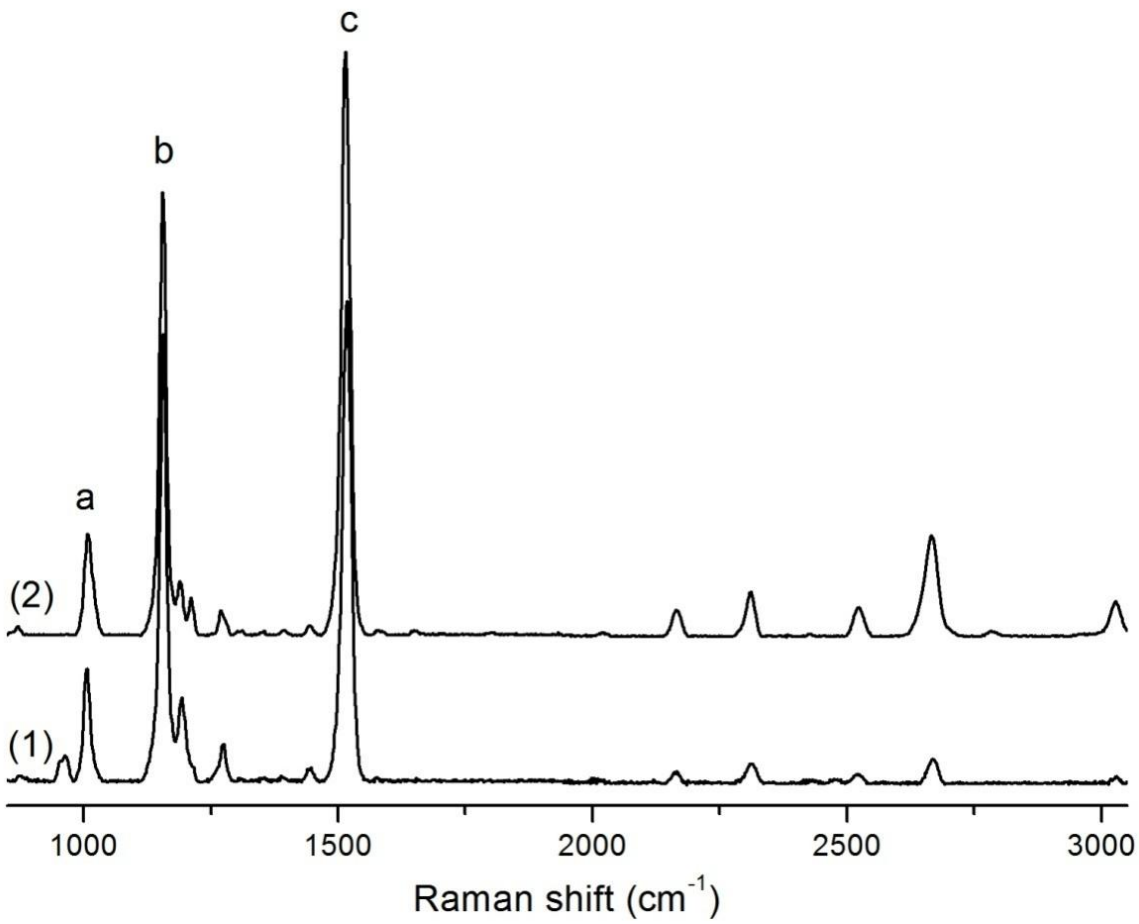



Fig. 16: Espectros Raman de (1) astaxantina; (2) β-caroteno, os sinais marcados com letras correspondem aos sinais mais característicos dos carotenóides: a) 1008 $cm^{-1}$, b) 1155 $cm^{-1}$, c) 1524 $cm^{-1}$.

A estrutura química das moléculas de astaxantina e β-caroteno são similares, sua única diferença reside na adição de um grupo hidroxila e um grupo carbonila nos anéis do ciclohexeno que se encontram nos extremos da cadeia carbônica insaturada da molécula de astaxantina. Estas estruturas apresentam semelhanças devido ao fato que o β-caroteno é um dos precursores da astaxantina.

A Fig. 17 apresenta um esquema dos estágios da biossíntese de carotenóides, onde as principais etapas são dessaturação, ciclização e hidroxilação, sendo nestas duas últimas etapas onde se formam os carotenos como o β-caroteno, e as xantofilas como a astaxantina [36].

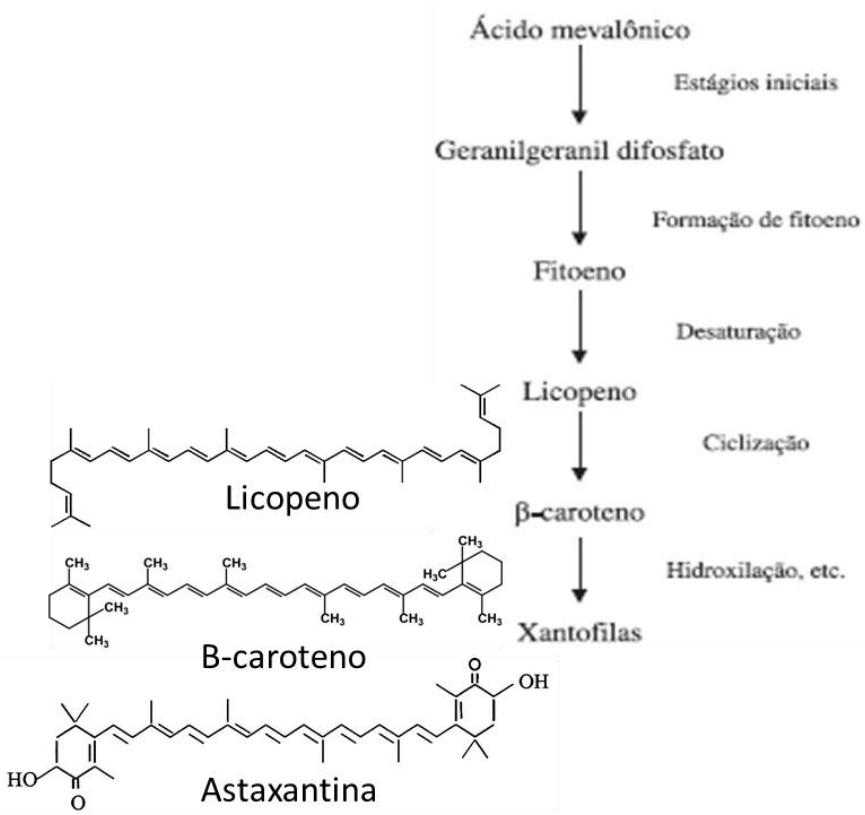



Fig. 17: Esquema dos estádios da biossíntese de carotenóides.
Fonte: Adaptado de ref [36].

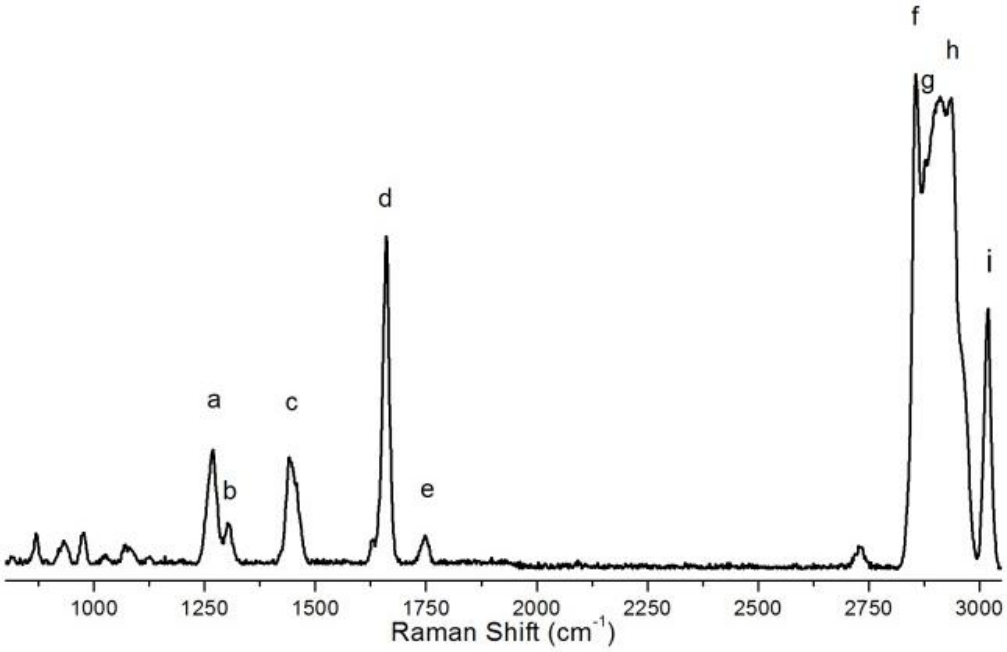
### 5.2.2 Caracterização de lipídeos:

Além dos carotenóides, os lipídeos são bioprodutos das microalgas amplamente estudados, devido ao seu potencial como fontes de energia. Esta característica dos lipídeos faz com que estas biomoléculas sejam responsáveis por proporcionar energia para os processos de metabolismo celular, já que eles acumulam energia em quantidade maior. Os lipídeos são o meio de armazenamento de energia química ao interior da célula.

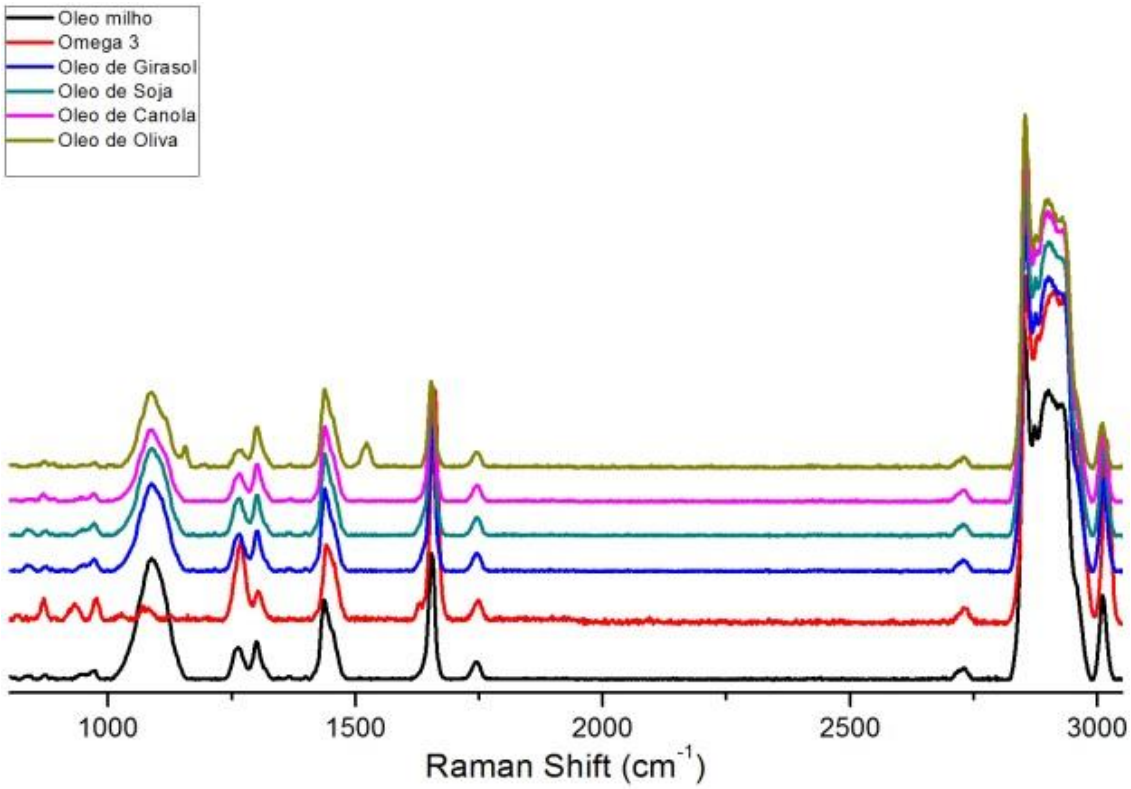
A Fig. 18 (a) apresenta o espectro Raman de uma amostra comercial de ômega-3, e a Fig. 18 (b) apresenta os espectros Raman de outros óleos vegetais comerciais; o perfil espectral que se observa em todos os casos é o mesmo.

Os arranjos geométricos de suas estruturas moleculares geram vibrações características observáveis nos espectros Raman, então é de se esperar que o

perfil espectral dos óleos seja o mesmo, apresentando variações unicamente na intensidade dos sinais.




(a)




(b)

Fig.18: a) Espectro Raman de ômega-3, os sinais marcados com letras correspondem vibrações dos lipídeos: a) 1266 $cm^{-1}$, b) 1300 $cm^{-1}$, c) 1443 $cm^{-1}$, d) 1660 $cm^{-1}$, e) 1748 $cm^{-1}$, f) 2850 $cm^{-1}$, g) 2884 $cm^{-1}$, h) 2939 $cm^{-1}$, i) 3010 $cm^{-1}$. b) Espectro Raman de óleos comerciais de milho, ômega-3, girassol, soja, canola e oliva. Todas as amostras apresentam o mesmo perfil espectral.

Os sinais correspondentes aos lipídeos são apresentados na Tabela 5.1. Os sinais são gerados pelas vibrações intermoleculares dos lipídeos, onde os modos vibracionais são: deformação no plano *cis* da ligação=C-H (1266 $cm^{-1}$), movimento de torque $CH_2$ (1302 $cm^{-1}$), vibração tipo tesoura do $CH_2$ (1443 $cm^{-1}$), vibração de extensão *cis* C=C (1660 $cm^{-1}$), vibração de extensão C=O (1748 $cm^{-1}$), e a vibração de extensão C-H (2845-3107 $cm^{-1}$) [31,37]. Semelhantemente aos carotenóides, espera-se que o perfil espectral dos óleos sejam similares entre si, apenas com variações nas intensidades dos sinais.

Tabela 5. 1: Sinais Raman dos lipídeos.

| **Vibração** | **Sinal Raman ($cm^{-1}$)** |
|---|---|
| (=C-H) *cis* | a) 1266* |
| (C-$H_2$) | b) 1300* |
| (C-$H_2$) | c) 1443* |
| (C=C) *cis* | d) 1660* |
| (C=O) | e) 1748* |
| (C-$H_2$) | f) 2850* |
| (C-$H_3$) | g) 2884* |
| (C-$H_2$) | h) 2939* |
| (=C-H) | i) 3010* |

*Referencias: [29,31,37].

A variação na posição do sinal Raman esta relacionada com uma vibração especifica no sistema molecular estudado. Uma das características mais importantes dos óleos está relacionada ao grau de insaturação dos ácidos graxos que fazem parte deles.

Assim, segundo estudos realizados [29,37]. O sinal correspondente à vibração $CH_2$ (1443 $cm^{-1}$) é um fator indicador de saturação dos ácidos graxos, e o sinal C=C (1660 $cm^{-1}$) é um fator indicador da insaturação dos ácidos graxos presentes nas amostras. Portanto, para determinar por espectroscopia Raman a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados presentes em um óleo é preciso fazer uma relação entre as intensidades dos sinais em 1443 $cm^{-1}$ e 1660 $cm^{-1}$.

Foi calculada a relação de saturação para dois óleos: óleo de milho e ômega-3, a relação de intensidades do óleo de milho foi de $I_{1660}/I_{1443}$=1,58, e

esta relação para o ômega-3 foi de $I_{1660}/I_{1443}$=2,93. Esta diferença entre as intensidades dos sinais é observável facilmente nos espectros apresentados na Fig. 19, e evidencia que o ômega-3 apresenta um maior grau de insaturação quando comparado ao óleo de milho.

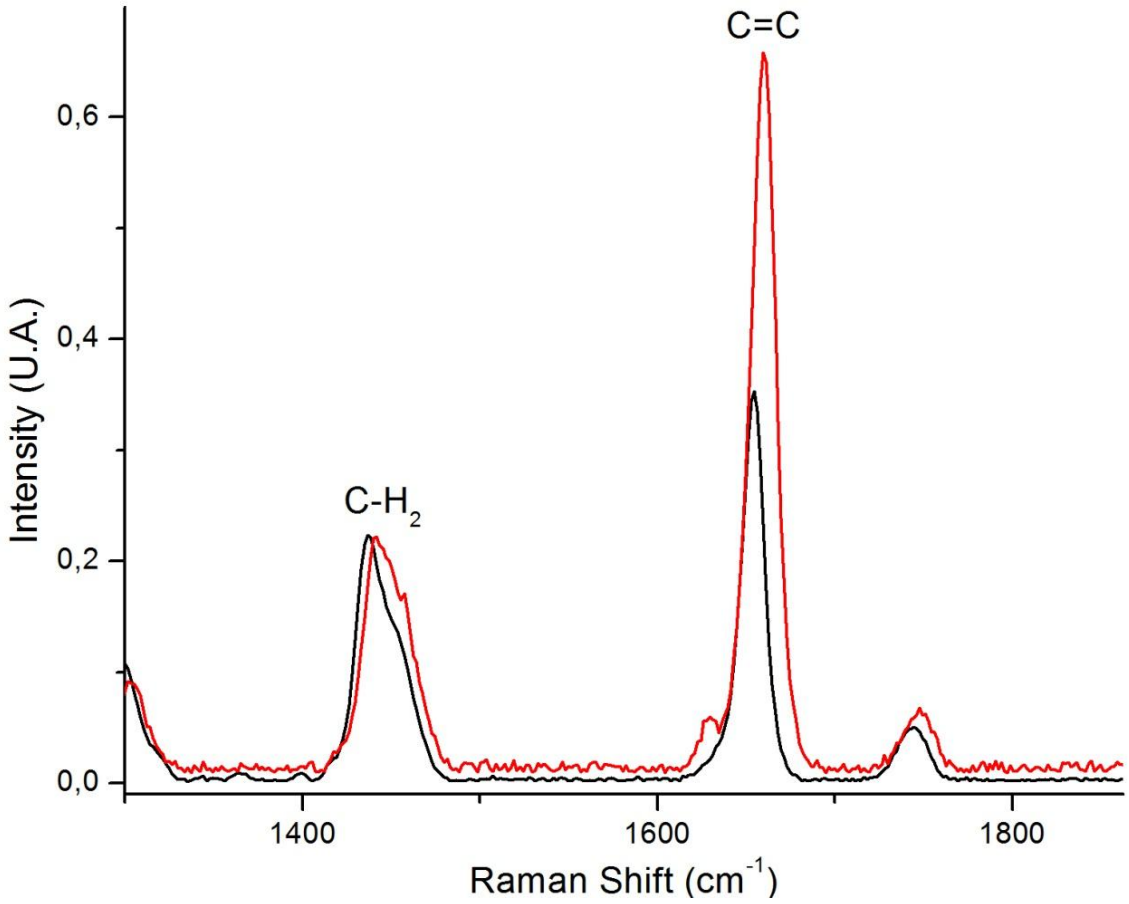



Fig. 19: Espectros Raman de amostras comerciais de ômega-3 (linha vermelha), e óleo de soja (linha preta), o sinal de vibração $CH_2$ em (1443 $cm^{-1}$) e o sinal de vibração C=C em (1660 $cm^{-1}$).

Outra região importante dos espectros Raman dos lipídeos compreende desde 2850 $cm^{-1}$ a 3010 $cm^{-1}$como se observa nos espectros apresentados na Fig.19, o sinal em 3010 $cm^{-1}$nestes espectros evidencia mais uma vez as insaturações presentes nos ácidos graxos [37].

Segundo os estudos realizados por [31]. O sinal em 2885 $cm^{-1}$ correspondem as vibrações simétricas dos enlaces $C\text{-}H_3$ e o sinal em 2970 $cm^{-1}$ as vibrações assimétricas deste mesmo enlace $C\text{-}H_3$. Em geral nesta região se encontram os sinais correspondentes aos modos vibracionais dos enlaces $CH_2$ e $C\text{-}H_3$.

Na Fig. 20 se apresentam os espectros dos padrões de β-caroteno e ácido oleico onde se observa uma variação nos sinais Raman de interesse. Os sinais entre 2850 a 3010 $cm^{-1}$ unicamente são encontrados nas amostras de ácido oleico. Os sinais em 1157 $cm^{-1}$ e 1523 $cm^{-1}$ são característicos dos carotenóides, conforme visto anteriormente.

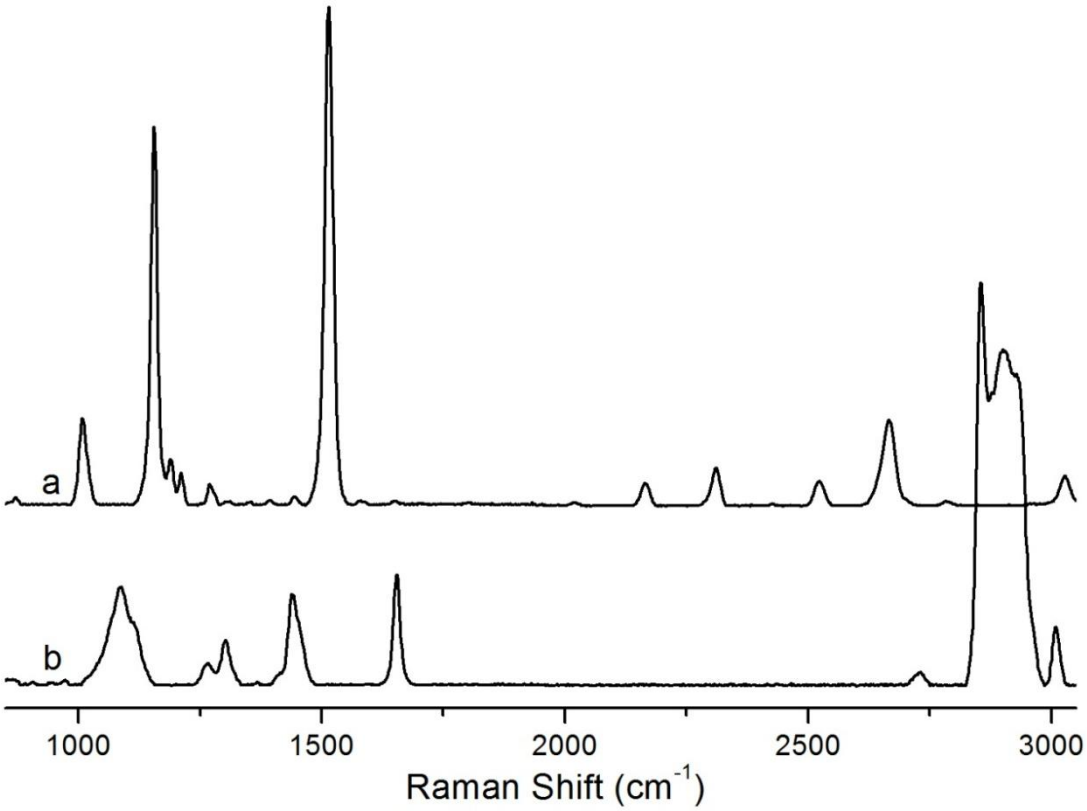



Fig. 20: Espectros Raman dos padrões: a) β-caroteno, b) Ácido oleico.

As microalgas são organismos capazes de produzir e acumular carotenóides e lipídeos, portanto é de se esperar encontrar sinais destes dois tipos de biomoléculas nos espectros Raman das microalgas.

A Fig. 21 apresenta os espectros Raman das espécies de microalgas *Nannochloropsis sp* e *Haematococcus pluvialis,* e os espectros dos padrões de ácido oleico e β-caroteno. Os espectros foram realizados com amostras das microalgas *in vivo.* Observa-se que o perfil espectral das microalgas é similar tanto ao padrão de carotenóides quanto ao padrão dos lipídeos. Os sinais de interesse são identificados nos espectros por meio de número de 1 a 9, sendo os

sinais dos carotenóides identificados com os números 1: 1008 $cm^{-1}$, 2: 1154 $cm^{-1}$, e 3: 1524 $cm^{-1}$, e os sinais dos lipídeos identificados com os números 4: 1266 $cm^{-1}$, 5: 1307 $cm^{-1}$, 6: 1443 $cm^{-1}$, 7: 1654 $cm^{-1}$ e na região mostrada entre os números 8 e 9: 2852-2959 $cm^{-1}$.

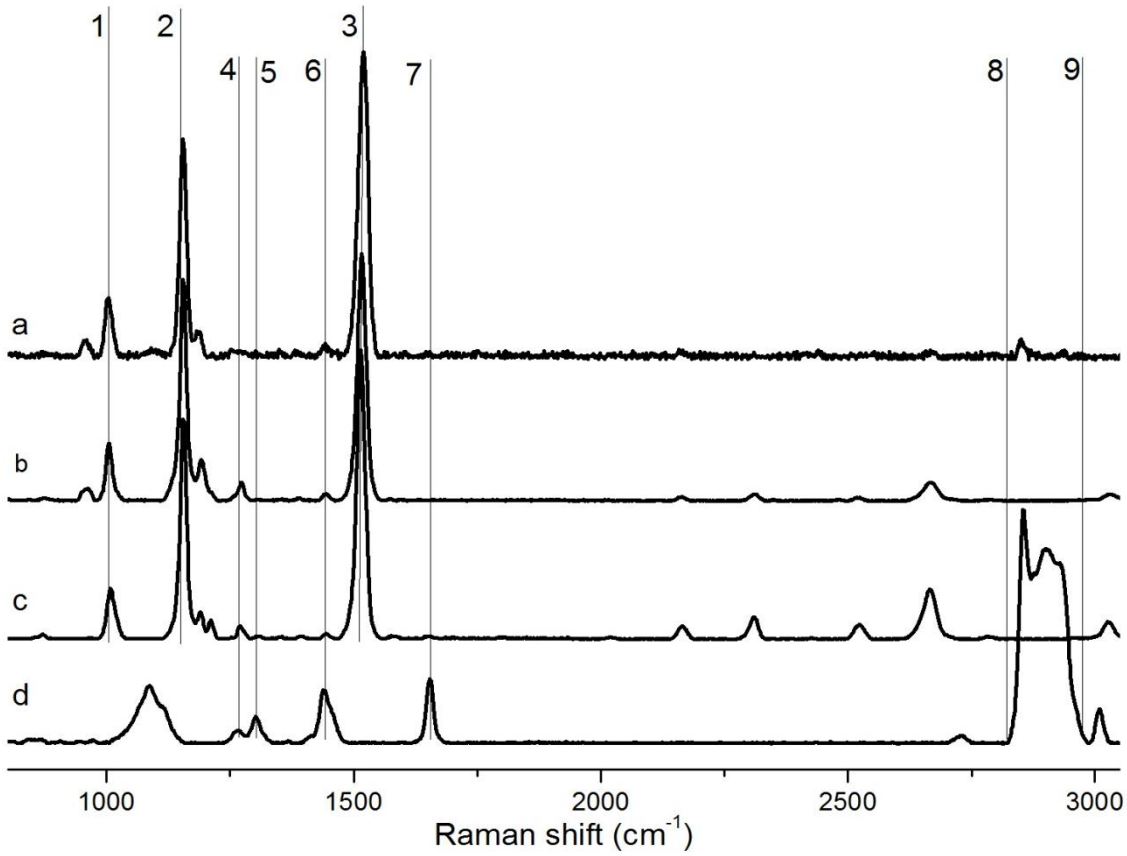



Fig. 21: Espectros Raman de: a) microalga Nannochloropsis sp; b) microalga Haematococcus pluvialis; c) β-caroteno; d) ácido oleico; os sinais representados com os números de 1-3 correspondem aos carotenóides e os sinais representados com os números de 4-9 correspondem aos lipídeos.

É de esperar que a intensidade dos sinais dos carotenóides seja visivelmente alta em comparação com os lipídeos, já que as microalgas são organismos de atividade fotossintética, que metabolizam compostos de alta atividade eletrônica, denominados compostos cromóforos, como os carotenóides, responsáveis pela transformação de energia solar em energia química.

Em contraste, a intensidade das bandas atribuídas aos lipídeos é baixa já que a síntese e acumulação dos mesmos no interior da célula depende da adaptabilidade ao meio, e também varia de uma espécie a outra.

Os sinais dos carotenóides estão fortemente presentes nas duas espécies de microalgas estudadas, mas os sinais dos lipídeos são muito baixos na espécie *Haematococcus pluvialis* em comparação com os mesmos sinais para a espécie *Nannochloropsis sp*., esta variação no sinal dos lipídeos se deve ao fato que a espécie *Haematococcus pluvialis* tende a produzir o carotenóide astaxantina quando submetida ao estresse e a espécie *Nannochloropsis sp*., tende a produzir, além de β-caroteno, lipídeos na mesma condição de estresse.

### 5.3 Fatores que influenciam a intensidade do sinal Raman nas microalgas

Uma vez identificados os sinais de interesse nos espectros Raman das microalgas, é importante determinar quais são os fatores que influenciam positiva e negativamente a intensidade dos sinais. Neste trabalho se levou em consideração o esgotamento dos nutrientes ao longo dos dias de cultivo, esperando-se um aumento dos sinais tanto de carotenóides como de lipídeos. Outro fator estudado foi a influência do tempo de exposição ao laser, assim como a variabilidade da intensidade dos sinais entre células diferentes no mesmo meio de cultura. É importante analisar os fatores físico-químicos e instrumentais que afetam o sinal, para poder determinar se é possível realizar uma quantificação tanto de lipídeos como de carotenóides.

#### 5.3.1Efeitos do esgotamento dos nutrientes nos espectros Raman

Utilizando a espectroscopia Raman foi possível fazer uma análise em tempo real da acumulação de lipídeos nas microalgas. A Fig. 22 apresenta uma sequência de espectros da espécie *Nannochloropsis sp*. Os espectros foram obtidos a partir das células das microalgas *in vivo*, com a finalidade de acompanhar o comportamento do cultivo ao longo dos dias, quando os nutrientes começaram a se esgotar.

Com a letra (a) se sinalizou o primeiro dia de cultivo e com a letra (f) o ultimo dia. Nos espectros observa-se um aumento consecutivo dos sinais

correspondentes aos lipídeos em 1443 $cm^{-1}$ e também na região compreendida entre 2850 a 3000 $cm^{-1}$,o qual é proporcional à passagem dos dias.

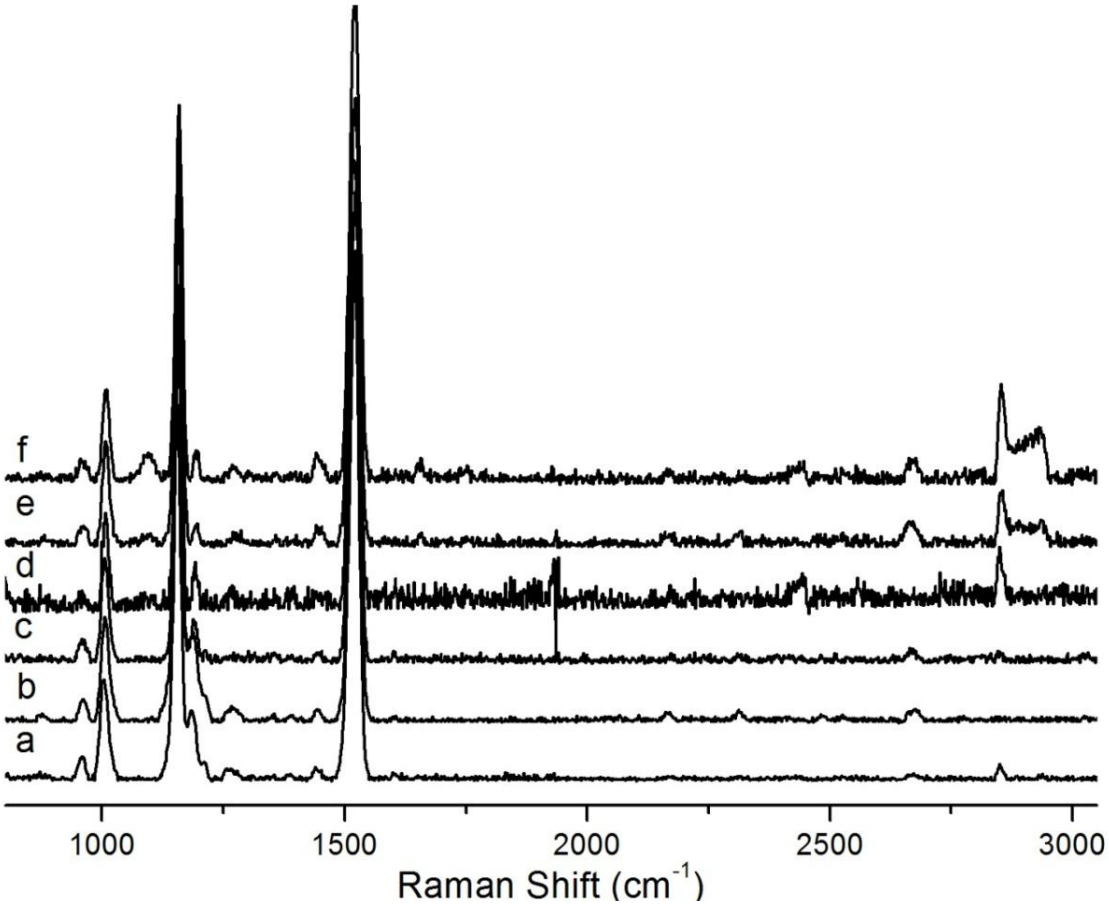



Fig. 22: Espectros Raman da espécie *Nannochloropsis sp*. Os espectros se obtiveram com a finalidade de monitorar o cultivo que apresenta estresse por esgotamento de nutrientes nos dias: a) zero; b) um; c) três; d) seis; e) oito; f) dez.

O espectro Raman de uma célula é formado pela união de um grande numero de moléculas biológicas. A contribuição relativa de cada componente depende da abundância relativa e da sensibilidade do sistema de detecção. Os lipídeos mais simples são os ácidos graxos, os quais consistem em grandes cadeias carbônicas que geralmente contém entre 16 a 22 átomos de carbono, e contém um grupo carboxílico em um de seus extremos ($COO^-$) [38].

Os ácidos graxos insaturados podem conter uma ou mais ligações duplas. Os ácidos graxos são armazenados na forma de triglicerídeos que são moléculas constituídas por uma molécula de glicerol e três cadeias de ácidos graxos.A composição dos triglicerídeos depende de quatro fatores

principalmente: os constituintes ácidos graxos, o comprimento das cadeias, o grau de insaturação das cadeias e a posição das ligações duplas [38].

No entanto, para as análises realizadas neste trabalho, não são relevantes as características dos ácidos graxos que fazem parte dos triglicerídeos nas espécies de microalgas estudadas, já que a análise se restringe ao acúmulo de lipídeos de forma genérica no interior das células.

A Fig. 23 mostra os espectros da espécie *Haematococcus pluvialis* após estresse por nutrientes.Os três espectros apresentados exibem uma variação significativa na intensidade dos sinais que correspondem aos carotenóides. A Fig. 23 mostra apenas a região entre 850 $cm^{-1}$ a 1800 $cm^{-1}$, única região que apresentou bandas consideráveis no espectro.

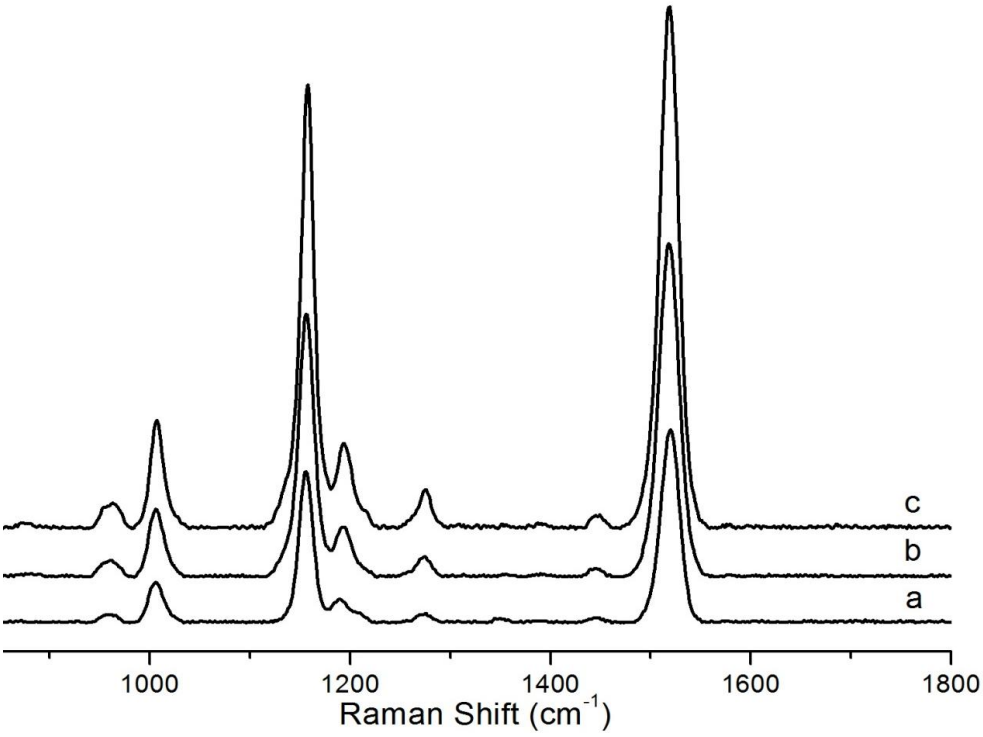



Fig. 23: Espectros Raman da espécie *Haematococcus pluvialis*. Os espectros se obtiveram com a finalidade de monitorar o cultivo que apresenta estresse por esgotamento de nutrientes nos dias: a) zero; b) seis; c) doze.

As duas espécies, tanto *Haematococcus pluvialis* como *Nannochloropsis sp*, quando submetidas a estresse de falta de nutrientes, apresentam um aumento na intensidade dos sinais Raman. No caso da espécie *Nannochloropsis*

*sp*, os sinais tanto de carotenóides como de lipídeos aumentam com o tempo de cultura, mas, a espécie *Haematococcus pluvialis* unicamente exibe os sinais correspondentes aos carotenóides.Este comportamento corresponde ao fato de que esta espécie produz uma quantidade baixa de lipídeos, sendo de detecção difícil por este método.

### 5.3.2 Efeito do tempo de exposição ao laser nos espectros Raman

Outro fator que influencia a intensidade dos sinais é o tempo de exposição ao laser. A fonte utilizada nos experimentos emitia radiação de 532 nm para todos os casos. O tempo de exposição das microalgas a esta radiação pode causar uma deterioração dos pigmentos carotenóides causando uma diminuição na intensidade do sinal Raman [39]. A Fig. 24 apresenta os espectros Raman da espécie *Haematococcus pluvialis*, onde se observa uma diminuição visível do sinal Raman quando se aumenta o tempo de exposição da célula ao laser.

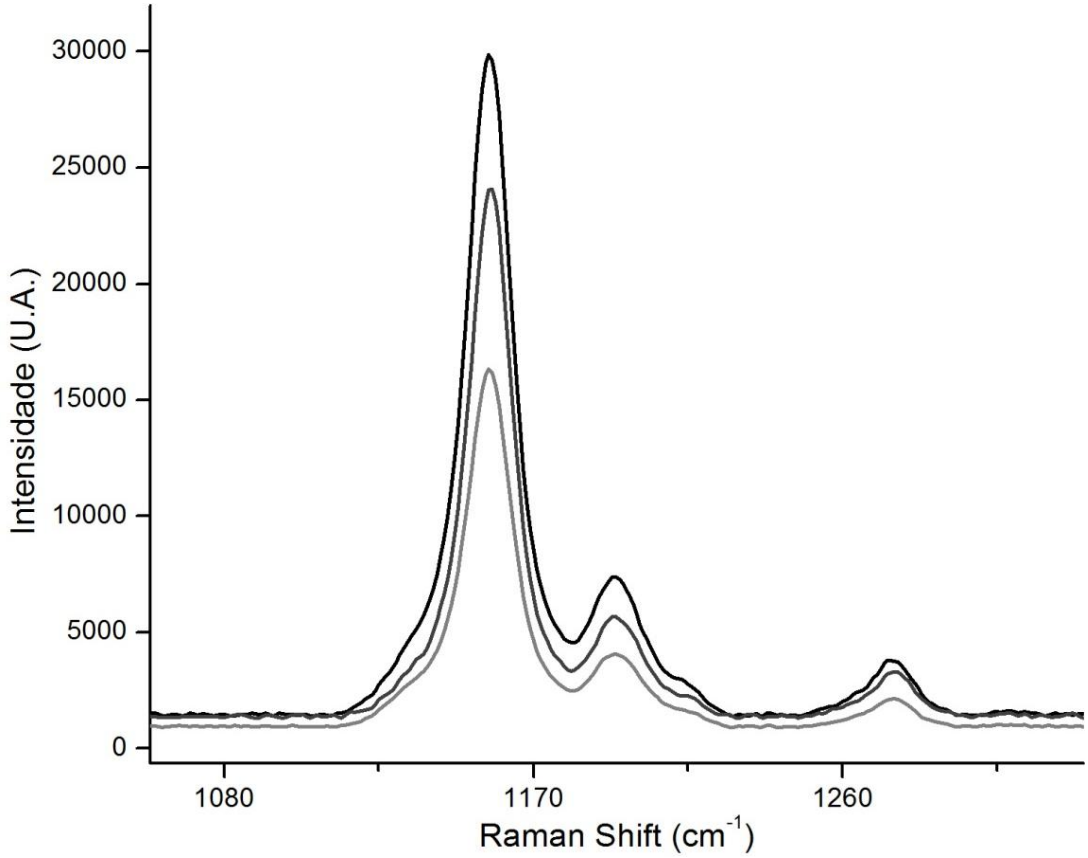



Fig. 24: Espectros Raman da espécie *Haematococcus pluvialis* quando a célula é atingida pelo laser de 532 nm com tempos de exposição de 5 segundos (linha preta), 10 segundos (linha cinza escuro), 15 segundos (linha cinza claro).

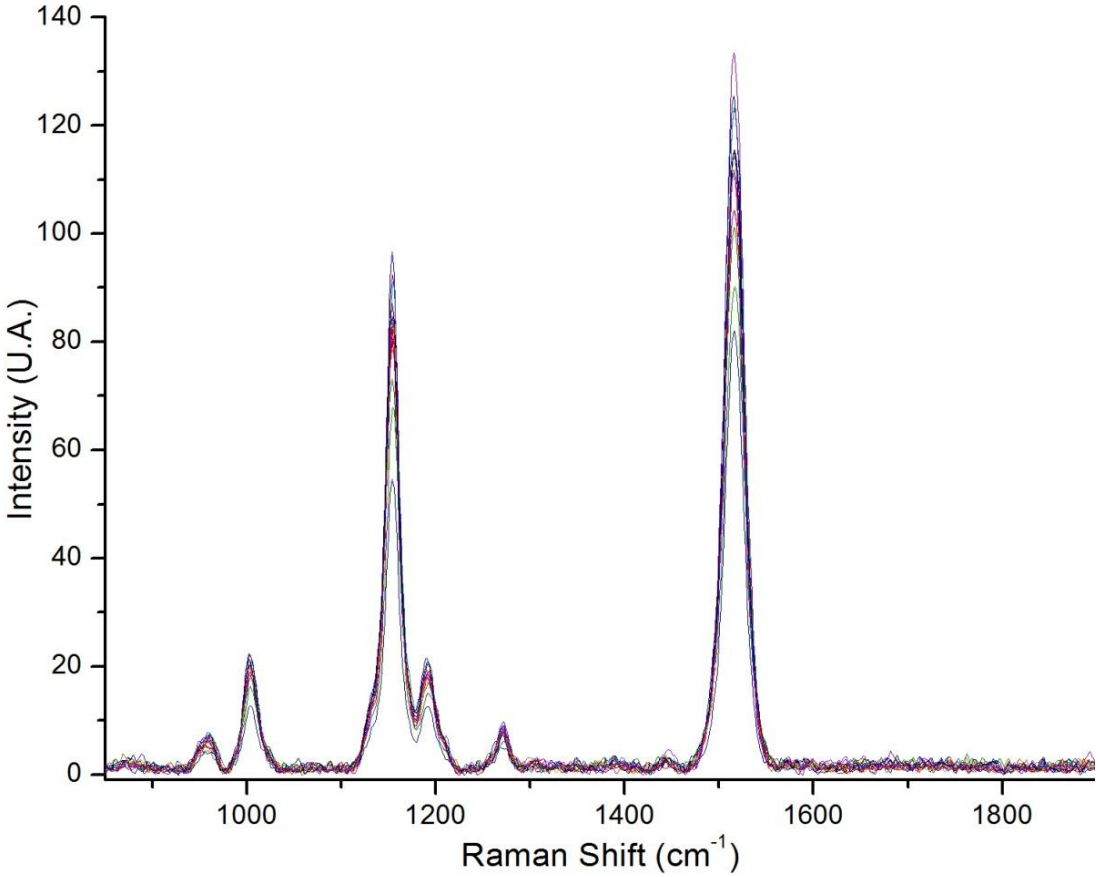
Observou-se uma diminuição da intensidade do sinal Raman com um maior tempo de exposição ao laser, provavelmente devido ao aquecimento das células,causando a fotodegradação dos grupos cromóforos. Neste estudo foi apresentado unicamente o efeito da exposição ao laser para a espécie *Haematococcus pluvialis*, mas comportamento análogo foi relatado para outras espécies de microalgas [39], e afeta unicamente os grupos cromóforos, porque são os mais sensíveis à fotodegradação por exposição prolongada a uma fonte laser.

### 5.3.3 Efeito da variabilidade da intensidade dos sinais em células individuais do meio de cultura.

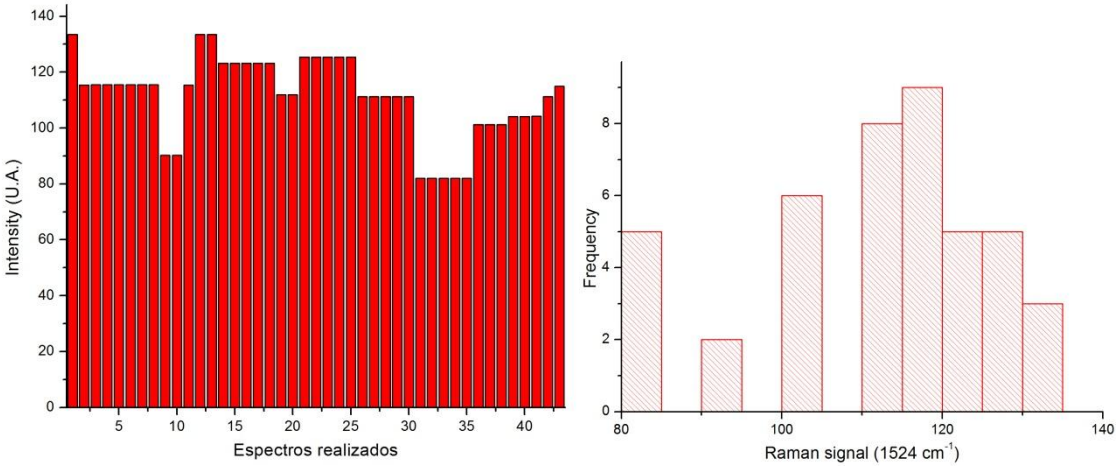
Atualmente é possível fazer uso da espectroscopia Raman para poder analisar espécies vivas, neste caso particular as microalgas, graças aos avanços tecnológicos nesta área da espectroscopia. A espectroscopia Raman facilita a obtenção de informação, já que ao fazer analises *in vivo,* não requer de realizar a extração de carotenóides e lipídeos, diminuindo deste modo o tempo e os recursos necessários para poder obter informações qualitativas e quantitativas das amostras.

Além destas vantagens, a obtenção de espectros a partir das células, também contribui para diminuir as interferências que deixam os processos de extração por solventes, pois tanto os carotenóides como os lipídeos e outras biomoléculas solúveis em solventes orgânicos podem gerar um sinal que afeta o sinal de interesse, sem ser o objetivo da análise. Além disso, o rendimento das extrações não é eficiente, diminuindo a veracidade dos resultados obtidos, como é o caso dos métodos gravimétricos e espectrofotométricos, assim como os cromatográficos cujas intensidades são afetadas pela eficiência das extrações [40]. Na espectroscopia Raman, mesmo considerando que fatores externos não afetem os resultados das análises *in vivo*, as células são indivíduos independentes que em idênticas condições de cultura não produzem e acumulam biomoléculas da mesma forma. Estas variações serão observadas nos espectros Raman, e são naturais de qualquer sistema biológico.

A Fig. 25 apresenta os espectros Raman e os histogramas de 43 células de *Haematococcus pluvialis,* obtidas de um cultivo em estágio de cisto, num experimento realizado para determinar a variabilidade da intensidade do sinal Raman entre indivíduos celulares, em condições idênticas de cultivo.



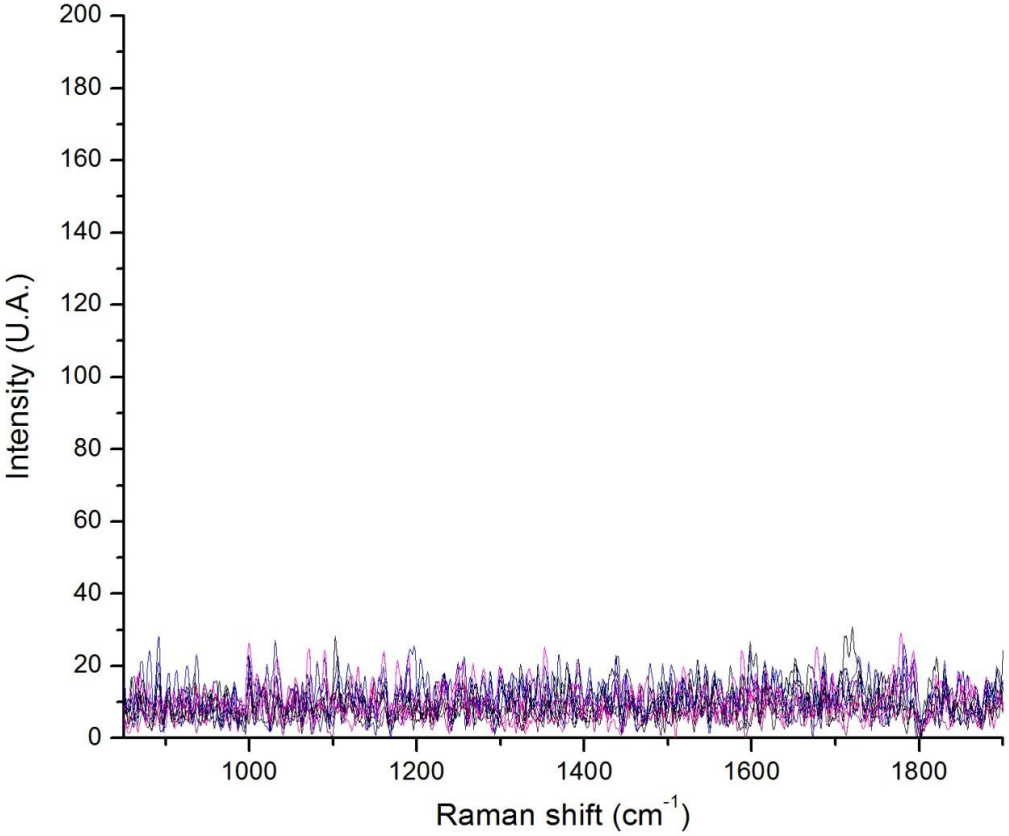

(a)



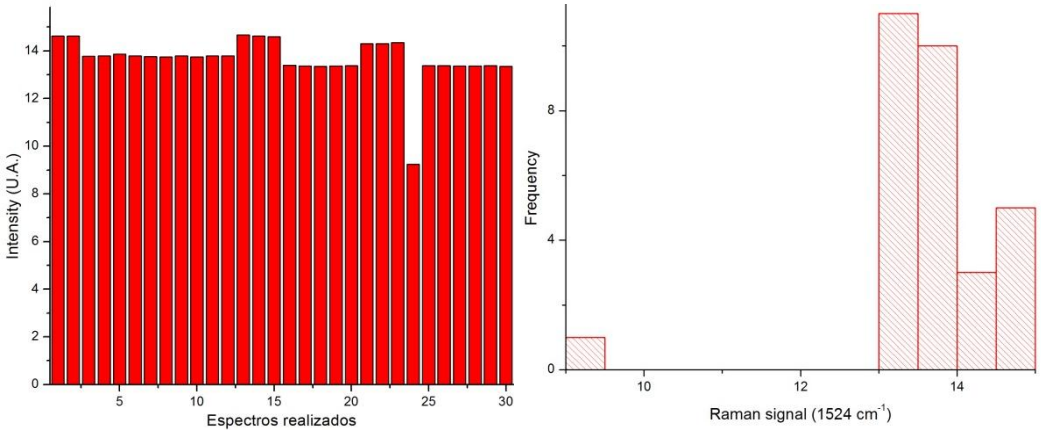

(b)

Fig. 25: a) Espectros Raman de 43 células de *Haematococcus pluvialis*; b) Esquerda: Histograma dos espectros realizados em função da intensidade do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$); Direita: Histograma da frequência do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$), correspondente aos carotenóides.

A Fig. 26 mostra os espectros Raman e os histogramas obtidos para a biomassa da espécie *Haematococcus pluvialis* após a extração dos carotenóides.




(a)




(b)

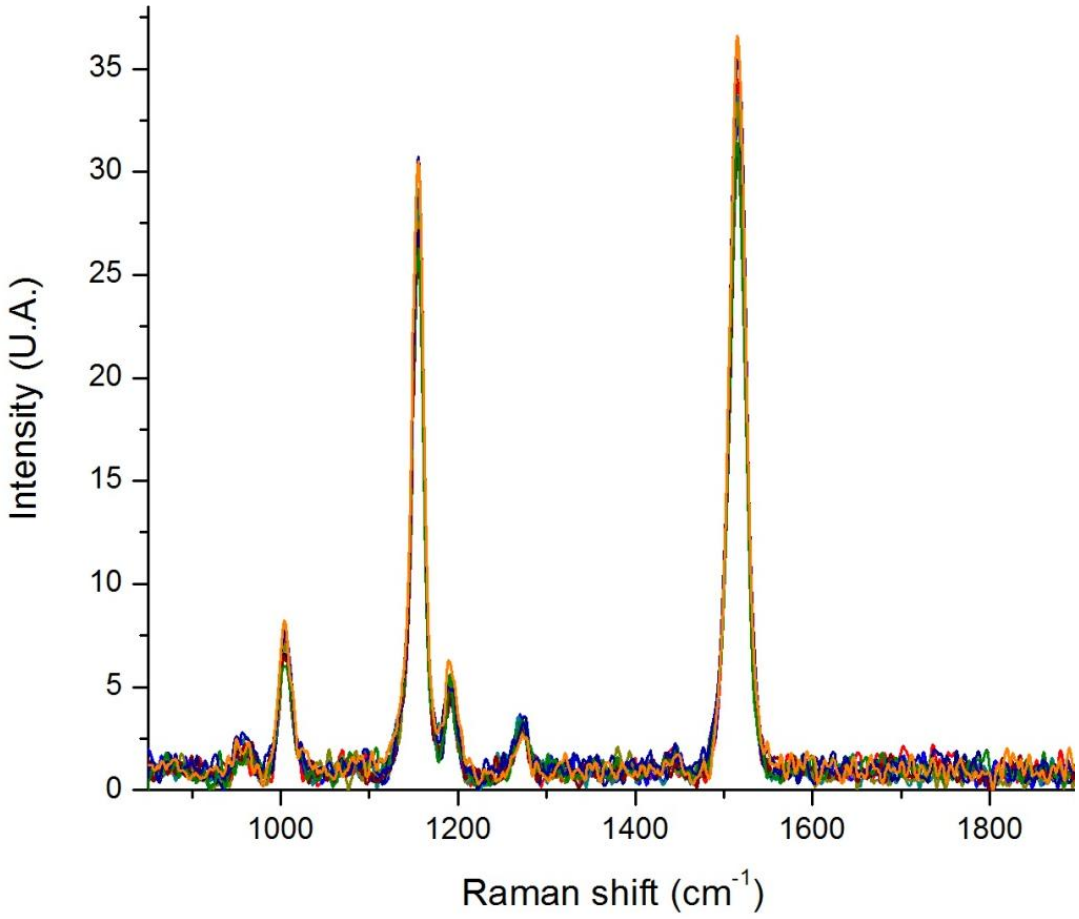
Fig. 26: a) Espectros Raman de amostras de biomassa após extração de carotenóides; b) Esquerda: Histograma dos espectros realizados em função da intensidade do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$); Direita: Histograma da frequência do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$), correspondente aos carotenóides.

As Fig.s 25 e 26 apresentam as análises estatísticas realizadas para uma população correspondente a uma amostra de cultura de 2 mL da espécie *Haematococcus pluvialis* em estágio de cisto.

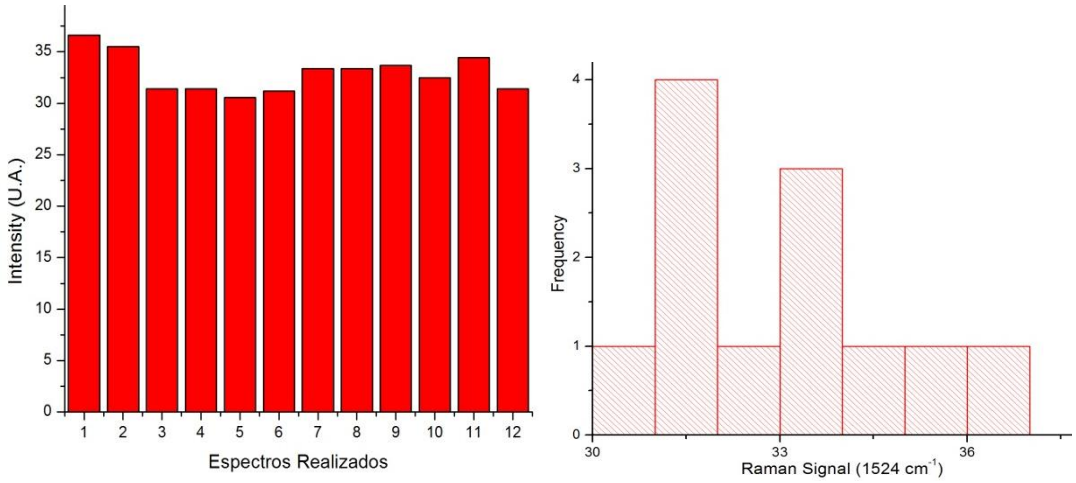
Uma vez realizados os 43 espectros em células com tamanhos similares, observou-se que a intensidade dos sinais dos carotenóides varia de uma célula a outra, obtendo-se a intensidade mínima em 82,1 e a intensidade máxima de 133,5, a intensidade média obtida foi de111,2 sendo que o valor mediano calculado foi de 115,0. O desvio padrão encontrado para estas medições foi de 14,6. No entanto,este valor não deve ser considerado como erro da medição, já que a variabilidade nas intensidades dos sinais dos carotenóides está relacionada ao fato que as análises foram feitas com as células *in vivo*, e cada célula é um individuo independente que produz e acumula nutrientes de forma independente.

A Fig. 26 mostra os espectros Raman e os histogramas de intensidades do sinal da biomassa após o processo de extração de pigmentos. Visualmente, a amostra não apresentou coloração após a extração, indicando alta eficiência deste processo, fato confirmado na análise, pois os espectros não exibiram picos de carotenóides. O desvio padrão de 0,9 calculado para as 30 medições realizadas,pode ser atribuído ao erro da análise, já que as células são mortas durante o processo extração, ou seja, não poderiam ser degradadas pelo laser durante a obtenção dos espectros.

A Fig. 27 apresenta os espectros Raman e os histogramas das intensidades dos sinais para a amostra do extrato obtido. Foi calculado um desvio padrão de 1,9 para doze medições. Os resultados apresentados nas Figs. 26 e 27 confirmam que a alta variabilidade do sinal nas amostras vivas (em torno de 15%) é consequência da acumulação de carotenóides nas células individuais, que não acontece de forma uniforme em todas as células. A incerteza das medições deste método analítico proposto é bem inferior, conforme visto acima, em torno de+/- 0,9/111= 0,008 ou +/-0,8%. A intensidade do sinal no extrato e inferior que na célula viva, devido a que o extrato no momento da medição estava diluído no solvente dimetilsulfóxido (DMSO).




(a)




(b)

Fig. 27: a) Espectros Raman de extrato de carotenóides da espécie *Haematococcus pluvialis*; b) Esquerda: Histograma dos espectros realizados em função da intensidade do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$); Direita: Histograma da frequência do sinal de interesse (1524 $cm^{-1}$), correspondente aos carotenóides.

## 5.4 Quantificação de carotenóides

Com ajuda da espectroscopia Raman conseguiu-se identificar sinais de interesse tanto de lipídeos como de carotenóides provenientes de amostras *in vivo* de microalgas, e também demonstrou-seque esta técnica instrumental pode ser utilizada para fazer um acompanhamento da acumulação destas mesmas moléculas no interior da célula quando são submetidas a estresse por diminuição da concentração dos nutrientes.Nesta seção será apresentada uma análise quantitativa de carotenóides presentes na espécie *Haematococcus pluvialis.*

A Fig. 28 apresenta os espectros das diluições do padrão de β-caroteno em diferentes concentrações.

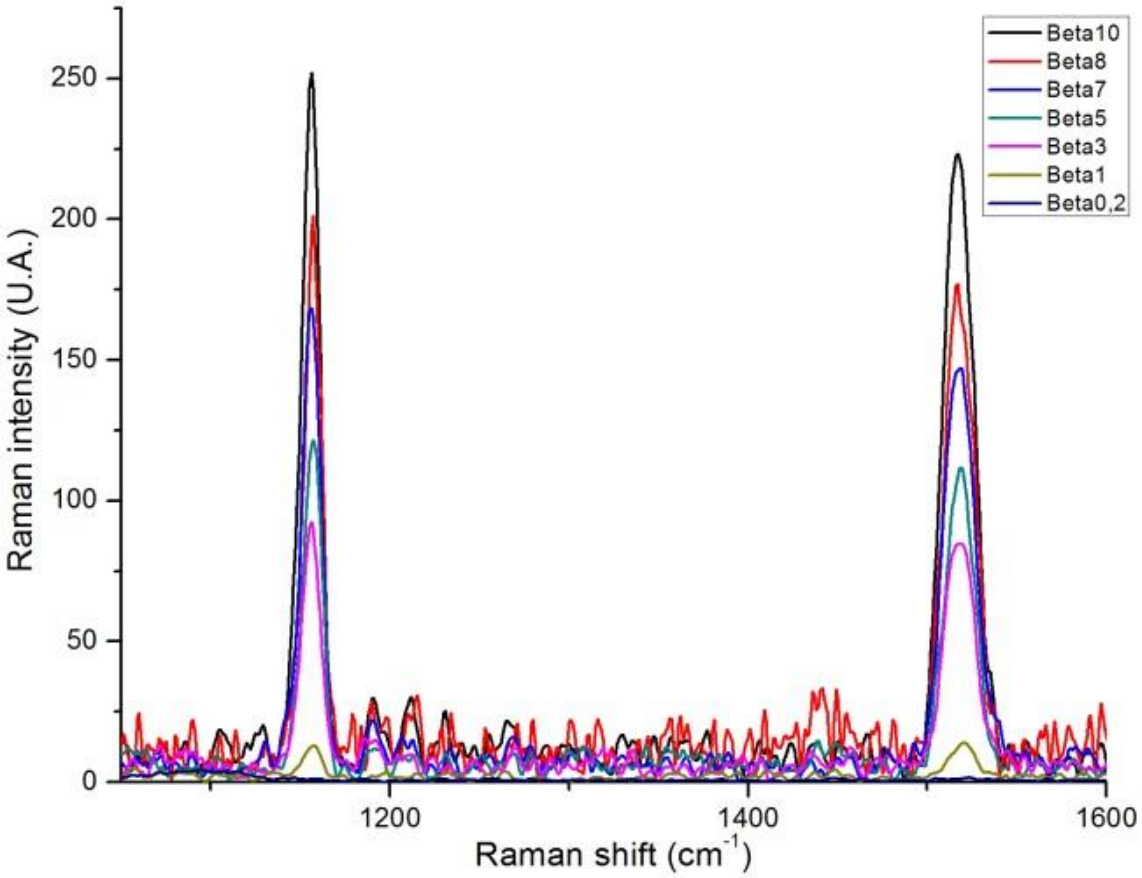



Fig. 28: Espectros Raman do padrão de diferentes concentrações de óleo de soja,(0,2 – 10) %.

Observa-se um aumento da intensidade dos sinais atribuídos ao β-caroteno em 1150 $cm^{-1}$; 1525 $cm^{-1}$ proporcionalmente à concentração do mesmo. O sinal escolhido para construir a curva de calibração com o padrão foi o de1525 $cm^{-1}$, pois não apresenta interferências entre vibrações correspondentes ao β-

caroteno ou ao solvente, encontrando-se uma relação direta entre a intensidade do sinal com a concentração de carotenóides.

Para realizar a curva de calibração dos carotenóides, foi utilizado o β-caroteno para quantificar astaxantina, já que além de apresentar estrutura molecular similar, e consequentemente os mesmos sinais vibracionais, como exposto no capítulo 3. O β-caroteno é um dos carotenóides precursores da astaxantina na via metabólica que ocorre com a espécie *Haematococcus pluvialis* quando submetida a estresse.

A Fig. 29 apresenta a curva de calibração obtida para o β-caroteno:

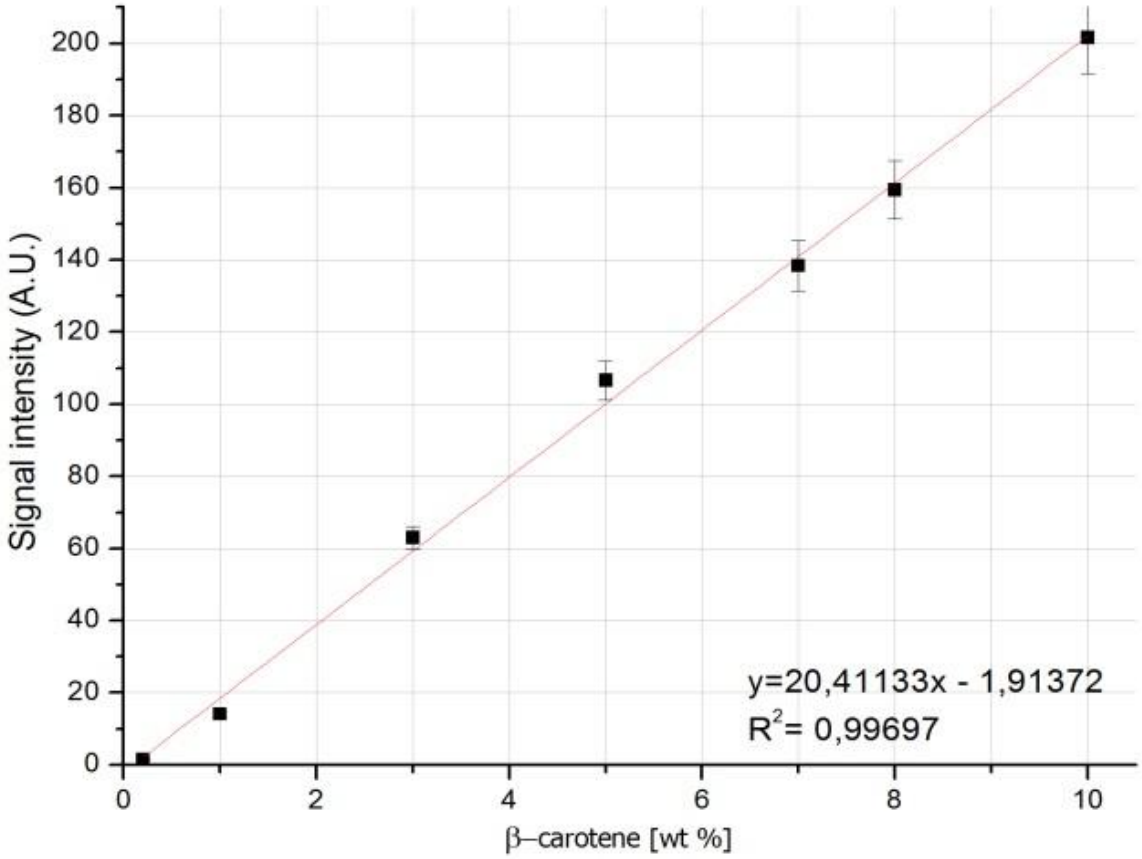



Fig. 29: Calibração do sinal Raman das soluções de β-caroteno. A concentração de β-caroteno foi calculada por médio de uma equação linear com um coeficiente de correlação linear de $r^2$ = 0,99.

A correlação encontrada entre o sinal Raman e a concentração de β-caroteno foi de $r^2 = 0,99$. A equação de calibração encontrada é uma função linear ($y = 20,41133x - 1,91372$).

A Fig. 30 mostra os espectros de quatro células diferentes da espécie de microalga *Haematococcus pluvialis*, duas na fase inicial do cultivo e duas na fase final do cultivo. A diferença na intensidade dos sinais é devida ao fato que no inicio do cultivo a produção de carotenóides é baixa e no final, apóso estresse por esgotamento de nutrientes, é alta.

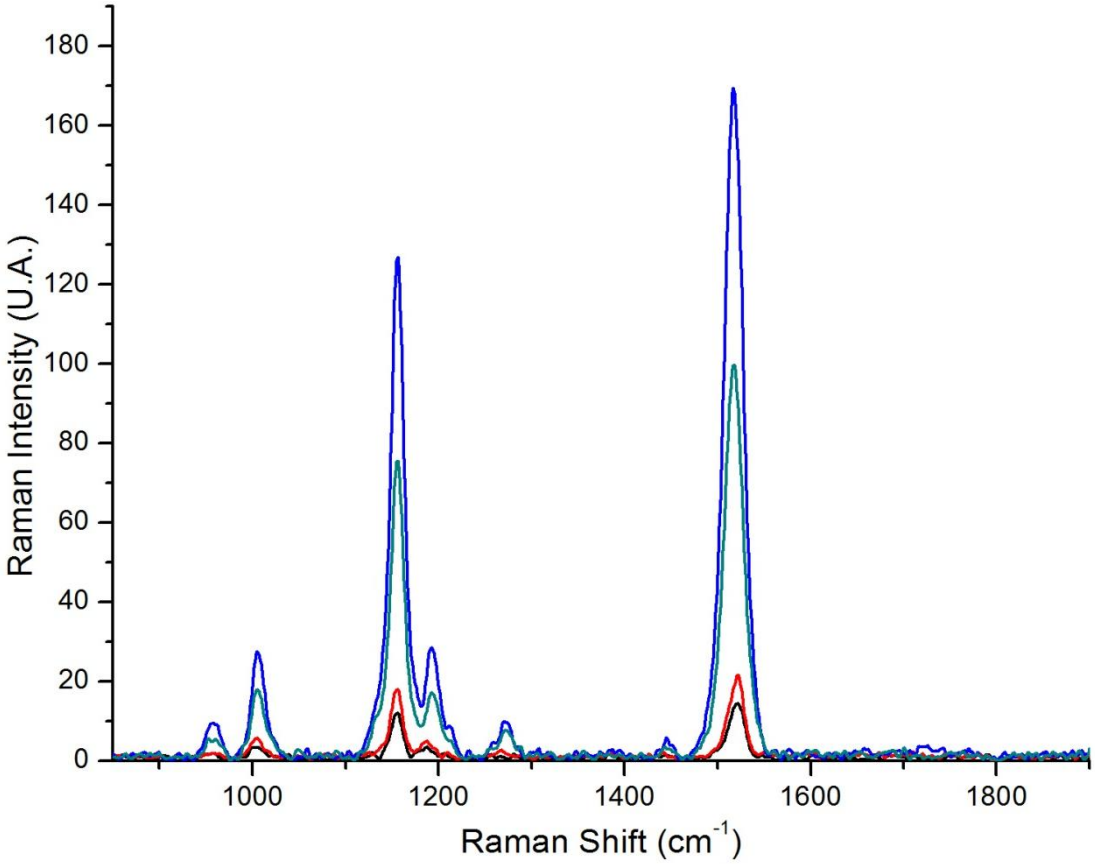



Fig. 30: Espectros Raman de quatro células diferentes da espécie *Haematococcus pluvialis,* vermelho e preto – fase inicial do cultivo, verde e azul – fase final do cultivo.

A variação na intensidade dos sinais entre células que se encontram na mesma fase é de se esperar, porque mesmo elas estejam no mesmo meio de cultura nas mesmas condições, podem estar em etapas de crescimento celular diferentes, e por conseguinte com uma concentração diferente de carotenóides. A máxima concentração de carotenóides encontrada nas células de *Haematococcus pluvialis* foi de 8,4% em peso para a amostra em final de cultivo, em estagio de cisto, calculada por gravimétrica do extrato evaporado, e a mínima foi de 0,79% em peso, para a amostra no segundo dia de cultivo.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um método de análise dos produtos obtidos a partir da biomassa de microalgas, que fosse rápido e simples. A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. A espectroscopia Raman é uma técnica que permite estudar diferentes espécies de microalgas *in-vivo,* necessitando apenas centrifugar as amostras para retirar o excesso de umidade, eliminando processos de pré-tratamento que vão desde secar a amostra por 24 horas e macerar até a utilização de reagentes para realizar processos de extração, a depender do tipo de análise.

2. As análises de caracterização das espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp,*permitiram uma identificação dos sinais dos lipídeos e carotenóides presentes, na região entre 850 – 3150 $cm^{-1}$, identificados com a ajuda de padrões de amostras comerciais e analíticas, e também utilizando estudos reportados na literatura.

3. Levando em consideração parâmetros do equipamento tais como a intensidade do laser e o tipo de microscópio acoplado, esta técnica permite realizar estudos mais específicos no interior da célula. O equipamento utilizado neste trabalho tem uma fonte laser de 532 nm e uma objetiva máxima de 100 µm. Nestas condições foi possível estudar as espécies *Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp,*qualitativamente, quantitativamente, e permitiu realizar estudos mais específicos, como por exemplo o grau de insaturação das cadeias carbônicas.

4. A técnica de espectroscopia Raman permitiu acompanhar as amostras *in vivo* ao longo do tempo, durante o processo de esgotamento dos nutrientes. A intensidade dos sinais tanto dos lipídeos como dos

carotenóides aumenta conforme diminui a concentração dos nutrientes do meio de cultura, o que está coerente com outros trabalhos relatados na literatura específica.

5. A técnica utilizada permitiu a quantificação dos carotenóides presentes na espécie *Haematococcus pluvialis*, por análises Raman intercaladas com um processo de extração, seguido de gravimétrica. A máxima concentração de carotenóides encontrada nas células de *Haematococcus pluvialis* foi de 8,4% em peso para a amostra em final de cultivo, em estagio de cisto, e a mínima foi de 0,79% em peso, para a amostra no segundo dia de cultivo.

6. Os resultados obtidos confirmam que a alta variabilidade do sinal nas amostras vivas (em torno de 15%) é consequência da acumulação de carotenóides nas células individuais, que não acontece de forma uniforme em todas as células. A incerteza das medições deste método analítico proposto, determinada após múltiplas medidas de uma mesma amostra contendo células mortas é bem inferior, em torno de +/- 1%.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Utilizar fontes laser de menor energia, emitindo em 1064 nm, para permitir uma melhor resolução dos sinais atribuídos aos lipídeos;
2. Realizar a quantificação de lipídeos nas amostras, de maneira análoga ao que foi feito para os carotenóides neste estudo; isto seria favorecido caso seja adotada a recomendação anterior;
3. Utilizar um liofilizador para secar as amostras; isso permitiria uma retirada praticamente integral da umidade das amostras sem degradá-las, elevando a resolução dos sinais tanto de lipídeos quanto de carotenóides;
4. Realizar estudos de maximização da produção de lipídeos e pigmentos por meio de estresse induzido, utilizando esta técnica de espectroscopia Raman para acompanhamento das amostras *in vivo*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


[1] Reda A.I. Abou-Shanab,Matter I.A, Su-Nam Kim, You-Kwan Oh, Jaeyoung Choi, Byong-Hun Jeon. *Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from freshwater lake.* **Biomass and Bioenergy,** 2011; 3079:3085-7.

[2] Chisti Yusuf. *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. **Trends in Biotechnology,** 2008; 126:131- 26.

[3] Chisti Yusuf. *Research review paper Biodiesel from microalgae.* **Biotechnology Advances,** 2007; 294:306-25.

[4] Janssen M, Tramper J, Mur Luuc R, Wijffels R.H. *Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosythetic Efficiency, Scale-Up and Future Prospects.* **Biotechnology and Bioengineering,** 2003;193:210-81.

[5] Vidhyavathi Raman, Sarada Ravi, Aswathanarayana R.G. *Expression of carotenogenic genes and carotenoid production in Haematococcus pluvialis under the influence of carotenoid and fatty acid synthesis inhibitors*. **Enzyme and Microbial Technology,** 2009;88:93-45.

[6] Samek O, Zemánek P, Jonás A, Telle H.H. *Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy.* **Laser Phys. Lett,** 2011;701:709-10.

[7] Yecong Li, Yi-Feng Chen, Paul Chen, Min Min, Wenguang Zhou, Blanca Martinez, Jun Zhu, Roger Ruan. *Characterization of a microalga Chlorella sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production.* **Bioresurce Technology,** 2011;5138:5144-102.

[8] Selahattin Umdu Emin, Tuncer Mert and Seker Erol. *Transesterification of Nannochloropsis oculata microalga's lipid to biodiesel on $Al_2O_3$ supported CaO and MgO catalysis.* **Bioresource Technology,** 2009;2828:2831-100.

[9]biodieselwww.biodieselbr.comhttp://www.biodieselbr.com/biodiesel/historia/oleos-vegetais-biodiesel-brasil.htm. - fevereiro 5, 2013.

[10] Harun R, Singh M, Forde G.M, Danquah M.K. *Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products.* **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** 2010;1037:1047-14.

[11] Satyanarayana K.G, Mariano A.B. Vargas J.V.C. *A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials.* **International Journal of energy research,** 2011;291:311-35.

[12] Brennan L, Owende P. *Biofuels from microalgae - A review of technologies for production. processing, and extractions of biofuels and co-products.* **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** 2010;557:577-14.

[13] Wang B, Lan C.Q, Horsman M. *Closed photobioreactors for production on microalga biomasses.* **BiotechnologyAdvances,**2012;904:912.

[14] Tariq M, Ali S, Khalid N. *Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: A reviews.* **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** 2012;6303:6316-16.

[15] Olaizola M.*Commercial production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using 25000 liter outdoor photobioreactors.* **Journal of Applied Phycology,** 2000;499:506-12.

[16] Almeida C. *Produção de pigmentos carotenóides e o perfil de expressão protéica em microalgas submentidas à condições de estresse.* Dissertação. Salvador, Bahia, 20 de agosto 2012. - p. 102.

[17] Folch J, Lees M, Stanley G.H.S.*A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.* **J. Biol. Chem,** 1957;226:497.

[18] Bligh E.G, Dyer W.J.*A rapid method of total lipid extraction and purification.* **Can. J Biochem.Physiol,** 1959;911:917-37.

[19] Jae Yon L, Chan Y, So-Young J, Chi-Yong A, Hee-Mock O. *Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae.* **Bioresource Technology,** 2010;S75:S77-101.

[20] Vinatoru M, Toma M, Radu O, Filip P.I. *The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials.* **Ultrasonics Sonochemistry,** 1997;135:139-4.

[21] Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason T.J. *Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.* **Ultrasonics Sonochemistry,** 2001;137:142-8.

[22] Jin-Yu H, Wei H, Shun-de H, Bo-Yong X, Xiu D. *Microwave-assisted extraction of artemisinin from Artemisia anuua L.* **Separation and Purification Technology,** 2002;191:196-28.

[23] Chen W, Zhang C, Song L, Sommerfeld M, Hu Q.*A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae.* **Journal of Microbiological Methods,** 2009;41:47-77.

[24] Chen W, Sommerfeld M, Hu Q. *Microwave-assisted Nile Red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae.* **Bioresource Technology,** 2011;135:141-102

[25] Gao C, Xionq W, Zhang Y, Yuan W, Wu Q. *Rapid quantification of lipid in microalgae by time-domain nuclear magnetic resonance.* **Journal of Microbiological Methods,** 2008;437:440-75.

[26] Sala O.*Fundamentos da Espectroscopia Raman.* - São Paulo: Editora UNESP, 2008;13:71-2.

[27] J. Larkin Peter IR and Raman Spectroscopy. - USA: Elsevier, 2011. - pp. 1-62.

[28] Heraud P, Beardall J, McNaughton D, Wood B.R. *In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy*. **FEMS Microbio lLett,** 2007;24:30-275.

[29] Samek O, Jonás A, Pilát Z, Zemánek P, Nedbal L, Tríska J, Kotas P, Trtílek M. *Raman microspectroscopy of individual algas cells: Sensing unsaturation of storage lipids in vivo.* **Sensors.** 2010;8635:8651-10.

[30] Pilát Z, Bernatová S, Jezek J, Serý M, Samek O, Zemánek P, Nedbal L, Trtílek M. *Raman microspectroscopy of algal lipid bodies: betacarotene quantification.* **J. Appl Phycol,** 2012;541:546-24.

[31] Tsung-Hua L, Jo-Shu C, Hsiang-Yu W. *Rapid and in vivo Quantification of Cellular Lipids in Chlorella Vulgaris Using Near-Infrared Raman Spectroscopy*. **American Chemical Society,** 2013;2155:2160-85.

[32] Walne P.R. *Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bi valves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria, and Mytilis.* **Fish. Invest,** 1966;1:62-26.

[33] Lourenço S.O, Barbarino E, Nascimento A, Freitas J.N.P, Diniz G.S. *Tissue nitrogen and phosphorus in seaweeds in a tropical eutrophic environmental: What a long-term study tell us.* **J. Appl. Phycol,** 2006;389:398-18.

[34] Rudic V, Dudnícenco T. *Process for cultivation of Green alga Haematococcus pluvialis (Flotow).* MD Patent Nr. A 2000 0154,2000.

[35] Parra O, Bicudo C*. Introducción a la biología y sistemática de las algas de aguas continentales.* Univ Concepción.

[36] Henriques N. M, Navalho J. C and Cancela M. L. *Dunaliella: Uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico.* **Boletim de Biotecnologia,** 1998;12:17-61.

[37]Wu H, Volponi J.V, Oliver A.E, Parikh A.N, Simmons B.A, Singh S. *In-Vivo Lipidomics using Single-Cell Raman Spectroscopy.* **PANS,** 2011;3809:3814-108.

[38] McMurry John. *Química Orgánica.* **International Thomson Editores.** Quinta edición, 2001; 1118:1125.

[39] Heraud P, Beardall J, McNaughton D, Wood B.R. *In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy* .**FEMS Microbiol Lett,** 2007;24:30- 275.

[40] Hai-Linh T, Seong-Joo H, Choul-Gyun L. *Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from Botryococcus braunii LB 572 and Synechocystis sp.* **Biotechnoloogy and Bioprocess Engineering,** 2009;187:192-14.