



Universidade de Brasília

Instituto de Física

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE
MICROALGAS CULTIVADAS EM REATORES
AUTOMATIZADOS**

Lucas Alves Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Roncaratti Jr.

Lucas Alves Rodrigues

**CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE
MICROALGAS CULTIVADAS EM REATORES
AUTOMATIZADOS**

Texto de dissertação apresentado ao Instituto de Física da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Fernando Roncaratti Jr.

Brasília, 2020.

Agradecimentos

Aos meus pais, Elaine e Flávio, por tudo e mais um pouco;

Ao meu irmão e minha irmã;

Aos professores Roncaratti e Sebastião, pelos conselhos e orientações;

Ao John, sem ele esse trabalho seria, ainda mais, hercúleo;

A toda equipe do FotoBioLab, por serem minha segunda família;

Ao CNANO, pelo espaço e equipamentos. Sem ele, esse trabalho não existiria;

A CAPES, por financiar este trabalho e processo de formação;

A todos os cientistas, por assentarem um tijolo por vez nesse edifício chamado ciência;

A Amanda, por ser minha gota de luz em um mar de escuridão.

“É um erro capital teorizar antes de termos
todas as evidências. Distorce o
julgamento.” (Sir Arthur Conan Doyle).

Resumo

Este trabalho consiste no desenvolvimento de um conjunto de técnicas de preparação de amostras e tratamento de dados para a identificação e caracterização de microalgas. Em especial, as algas *Chlamydomonas sp.* (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceanica* (NN). Com base nos resultados aprendidos, e na confecção de uma bateria de micro-fotobiorreatores automatizados para estudos de dinâmica de crescimento, investigou-se a influência da aclimação na produção de biomoléculas. Como exemplo, foi feito um estudo detalhado da influência de diferentes potências luminosas e concentrações de meio de cultura (BG11) na dinâmica de crescimento, produção de pigmentos e lipídios.

Palavras-chave: Microalgas. Espectroscopia Raman. FTIR. UV-VIS. Microrreatores.

Abstract

This work consists in the development of a set of sampling preparation techniques and data treatment for the identification and characterization of microalgae. In particular, the algae *Chlamydomonas* sp. (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) and *Nannochloropsis oceanica* (NN). Based on the learned results, and the making of a battery of automated micro-photobioreactors for growth dynamics studies, the influence of the acclimatization in the production of biomolecules was studied. As an example, a detailed study was made of the influence of different light powers and concentrations of culture medium (BG11) on the dynamics of growth, pigment and lipid production.

Keywords: Microalgae. Raman Spectroscopy. FTIR. UV-VIS. photobioreactors.

1	Introdução	12
1.1	Fotossíntese	12
1.2	Microalgas	14
1.3	Fotobiorreatores	16
1.4	Cenário Brasileiro	18
1.5	Espectroscopia	18
1.6	Objetivos	19
1.7	Organização	20
2	Revisão	22
2.1	Algas	22
2.2	Biorreatores	25
2.3	Espectroscopia	31

2.4	Análise de componentes principais - PCA	46
2.5	Análise de Variância - ANOVA e o teste de Tukey	49
3	Metodologia	52
3.1	Microlagas	53
3.2	Fotobiorreatores	55
3.3	Cultivo e manutenção	58
3.4	Materiais, equipamentos e pré-tratamento dos dados	58
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
4.1	Primeira etapa	68
4.2	Segunda etapa	81
4.3	Terceira etapa	83
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	96
5.1	Primeira etapa	96
5.2	Segunda etapa	98
5.3	Terceira etapa	100
	Bibliografia	102

LISTA DE TABELAS

4.1 Tabela de atribuições de pigmentos no Raman 73

4.2 Tabela de teores do UV-VIS e Raman 77

LISTA DE FIGURAS

2.1	Microalgas	23
2.2	Vários tipos de biorreatores. Dos mais simples aos mais sofisticados	27
2.3	Exemplos de modelos de FBR	27
2.4	Diagrama esquemático de espalhamentos	44
2.5	Espectro Stokes e anti-Stokes do ciclohexano	44
2.6	Espectro Stokes e Rayleigh	45
2.7	Espectro Stokes e anti-Stokes do ciclo-hexano	46
2.8	Exemplo de funcionamento do PCA	48
2.9	Poder de separação ótico	51
3.1	<i>Chlamydomonas sp</i>	54
3.2	Esquema tridimensional dos micro-reatores	64
3.3	Fotografias do micro-reator	65
3.4	Irradiância espectral	66

3.5	Irradiância espectral	66
4.1	Espectro médio das três algas	70
4.2	Chlorella Clorofila referência	71
4.3	Percentual de carotenoides das três algas	73
4.4	PCA das três algas	74
4.5	UV-VIS das três algas e ajuste por pacotes gaussianos	76
4.6	FTIR das três algas	79
4.7	PCA-FTIR das três algas	80
4.8	Curvas de crescimento das algas nos reatores	82
4.9	UV-VIS <i>Chlamydomonas</i> amarelamento	86
4.10	Raman condensado	87
4.11	PCA Raman	89
4.12	ANOVA potência luminosa	90
4.13	ANOVA concentração de nutrientes	91
4.14	UV-VIS compilado	92
4.15	FTIR - Potência luminosa e concentração de nutrientes	94
4.16	PCA FTIR	95

1.1 Fotossíntese

A maior parte da energia livre disponível na atmosfera provém da luz do sol. A fotossíntese [1] usa essa riqueza natural para sustentar, quase que integralmente, todas as formas de vida conhecidas. Tal processo levou bilhões de anos para evoluir dentro de organismos fotoautótrofos [2] e se tornar o principal processo de conversão solar na natureza [3, 4]. Essa conversão começa com a absorção da luz por complexos proteicos altamente estruturados que contêm clorofilas e outros pigmentos auxiliares [5]. A absorção da luz gera excitações que se difundem através do aparato fotossintetizante, atingindo eventualmente os centros de reação onde a separação de carga acontece. Os elétrons livres resultantes são movimentados através de uma cadeia de transporte, gerando energia livre de Gibbs na forma de um gradiente de prótons através da membrana tilacoide [6]. Finalmente, essa energia é utilizada na síntese do trifosfato de adenosina (ATP), composto orgânico que fornece energia para vários processos nas células vivas.

Diferentemente dos materiais de conversão solar artificiais, a fotossíntese natural é notavelmente robusta e adaptada a mudanças contínuas nas condições ambientais devido a vários processos regulatórios. Em particular, organismos fotossintetizantes frequentemente experimentam mudanças bruscas na intensidade da luz incidente ao longo de períodos que vão de segundos a meses, podendo o organismo receber uma quantidade de luz que excede sua capacidade de uso na assimilação de dióxido de carbono. Esse excesso de energia pode causar danos foto-oxidativos no aparato fotossintetizante devido à formação de espécies reativas do oxigênio (ROS) [7, 8]. Nos cloroplastos, existem dois caminhos principais para a formação de ROS [9]: (i) transferência de elétrons para o oxigênio molecular no lado aceitador do fotossistema I (PSI) ou II (PSII), levando à formação do radical superóxido (O_2^-) e, em reações subsequentes, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($OH\cdot$); e (ii) transferência de energia da clorofila tripleto ($^3Chl^*$) para o oxigênio molecular, que leva à formação do oxigênio singleto ($^1O_2^*$). No PSII, os carotenoides tem um papel fundamental na desativação da $^3Chl^*$ e $^1O_2^*$ e na redução na formação de ROS através da dissipação térmica do excesso de energia luminosa (*non-photochemical quenching*, NPQ) no nível da $^1Chl^*$. O beta-caroteno é responsável pela desativação do $^1O_2^*$ no centro de reação do PSII, enquanto que as xantofilas são envolvidas na NPQ das excitações nos complexos antena.

De acordo com o estado da arte do conhecimento científico, os organismos fotossintetizantes podem ser entendidos como notáveis exemplos biológicos de nanomáquinas que dominaram o processo de colheita da luz do sol ao longo de bilhões de anos de evolução. Portanto, pesquisadores de diversas áreas do conhecimento buscam entender os mecanismos da fotossíntese natural e aplicar o seus conhecimentos em prol de realizações científicas e tecnológicas

cada vez mais promissoras.

1.2 Microalgas

Entre os muitos organismos fotossintetizantes, as microalgas se destacam devido à sua relativa simplicidade e variedade. A biodiversidade das microalgas é enorme. Uma estimativa conservadora estima algo entre 30,000 e 70,000 espécies naturais [10]. Elas são onipresentes na natureza [11], sendo sua biodiversidade uma valiosa fonte de recursos para a humanidade [12, 13]. Ao longo das últimas décadas, milhares de novos componentes foram obtidos a partir da biomassa de microalgas, a maioria deles produtos únicos e valiosos como carotenoides, ácidos graxos, antioxidantes, toxinas, enzimas, polímeros, peptídeos e esteroides [14]. Além disso, dependendo das técnicas utilizadas, microalgas podem ser convertidas em vários tipos de combustíveis. Combustíveis derivados de microalgas constituem promissoras alternativas aos combustíveis fósseis e outras fontes conhecidas de biocombustíveis como cana de açúcar e milho [15, 16, 17, 18]. Atualmente várias empresas e agências governamentais financiam esforços para reduzir o capital necessário e os custos de operação para tornar a produção de combustível de microalgas viável [19, 20, 21].

A biomassa derivada de microalgas possui vantagens consideráveis sobre outras matérias-primas tradicionais: alta produtividade, usualmente 10-100 vezes maior do que colheitas plantadas; captura de carbono altamente eficiente; podem ser cultivada em água salgada, salobra e até mesmo em águas de resíduo e esgoto. Microalgas podem ser colhidas continuamente ao longo do ano, e por essa razão elas podem integrar uma cadeia de produção contínua como acontece

em uma refinaria de óleo tradicional. Além disso, tanto o cultivo como o processamento podem ocorrer no mesmo local, uma característica que favorece uma produção sequencial e integrada, reduzindo portanto os custos logísticos. Contudo, ainda existem desafios tecnológicos significativos para alcançarmos uma produção economicamente viável de biocombustíveis derivados de microalgas, tais como: desenvolvimento e caracterização de linhagens; métodos eficientes de cultivo e produção da cultura; melhorias na colheita e nos métodos de extração de lipídios.

A diversidade de características e habitats fazem as microalgas serem extremamente atrativas para aplicações tecnológicas, especialmente se a linhagem candidata é acessível a manipulação genética. As microalgas possuem numerosas vantagens sobre as plantas para a produção de proteínas recombinantes através da transgênese. Elas progridem para uma produção em larga escala em questão de semanas, o que é um tempo curto se comparado com meses ou anos no caso de plantas superiores como o milho ou o tabaco. As microalgas são organismos unicelulares, portanto deve existir menos variações na acumulação de proteínas recombinantes, tornando o processo mais uniforme. Elas podem ser cultivadas em sistemas fechados, reduzindo dessa forma o risco de contaminação no sistema de produção e aumentando a proteção do ecossistema próximo de uma potencial contaminação por organismos geneticamente modificados, um problema recorrente em culturas de vegetais em ambientes abertos ou semi-abertos.

Outra técnica útil para a melhoria da performance de uma dada linhagem de microalga é a evolução adaptativa em laboratório (ALE). Essa metodologia permite a análise de fenômenos evolutivos e adaptativos em um ambiente controlado. Durante a ALE microbial, um organismo é cultivado sob condições claramente definidas durante longos períodos de tempo permitindo a seleção de fenótipos melhorados. Seus princípios básicos remontam aos trabalhos de Anton van

Leeuwenhoek, Louis Pasteur, Robert Koch e Charles Darwin, com as suas descobertas sobre os microrganismos, a teoria dos germes e a importância da seleção natural e artificial na evolução e reprodução dos organismos. Apesar de ser realizada já há bastante tempo, o advento nas últimas décadas de novas tecnologias de sequenciamento genético e técnicas de controle e automação modernas fazem da ALE uma metodologia ainda mais promissora na biotecnologia.

Uma característica fundamental de uma dada linhagem de microalga é a sua dinâmica de crescimento. Em ambientes naturais (oceanos, rios, lagos e lagoas) parâmetros físicos (luz, temperatura), químicos (moléculas e íons dissolvidos na água) e biológicos (vírus, bactérias, fungos e interações do tipo predador-presa) podem flutuar ao longo do espaço e do tempo, sendo difícil mensurar o papel de cada um desses parâmetros na dinâmica de crescimento. Em ambientes artificiais (fotobiorreatores) esses parâmetros podem ser controlados e suas influências individualizadas.

1.3 Fotobiorreatores

Fotobiorreatores (FBR) são aparatos utilizados para conter, cultivar e controlar o crescimento de uma cepa de microalgas. Embora vários modelos já tenham sido descritos, o design racional de FBR continua em franco desenvolvimento. Um típico FBR é um sistema que opera quatro fases, especificamente, a fase líquida que é o meio de cultura, a fase sólida que é composta pelas células de microalgas, as moléculas no gás que circula através da cultura, principalmente nitrogênio, oxigênio e dióxido de carbono, e a luz, composta por uma superposição de fótons com comprimentos de onda entre 400 e 700 nanômetros, que define a região

fotossinteticamente ativa do espectro.

Essencialmente, e de acordo com os objetivos dos seus usos, existem dois tipos de FBR. O primeiro consiste em reatores grandes, cujo objetivo é produzir a maior quantidade possível de biomassa. Para isso, eles são projetados para manter a cultura em condições otimizadas de forma contínua e durante longos períodos de tempo. O design desse tipo de FBR requer o conhecimento das interações entre a cultura e os parâmetros ambientais, sendo que sua operação requer instalações caras e específicas. Esse tipo de reator pode ser chamado de FBR de refinaria. O segundo tipo é composto por FBR de bancada, cujo objetivo é o estudo da dinâmica de crescimento da cultura e sua dependência com relação aos parâmetros ambientais. Esses reatores podem ser utilizados para caracterizar uma dada espécie ou linhagem de microalgas em função dos parâmetros que condicionam o desenvolvimento da cultura, e.g., temperatura, meio de cultura, gases dissolvidos, luz (intensidade, espectro e modulação). Eles também podem ser utilizados no estudo da resposta da cultura com relação a condições de estresse, adaptação a mudanças ambientais e busca de condições otimizadas. Atualmente, esse tipo de equipamento é utilizado em diversas universidades e centros de pesquisa do mundo, cada um deles, único e específico. Existem também FBRs de bancada vendidos por empresas que, em geral, são muito caros e, por serem projetados como *user friendly*, possuem poucas opções de configuração e operação, apresentando um custo benefício questionável. Do ponto de vista tecnológico, um FBR pode ser projetado para qualquer coisa entre um dispositivo simples e completamente analógico até um dispositivo mecatrônico totalmente automatizado.

1.4 Cenário Brasileiro

O Brasil possui uma enorme área costeira, com mais de 10,000 Km, aproximadamente 12% da água doce do planeta e recebe uma irradiância solar média superior a parcela recebida pela grande maioria dos outros países. Além disso o país abriga a flora mais rica do mundo (40,989 espécies, sendo 18,932 endêmicas) possuindo mais de 3400 espécies de algas catalogadas [22]. Atualmente, várias instituições brasileiras estudam e mantêm coleções de algas, sendo que cinco delas possuem mais de uma centena de linhagens [23]. A Embrapa e a Petrobras lideram iniciativas que visam caracterizar e domesticar linhagens de microalgas nativas. Enquanto o foco da Petrobras é no uso de microalgas marinhas para produção de biocombustível, o foco da Embrapa é voltado para a caracterização da microalgas continentais e seus usos em bio-produtos [24].

1.5 Espectroscopia

Algumas espécies de algas não apresentam características morfológicas específicas. Isto não permite que sua distinção entre muitas outras espécies e linhagens existentes, seja feita facilmente. Essa distinção pode ser feita através da amplificação e análise sequencial de regiões específicas do DNA do organismo. Um alternativa interessante é a identificação de organismos através de suas características espectroscópicas. De forma geral, espectroscopia é o estudo da interação entre a matéria e a radiação eletromagnética, em função do comprimento de onda da radiação. A natureza dessa interação depende essencialmente do material e da região do espectro considerada. Quando analisamos um material, composto por moléculas, podemos ter

espectros relacionados com (i) estados dos spins eletrônicos, (ii) modos de rotação, (iii) modos de vibração e (iv) transições entre estados eletrônicos. Os organismos fotossintetizantes são constituídos de matéria orgânica com características moleculares bem definidas que podem ser estudadas particularmente bem através dos seus modos de vibração e estados eletrônicos.

As principais técnicas utilizadas para detectar os modos vibracionais de moléculas são: a espectroscopia de absorção no infravermelho e a espectroscopia Raman [25]. Ambas as técnicas, em conjunto ou individualmente, são capazes de fornecer informações sobre a estrutura de moléculas, além de identificar substâncias e determinar sua quantidade relativa em uma amostra. A principal técnica para se estudar as possíveis transições entre estados eletrônicos moleculares é a espectroscopia UV-Vis [26]. Tal técnica aborda transições entre os níveis da molécula do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (transições entre orbitais ligantes e anti-ligantes) e $n \rightarrow \pi^*$ (transições entre orbitais não-ligantes e anti-ligantes). Ela se baseia em medidas de absorção na região visível do espectro eletromagnético e suas adjacências. Essas três técnicas são particularmente interessantes no estudo qualitativo e semi-quantitativo de pigmentos em amostras derivadas de organismos fotossintetizantes. Elas podem ser utilizadas tanto na identificação de espécies [27] como na caracterização de mudanças biomoleculares associadas aos parâmetros que condicionam o desenvolvimento da cultura [28].

1.6 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho de mestrado é caracterizar espectroscopicamente um conjunto de microalgas cultivadas em reatores automatizados. Para alcançá-lo, elaborou-se

uma série de objetivos específicos, que são:

- elaborar técnicas de síntese de amostras e manipulação de dados para propósitos de identificação e caracterização de três microalgas, *Chlamydomonas sp.* (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceanica* (NN);
- Confeccionar uma bateria de micro-fotobiorreatores para estudos de crescimento em diferentes condições de aclimação;
- verificar os efeitos oriundos de varreduras na potência luminosa aplicada as algas no crescimento da cultura e alterações bioquímicas nas algas;
- verificar os efeitos oriundos de varreduras na concentração de meio de cultura (BG11) aplicada as algas no crescimento da cultura e alterações bioquímicas nas algas.

1.7 Organização

Esta dissertação está organizada da seguinte maneira. No capítulo 2 é apresentada uma breve revisão sobre algas, fotobiorreatores, espectroscopia e análise estatística. No capítulo 3, a metodologia empregada é explanada, dos equipamentos utilizados a considerações sobre como os dados foram tratados. No capítulo 4 são apresentados resultados referentes à etapa de caracterização e identificação de microalgas por meio das três técnicas espectroscópicas utilizadas, sobre o amarelamento da alga *Chlamydomonas*, a dinâmica de diferentes cultivos, e os resultados de diferentes culturas sobre aclimações distintas de nutrientes e potência luminosa entregue. Ao final, no quinto capítulo, são apresentadas discussões acerca dos resultados

alcançados e também discute-se algumas possíveis investigações futuras.

CAPÍTULO 2

REVISÃO

2.1 Algas

Algas são um conjunto heterogêneo de organismos fotossintetizantes, dotados ou não de fotossistemas organizados por cloroplastos. Variam desde pequenas células solitárias até as gigantes algas do tipo kelp. Sua morfologia e organização celular variam muito dentro do mesmo grupo de modo que organismos eucariontes (protistas) e procariontes (cianobactérias) fazem parte deste grupo. Na figura 2.1 estão alguns exemplos de indivíduos. Algumas exceções ocorrem às regras de realizarem fotossíntese e de viverem em ambientes aquáticos, como o euglenoides e algumas espécies de algas que vivem no solo, respectivamente. Porém, todos esses indivíduos estão ligados à dependência de habitats suficientemente úmidos.

Como as algas foram definidas em termos de suas características ecológicas, não há como ligar os elementos desse grupo por meios de uma descendência em comum, embora taxo-



Figura 2.1: Diferentes tipo de algas. Uma multiplicidade de formas e tamanhos. Fonte: Imagem retirada de [29]

nomistas as classifiquem em termos de linhagens chamadas de *phylas* (divisões). Tais divisões se baseiam nos tipos de pigmentos fotossintetizantes e de fotoproteção, tipo de biomolécula utilizada para armazenamento de energia e o material de revestimento celular. Entre todos os tipos de algas existentes, este trabalho foca a sua atenção no subgrupo das algas verdes. Para maiores informações sobre os outros tipos de grupos, e suas divisões, consulte [30, 31]. Algas verdes (também chamadas de clorofitas) exibem diversos organismos com distintas morfologias, ciclos reprodutivos e habitats. A maioria apresenta uma coloração esverdeada, embora alguns organismos se apresentem avermelhados, devido à alta concentração de carotenoides, e outros são semi transparentes. Tais algas são importantes fontes de alimento para animais aquáticos e presentes de forma significativa em associações simbióticas com fungos, protistas, invertebrados e vertebrados [32, 33]. Algas verdes compartilham característica moleculares, bioquímicas, celulares e reprodutivas com plantas terrestres de modo que, ao que tudo indica, existe um elo evolutivo entre esses organismos. As algas tiveram, e ainda possuem, um impor-

tante papel biogeoquímico no planeta por bilhões de anos. A origem da atmosfera dotada de O_2 , e por consequência, a produção da camada de ozônio é devida ao surgimento das algas na Terra. Também, os gigantescos depósitos de petróleo e de rochas carbonáticas foram formados com o passar das eras e contribuíram para a redução dos níveis de dióxido de carbono atmosférico. Algas modernas contribuem entre 30% a 80% dos níveis de oxigênio atmosférico [34, 35] e participam dos ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e outros elementos, afetando de maneira expressiva toda a biosfera terrestre. O entendimento do papel das algas nestes ciclos químicos permitiu o desenvolvimento de tecnologias de tratamento de resíduos, que mitiga o impacto da produção humana de dióxido de carbono, a utilização de lipídios como fonte renovável de energia e muitas outras aplicações. Algas possuem múltiplos papéis nas cadeias alimentares aquáticas podendo atuar como agentes predadores, bacterívoros, saprófitos e, em sua maioria, fotoautotróficos. As algas fornecem através dos componentes orgânicos por elas excretados alimento para microrganismos heterotróficos presentes no ambiente aquático. Também, quando mortas, bactérias se alimentam dos componentes dissolvido ou aglomerados de seus restos. Algas cumprem o importante papel de sustentar a maioria dos herbívoros marinhos. Em sua defesa à predação por parte de organismos herbívoros, algas podem produzir toxinas. Quando essas toxinas alcançam altas concentrações, elas influenciam todas as cadeias alimentares causando o acúmulo de toxinas, doenças e mortes em todos os níveis da teia alimentar. Algumas espécies de algas são fontes alimentares preferidas por animais aquáticos criados para alimentação humana ou aquacultura como camarão e salmão para alimentação e peixes-palhaço para aquarismo. Algas são utilizadas para alimentação humana, enquanto outras são utilizadas pela indústria e em pesquisas por produzirem compostos gelificantes como o ágar. Algas de

diversos tipos são conhecidas por produzirem substâncias antibióticas e úteis ao tratamento de câncer [36]. Recentemente, algas vem sido empregadas largamente na produção de biocombustíveis por apresentarem rendimentos muito superiores a plantas comumente utilizadas nesta tarefa.

2.2 Biorreatores

Quando em ambientes naturais, geralmente abertos, é difícil estudar precisamente a dinâmica de interação de algas com os parâmetros físicos (luz e temperatura), químicos (meio aquoso de nutrientes e outras moléculas) e biológicos (predadores, outros organismos concorrentes, patógenos e etc) que influenciam a dinâmica de crescimento da cultura. Isso torna ineficaz um estudo quantitativo da influência individual desses fatores na cultura de algas. Para contornar esse impasse, ambientes artificiais que simulam e condicionam cepas foram desenvolvidos ao longo deste e do último século (confira o capítulo 1 de [37]). Nestes ambientes, parâmetros de interesse e sua influência na dinâmica de crescimento dos microrganismos podem ser estudados individualmente.

Biorreatores (FBR) são recipientes fechados, ou majoritariamente fechados, projetados para produção foto-trófica, onde a energia necessária para a fotossíntese é fornecida por lâmpadas elétricas [37]. Mais vantajosos que cultivos em poças e piscinas abertas, FBR não estão suscetíveis ao regime e ações de intempéries e ao sombreamento por nuvens. Além de que sistemas abertos estão restritos ao número de espécies cultiváveis e geograficamente limitados a regiões tropicais e sub-tropicais, zonas de iluminação própria para cultivo de microalgas,

pequenos reatores se sobressaem em relação aos demais por serem autônomos, mais versáteis, compactos e não são restringidos por parâmetros ambientais. Comercialmente os reatores produzidos pela Martek Bioscience Corporation [38] já foram utilizados para a produção de compostos isotopicamente marcados (carbono, hidrogênio e nitrogênio), ácidos graxos e pigmentos. Também já foram reportados o uso de FBR para tratamento de águas residuais [39], remoção de CO_2 atmosférico e produção de hidrogênio limpo [37, 40].

O design de fotobiorreatores depende do objetivo final a ser alcançado. A ciência de confecção de FBR está em desenvolvimento, de modo que muitos tipos e modelos de reatores são reportados na literatura e estão, de maneira limitada, comercialmente disponíveis (confira as figuras 2.2 e 2.3 a seguir). De maneira geral, reatores podem ser agrupados em dois tipos distintos de acordo com sua finalidade. Reatores de produção de uma grande quantidade de biomassa, da maneira mais eficiente possível, constituem o primeiro tipo. Eles demandam estrutura e logística específicas o que torna sua construção e manutenção mais caras que os reatores de segundo tipo, menores e de bancada. Estes são pequenos e destinados a estudos preciso da dinâmica entre as algas e os fatores que influenciam o crescimento das células. Naturalmente, reatores mais sofisticados são mais versáteis e configuráveis que suas contrapartes mais simples, porém são mais caros e difíceis de operar.

Considerações de design

Apesar das várias configurações de formas dos reatores, algumas considerações do design básico devem ser levado em conta quando se constrói um fotobiorreator: como prover a luz, como circular as algas no interior do reator, quais materiais utilizar na construção, como



Figura 2.2: Vários tipos de biorreatores. Dos mais simples aos mais sofisticados. Fonte: A) um reator caseiro feito com materiais recicláveis [41]. B) um reator comercial synoxis [42]. C) reatores improvisados com embalagens [43].

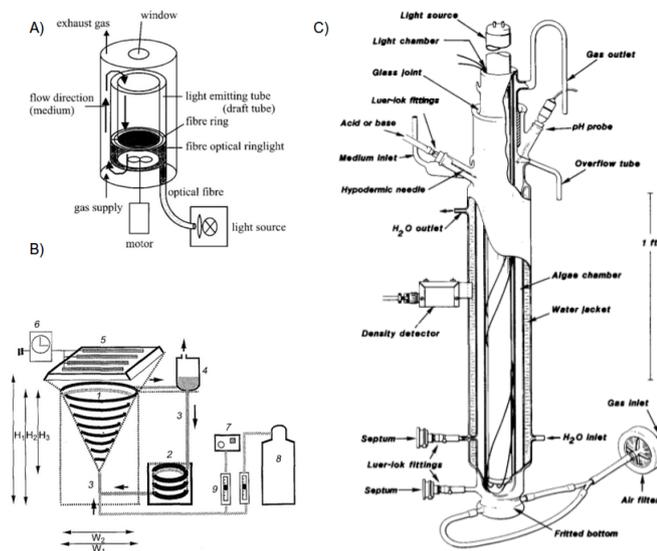


Figura 2.3: Compilação de diferentes modelos de biorreatores. Fonte: A) reator cilíndrico [44]. B) reator cônico [45]. C) Reator com manta térmica [46]

fornecer gás carbônico e remover O_2 , e como controlar o pH e a temperatura do cultivo. Para informações detalhadas sobre a construção de um fotobiorreator consulte [47]

Materiais para construção

Embora não haja uma forma apropriada para o recipiente principal do reator, este deve ser de tal forma que a luz incidente seja aproveitada em sua totalidade evitando reflexões por

refração e espalhamento, ou seja, a luz deve incidir perpendicularmente no material.

Materiais como vidro e acrílico são amplamente utilizados para a construção de FBR devido a sua facilidade de obtenção, baixo custo e simplicidade de manuseio na construção. Vidros mais simples, como os de uso doméstico, são mais grosseiros e possuem uma superfície levemente deformada, perfeitos para cultivos em grandes quantidade. Vidrarias de superfície mais homogênea são preferíveis para evitar o espalhamento e refração causado por vidros mais rústicos e por aumentarem o aproveitamento efetivo da luz incidente no cultivo. Acrílico estabilizador de ultravioleta é superior aos demais materiais por sua leveza, flexibilidade, resistência e manuseabilidade de confecção [37].

Como pode ser conferido em maiores detalhes no capítulo 3, foi empregado o uso de impressão 3D para a confecção de reatores em plástico e, para os recipientes principais, viais de vidro. Assim, os reatores utilizados são modulares e de fácil reposição. Isso permite que este tipo de tecnologia seja difundida livremente pela internet, possibilitando a disseminação de aparatos experimentais sobre licença aberta de uso e uma futura criação de uma comunidade de fotobiorreatores global.

Luz

A iluminação é o parâmetro mais importante ao se projetar um fotobiorreator. Além de se ajustar da melhor forma possível a superfície vítrea que contém as algas (como discutido acima), a intensidade também deve ser levada em conta no design do reator. Agentes foto-tróficos devem receber luz suficiente, de acordo com sua concentração em algas/ml, para crescerem de maneira adequada. Luz insuficiente faz com que a taxa de crescimento líquido

não supere a taxa de mortes por perda pela respiração celular [46], já luz em demasia faz com que ocorra uma taxa de crescimento expressiva até a saturação do cultivo. E uma iluminação mais intensa ainda pode levar a foto-inibição [44].

Circulação

A circulação do material líquido do reator visa garantir a iluminação adequada e, conseqüentemente, o melhor aproveitamento interno da luz, através da constante limpeza de sensores e atuadores imersos ou não. Isso decorre de que a circulação (ou agitação) evita que haja acúmulo de material celular nas paredes adjacentes ao meio líquido. Além de que a agitação adequada garante as trocas gasosas adequadas no interior do meio líquido, podendo substituir o uso de bombas de ar, ajuda nos processos de circulação de calor, controle de pH.

Trocas gasosas e pH

Sistemas de ar visam facilitar as trocas gasosas entre a interface ar-meio de cultura promovendo a renovação da superfície de interação por impedir o saturamento do ar circundante. Esses sistemas podem ser divididos em dois tipos: fechados e abertos. Em sistemas fechados há uma recirculação do ar, de modo que nenhuma molécula escapa do sistema. Nesta configuração para evitar a morte por "sufocamento" de CO_2 há a reinjeção constante de dióxido de carbono controlado por uma central eletrônica. Nesta configuração podemos aumentar a concentração do gás para cerca de 0,2 a 5% do ar circulante a fim de aumentar a produtividade de biomassa sem uma alteração de pH nociva para a cultura[48]. O uso de ar atmosférico, com uma concentração de 0,033% de CO_2 , para cultivo é considerado de baixo rendimento. Tal configuração

é mais comum em reatores do tipo aberto, onde o gás sempre escapa após a interação com a cepa de algas. A combinação de injeção de gás carbônico com sistemas abertos é possível, embora não recomendada por não haver um aproveitamento efetivo do ar por recirculação, além de aumentar os custos de construção do reator. Além de controlar a concentração de gases no sistema, a injeção controlada de gases ajuda a controlar o pH e a concentração de O_2 . Estas regulações visam o controle da acidez do meio de cultivo e o impedimento de morte por fotossintetização devido a fotorrespiração evitando a morte celular por oxidação por excesso de íons livres.

Temperatura

Organismos autotróficos sempre vão produzir calor devido a ineficiência inata do processo fotossintético em converter em energia química a energia luminosa vinda do sol [48]. Estima-se uma eficiência de 31% de aproveitamento da energia solar por parte das algas, totalizando em 69% de perda por calor! Dependendo da quantidade de biomassa (em células por ml) no interior do reator e da potência luminosa incidente o sistema está mais suscetível a autoaquecimento devido a interação do material biológico com a luz. O uso de atuadores como jaquetas térmicas, módulos termoelétricos ou resfriamento por circulação de ar são necessários para manter a temperatura regulada para o melhor crescimento da cultura [47]. Temperaturas extremas de frio e calor sempre inibem, ou até matam, a cepa de algas, salvo o cultivo de agentes extremófilos.

2.3 Espectroscopia

A luz sempre se apresentou como uma ferramenta fantástica para estudar a natureza e explorar o universo. Newton, por exemplo, fez medidas altamente precisas do comprimento de onda da luz utilizando uma configuração de uma lente plano-convexa sobre uma superfície de vidro, o que cria um padrão conhecido por anéis de Newton [49]. Michelson e Morley fizeram uma série de experimentos com o seu famoso interferômetro, o que levou Einstein a formular seus famosos postulados da relatividade restrita. Planck, ao estudar o processo de emissão de radiação de corpos negros lançou a base do que hoje é a física quântica.

É natural, que em algum momento da história o homem investigasse a interação entre luz e matéria para decifrar o mistério de sua constituição (a primeira observação deste tipo é atribuída a Fraunhofer em 1814, embora espectros de linhas escuras já foram registrados anteriormente por Thomas Melvill em 1752 e por William Wollaston em 1802 [49]), assim surgiu a espectroscopia. Um de seus principais objetivos é determinar os níveis de energia de átomos e moléculas. Essa informação se apresenta na forma de espectros, a relação entre intensidade (geralmente dada em unidades arbitrárias) por alguma propriedade que caracteriza uma radiação eletromagnética como frequência ou, comprimento de onda ou, número de onda, que fornecem as transições (diferenças entre os níveis de energia) e a posição relativa entre as transições. Para moléculas, essas transições ocorrem de três diferentes formas: eletrônica, vibracional e rotacional. Desconsiderando a energia oriunda de movimentos de translação, a

energia total de uma molécula é a soma das energias de transição supracitadas.

$$E_{total} = E_{eletrônica} + E_{vibracional} + E_{rotacional} \quad (2.1)$$

Sendo a ordem das intensidades das energias, de maneira decrescente, dada por: eletrônica, vibracional e rotacional. De modo que, em uma primeira aproximação, não há interação entre os diferentes tipos de níveis e estes podem ser tratados de maneira independente. É claro que em um estudo mais profundo, transições eletrônicas implicam em estruturas vibracionais e rotacionais, bem como transições vibracionais implicam em estruturas rotacionais que podem ou não estar resolvidas. De modo, que apenas transições rotacionais são ditas puras [50].

Levando em conta a aproximação de Born-Oppenheimer [51], o movimento dos elétrons pode ser separado do movimento dos núcleos graças à enorme diferença de massas entre esses corpos. De modo que durante as transições eletrônicas, os núcleos permanecem "imóveis" e durante as transições vibracionais, aos elétrons é atribuída uma posição média devida a sua enorme "velocidade". As transições eletrônicas ocorrem, em geral, na porção entre o ultravioleta e o visível do espectro eletromagnético. Já as transições vibracionais, ocorrem com a incidência de fótons da porção do infravermelho do espectro, embora possamos transplantar as informações vibracionais, de maneira complementar, para o espectro visível por meio do fenômeno denominado de efeito Raman. Lembrando que, para cada tipo de espectroscopia há um conjunto de equipamentos, dotados de diferentes tipos de sensores e elementos dispersivos apropriados.

As informações coletadas por estas técnicas são usadas para estudos físicos e químicos,

na identificação de compostos, controle de qualidade e dinâmica de processos em ambientes industriais, farmacêuticos e hospitalares. Como não há uma barreira que impõe um limite em quando sistemas não-vivos se tornam sistemas vivos, não há um porquê para a utilização destas técnicas tão amplamente utilizadas pela física e química em estudos em biologia e medicina.

Vibrações moleculares

Toda molécula vibra com frequências características determinadas por sua estrutura química e espacial. Supondo uma molécula de N componentes, 3 graus de liberdade são atribuídos a translação do centro de massa da molécula e mais 3 graus são oriundos da rotação do seu centro de massa, ou 2 graus de liberdade caso molécula seja do tipo linear, o que dá $3N - 6$ (ou $3N-5$) vibrações possíveis. Modelos do tipo "massa-mola" são construídos através da informação estrutural da molécula e as massa atômicas de cada átomo participante. Para moléculas pequenas e simples, os resultados obtidos através de equações simples oriundas da mecânica clássica modelam com precisão as frequências detectadas nos espectros Raman e de absorção de infravermelho. Moléculas diatômicas, como o gás oxigênio, apresentam um único pico Raman, por exemplo.

Embora seja adequada para moléculas pequenas, tal procedimento fica intratável quando aplicado para moléculas maiores e mais complexas. Para esses casos, métodos computacionais como DFT¹ são utilizados embora o seu alcance para simular acuradamente espectros Raman seja limitado [25]. A abordagem usual para se descrever vibrações é simplificar o problema e categorizar todas as vibrações e agrupamentos de características específicas, que podem se relacionar com mais de um tipo de moléculas. Tais vibrações são atribuídas a estruturas moleculares

específicas como ligações características (Ex: C-C, C=C, H-O e etc) ou estruturas como anéis ou cadeias carbônicas. Deste modo, as vibrações que a molécula pode realizar são determinadas por operações de simetria relacionadas com esses grupos característicos. Considerações de simetria podem reduzir significativamente o trabalho no cálculo de modos normais e frequência das moléculas estudadas.

Espectroscopia de infravermelho

História

A radiação infravermelha foi descoberta em 1800, por Sir William Herschel. Ao aferir a temperatura de cada raia espectral, após decompor uma fonte de luz por um prisma, ele percebeu que o termômetro marcava temperaturas maiores conforme aproximava o equipamento da porção avermelhada do espectro e, ainda, o comportamento continuava mesmo que o bulbo de mercúrio não estivesse sendo iluminado por uma raia visível [50], isso levou a Herschel a conjecturar que havia uma frequência responsável por transportar o calor, hoje conhecido como uma banda, o infravermelho. Já em 1900, Coblentz já havia adquirido uma considerável coleção de espectros de gases, líquidos e sólidos [50].

Teoria

¹Teoria de densidade funcional, em tradução nossa - (Density functional theory).

A rigor, as vibrações devem ser tratadas quanticamente. Porém, por conta de sua simplicidade, é possível entender como funciona o processo de absorção do infravermelho e o efeito Raman considerando somente moléculas diatômicas e sistemas clássicos como osciladores mecânicos e campos eletromagnéticos. Tais construções permitem encontrar resultados semelhantes aos encontrados utilizando mecânica quântica. [50]

Classicamente os processos de absorção e emissão de radiação estão atrelados à variação periódica do momento de dipolo elétrico do sistema, sendo a radiação absorvida, ou emitida, de igual frequência a oscilação do dipolo. Assim, se qualquer uma das componentes do momento de dipolo μ oscilar com a mesma frequência incidente ocorrerá a absorção.

O momento de dipolo é devido a configuração nuclear da molécula. Moléculas diatômicas homonucleares não apresentam uma assimetria na sua distribuição de cargas, portanto não há momento de dipolo intrínseco nesta configuração. Já para moléculas diatômicas heteronucleares, podem haver assimetrias de cargas entre suas componentes e, assim, há um momento de dipolo não nulo associado. Para moléculas diatômicas, a única coordenada normal do sistema ($3N-5$, $N = 2$) coincide com a coordenada interna de ligação, q . Expandindo o momento de dipolo em série de Taylor em termos da variável q na posição de equilíbrio, temos:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (2.2)$$

onde μ_0 é o vetor de momento de dipolo permanente. Para pequenas variações em relação a posição de equilíbrio podemos ignorar termos de ordem superior neste somatório. Assim, para que haja absorção, ou emissão, é necessário que o termo $\left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \neq 0$ em pelo menos em uma de suas componentes x, y e z . Da mecânica quântica, a amplitude de transição da medida U de dois

O autor resolveu não adotar a notação de Dirac para evitar uma anotação carregada e pouco estética. Muito do que é aqui tratado pode ser visto sob a luz da notação de *brakets* em [52] e em [53]. Neste último, também há discussões sobre mecânica quântica sem o uso desta notação.

estados m e n é definida como :

$$U_{m \rightarrow n} = \int \psi_m U \psi_n d\tau \quad (2.3)$$

Substituindo U pelo momento de dipolo e aplicando a expansão em série de Taylor (2.2), temos:

$$\mu_{m \rightarrow n} = \mu_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (2.4)$$

Vale lembrar que a família de funções de onda ψ_n são as n -ésimas soluções do problema do oscilador harmônico quântico. De modo que, funções de onda caracterizadas por um n par são pares, e para n ímpares implica em funções de onda, também, ímpares. Deste modo, o primeiro termo do segundo membro da equação (2.4) é nulo por conta da ortogonalidade das funções ψ_n e ψ_m . Assim, temos as seguintes condições para que haja uma transição do momento de dipolo:

- $\left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \neq 0$. Ou seja, deve haver uma variação do momento de dipolo.
- $\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0$. Ou seja, a função dentro da integral deve ser par. Como q é ímpar (trata-se da coordenada interna da molécula diatômica) o produto $\psi_m \psi_n$ deve ser par, ou seja, as funções devem ter diferente paridade. Assim, temos a regra de seleção para o oscilador harmônico onde $\Delta n = \pm 1$. Onde para a absorção vale o sinal positivo e para emissão vale o sinal negativo [50].

Pela primeira condição, vemos (como já debatido anteriormente) que moléculas diatô-

micas homonucleares não apresentam transição de dipolo, sendo invisíveis para a espectroscopia de absorção do infravermelho (chamadas de transições inativas), pois seu momento de dipolo se mantém inalterado. O mesmo já não ocorre para moléculas diatômicas heteronucleares, as chamadas transições ativas. Este mesmo tratamento pode ser visto sob a luz da teoria de grupos, onde a absorção no infravermelho será ativa quando o estado final ψ_n contiver uma ou mais representações irredutíveis da coordenadas cartesianas [54], isto é, se

$$\Gamma^{\psi_n} \supset \Gamma^{(i)}, i = x, y, z. \quad (2.5)$$

Espectroscopia Raman

História

A teoria do espalhamento inelástico da luz foi proposta por Smekal em 1923 [55] e o fenômeno a ela associado foi primeiramente observado em 1928 por Raman e Krishnan [56], rendendo um nobel em 1930. Batizado de efeito Raman, ou espectroscopia Raman, esta técnica é uma das mais utilizadas para estudos de vibração moleculares atualmente por render informações sobre a estrutura química e forma física de substâncias, determinar de maneira quantitativa ou semi-quantitativa a quantidade de uma substância em uma amostra e identificar substâncias através de seu contorno espectral característico.

Teoria

Quando um feixe monocromático incide sobre uma substância ele pode ser absorvido, refletido, espalhado ou não interagir. Quando a energia do fóton corresponde a mesma energia da lacuna energética entre um nível e outro, o fóton pode ser absorvido e a molécula é levada ao nível mais energético. Esse é o princípio por trás da espectroscopia de absorção de UV-VIS e de infravermelho. Tal princípio não é aplicado ao caso do espalhamento que, deste modo, não é necessário que haja uma correspondência entre os níveis energéticos e os fótons incidentes. Para o caso da espectroscopia Raman, não procuramos a "perda" do fóton incidente, e sim o desvio da frequência deste fóton após o espalhamento.

No espalhamento Raman, a luz interage com a molécula e distorce sua nuvem eletrônica para formar um estado virtual de duração efêmera que ao decair é reemite um fóton com um desvio de frequência em relação a frequência original. Esse processo causa o movimento nuclear dos átomos da substância e, ou a energia do fóton é transmitida à molécula, ou a molécula cede energia ao fóton, caracterizando assim, um processo inelástico com um fóton com uma unidade de vibração diferente do fóton inicial. Caso só haja uma modificação da nuvem eletrônica não há um desvio expressivo da frequência do fóton de saída em relação ao de entrada. Tal fenômeno é chamado de espalhamento Rayleigh e é o espalhamento dominante em relação ao fenômeno Raman. O efeito Raman quando comparado ao espalhamento Rayleigh é de fraquíssima intensidade, enquanto 10^6 a 10^8 fótons são espalhados via efeito Rayleigh apenas 1 é espalhado via efeito Raman [25].

Neste ponto, em posse das informações anteriores, podemos elaborar matematica-

mente o que foi discutido. No efeito Raman, a atividade está ligada a uma mudança da polarizabilidade molecular, contra a mudança do momento de dipolo exigida pela absorção do infravermelho. Classicamente, o vetor de momento de dipolo \mathbf{P} oscila com uma combinação das frequências incidentes e pode ser escrito como:

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E} \quad (2.6)$$

Onde α é a polarizabilidade do material e \mathbf{E} é o campo elétrico da radiação incidente.

Desenvolvendo α em termos de uma série de Taylor com relação a q :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad (2.7)$$

Considerando que a coordenada q e o campo \mathbf{E} oscilam com frequências ν_v e ν_0 , respectivamente, suas equações podem ser descritas por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t), \mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2.8)$$

Aplicando as equações (2.7) e (2.8) na equação (2.6), obteremos:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) \quad (2.9)$$

Utilizando o cosseno da soma e da diferença de dois arcos, com relação aos argumentos

dos cossenos de (2.9), teremos:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 [\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_v)t) + \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_v)t)] \quad (2.10)$$

No primeiro termo do segundo membro de (2.10) temos somente o termo do espalhamento Rayleigh, de igual frequência a radiação incidente. Já no segundo membro, temos o espalhamento inelástico Stokes e anti-Stokes, caracterizados por $(\nu_0 - \nu_v)$ e $\nu_0 + \nu_v$, respectivamente. De modo que, para que haja, de fato, espalhamento Raman, é necessário que a polarizabilidade da molécula varie. Em outras palavras, é necessário que $\left(\frac{d\alpha}{dq} \right) \neq 0$. Ainda nos atendo à equação (2.10), temos que a radiação Stokes e anti-Stokes são simétricas e, classicamente, possuem iguais intensidades. Porém, experimentalmente, observa-se que as bandas do tipo Stokes são mais intensas.

Na temperatura ambiente a maioria das moléculas se encontram distribuídas no estado fundamental, embora outras ocupem os demais níveis seguindo a distribuição de Maxwell-Boltzmann. Quando um fóton promove a molécula de um estado m qualquer para um estado virtual a molécula pode retornar ao mesmo estado, a um nível n mais energético ou a um nível inferior caso esteja fora do estado fundamental. A maioria dos fótons são reemitidos com a mesma frequência incidente e dão origem ao espalhamento Rayleigh (de maior intensidade). Quando a molécula é promovida de um estado m para um estado n há uma perda de energia por parte do fóton neste processo e sua emissão é mais "*avermelhada*" que o fóton incidente, como a maioria das moléculas ocupam o estado fundamental a segunda maior intensidade de

espalhamento é denominada Raman Stokes, ou simplesmente espalhamento Stokes. Quando a maioria são levadas a níveis mais baixos o fóton emitido é mais energético e denomina o Raman anti-Stokes, ou, somente, espalhamento anti-Stokes. Esse espalhamento é o menos intenso entre todos os demais. Experimentalmente, verifica-se que a relação entre as intensidades Stokes e anti-Stokes:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(\frac{-e_v}{kT}\right) \quad (2.11)$$

Onde e_v é a energia do novo orbital, após a transição, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin. Para explicar essa diferença, devemos, lançar mão do modelo quântico para tal. Quando um fóton incide sobre uma molécula, ocorre uma perturbação em todos os níveis energéticos dela, é como se houvesse um estado intermediário de energia, também chamado de estado virtual. Matematicamente, em termos da teoria da perturbação dependente do tempo, esse processo se manifesta como um somatório com contribuição de todos os níveis de energia ². (Em seguida caindo para um nível de energia excitado.) O momento de transição induzido pode ser escrito como $\mathbf{P}_{mn} = (\alpha_{ij})_{mn} \mathbf{E}$ com $i, j = x, y, z$. Estas equações valem para o espalhamento Rayleigh, onde é considerada a polarizabilidade intrínseca. Para o efeito Raman devemos considerar as derivadas de α em relação a q . De modo que, $\alpha'_{ij} = \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0$ é chamado de Tensor Raman [50]. Para que haja sinal Raman, é necessário que ao menos uma das seis integrais, já que o tensor é simétrico, no momento de transição seja dada por:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau \quad (2.12)$$

Aplicando a série de Taylor (2.7) na integral (2.12), temos:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad (2.13)$$

Para $m=n$, temos o termo correspondente a radiação Rayleigh. Caso contrário a integral será nula, como explicado no caso do infravermelho. Assim como também discutido no caso da absorção do espectro IV, a integral do segundo termo gerará as regras de seleção para as transições dos estados vibracionais, onde o $\Delta n = +1$ caracteriza a radiação Stokes, e $\Delta n = -1$ caracteriza a anti-Stokes. Assim, para que haja sinal Raman efetivo, é necessário que a polarizabilidade da molécula se altere ou, em outras palavras, que $\left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \neq 0$. Assim como feito para a absorção no infravermelho, esse resultado prévio pode ser obtido pela luz da teoria de grupos. De modo que uma transição vibracional será ativa no Raman se o estado final contiver ao menos uma representação irreduzível das coordenadas do tensor de polarizabilidade da molécula [54], ou seja:

$$\Gamma^{\psi_n} \supset \Gamma^{(i^2)} \quad (2.14)$$

e,

$$\Gamma^{\psi_n} \supset \Gamma^{(ij)}, i, j = x, y, z. \forall i \neq j. \quad (2.15)$$

Para fins de completeza da teoria, a intensidade do sinal Raman é diretamente proporcional do quadrado do tensor de probabilidade (a probabilidade de transição, como feito

²O conceito por trás de todo o processo a luz da teoria da perturbação, Raman e Rayleigh, pode ser conferido em detalhes em [57], caso queira conferir a teoria da perturbação dependente do tempo, de modo mais geral e acessível, confira [52].

por Max Born [49]), e também é proporcional a quarta potência da frequência incidente ³. Tal relação é expressa por [50]:

$$I_{mn} = \left(\frac{16\pi^2}{9c^4} \right) I_0 \nu^4 |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (2.16)$$

Onde I_0 e ν são a intensidade e a frequência da radiação incidente.

As figuras a seguir ilustram o que foi comentado anteriormente. A figura 2.4 esquematiza o processo de espalhamento Raman e Rayleigh. A figura 2.5 exemplifica a relação de intensidades entre o espalhamento Stokes e anti-Stokes para a molécula de ciclohexano. Na esquerda, em um quadro de ampliação, é possível ver que o Raman anti-Stokes é comparativamente muito menor do que espalhamento Stokes. Já na figura 2.6 o mesmo é feito em relação ao espalhamento Rayleigh e Stokes. Ao centro, com o zero do eixo X posicionado no centro da raia de excitação, é possível ver a absurda disparidade de intensidades entre o espalhamento Stokes, a direita (espectros A e B) e Rayleigh ⁴.

Regras de seleção

Uma regra de seleção simples e qualitativa pode ser aplicada para entender se uma molécula, ou um grupo molecular, irá produzir um sinal Raman. Quando uma vibração modifica a polarizabilidade da nuvem eletrônica ao redor do átomo temos um forte sinal Raman. Geralmente, vibrações simétricas como as em moléculas diatômicas mononucleares (Ex: O_2

³Para aspectos teóricos e práticos sobre a relação da intensidade Raman e a frequência (inclindo a não citada equação de Kramer-Heisenberg-Dirac), consulte [25, 58]

⁴Em espectroscopia em geral, é comum substituir a unidade de comprimento de onda (nm) por número de onda (cm^{-1}) por razões de comodidade.

Diagrama esquemático dos fenômenos de espalhamento

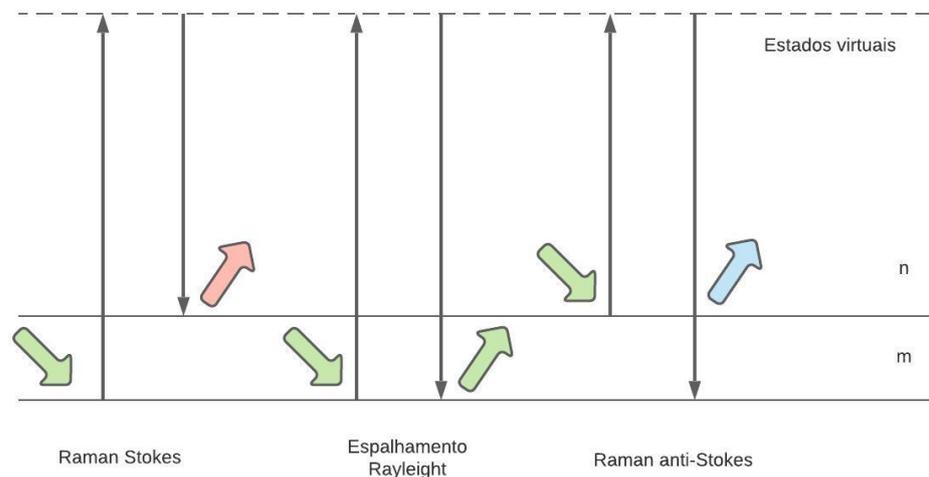


Figura 2.4: Diagrama esquemático dos processos de espalhamento da luz. Da esquerda para a direita temos, espalhamento Stokes, Rayleigh e anti-Stokes, respectivamente. Fótons de energia inicial (em verde) são espalhando ou em fótons de mesma energia, ou em fótons menos energéticos (em vermelho) ou em fótons mais energéticos (em azul).

Espectro Stokes e anti-Stokes do ciclohexano.

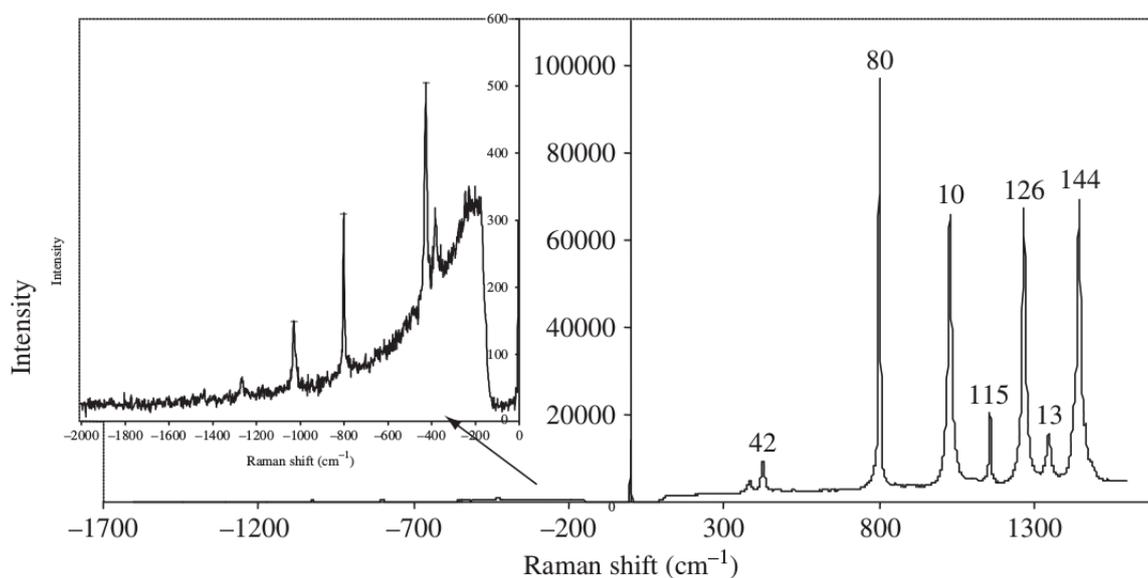


Figura 2.5: Espectros Stokes (direita) e anti-Stokes (esquerda) do ciclohexano. Há uma enorme diferença entre as escalas dos espectros. Fonte: Imagem retirada do primeiro capítulo de [25]

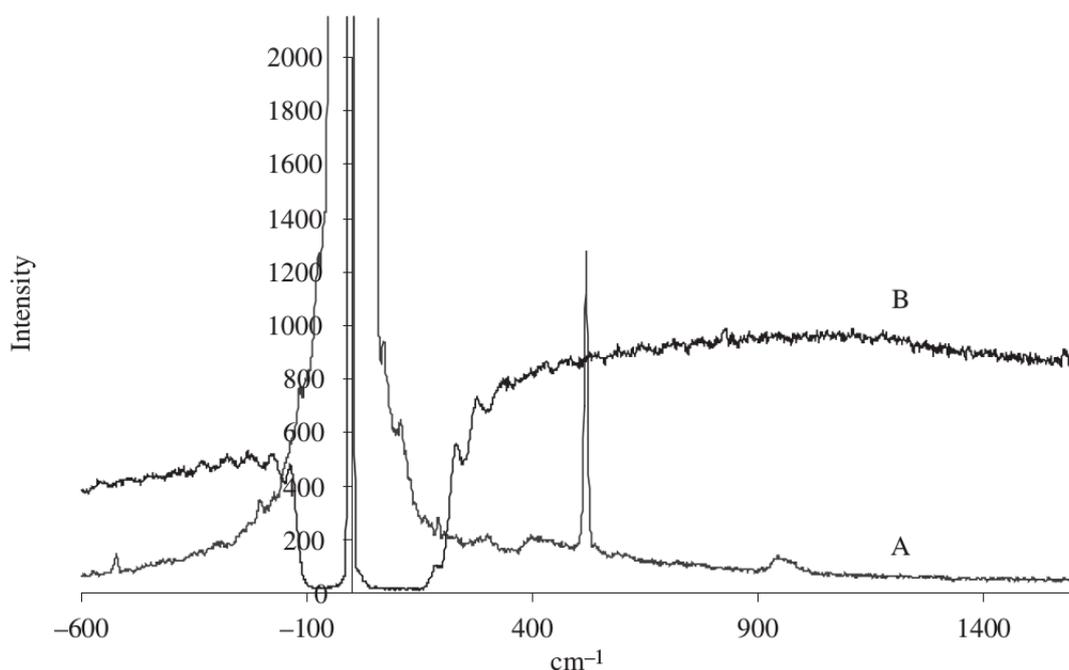


Figura 2.6: Exemplo de espectros Raman com e sem filtro. Em A vemos a predominância do espectro Rayleigh ao redor da origem. Em B, o funcionamento de um filtro e a amortização do espalhamento Rayleigh. Fonte: Imagem retirada do segundo capítulo de [25]

ou N_2) causam grandes mudanças na distribuição da nuvem eletrônica e dão um fortíssimo sinal Raman. Em contraste, quando há a mudança do momento de dipolo da molécula não há qualquer sinal Raman, somente a absorção da radiação incidente. Esse é o princípio por trás da espectroscopia de absorção de IR. Vibrações assimétricas são caracterizadas por modificações do momento de dipolo em moléculas e grupos vibracionais e produzem fortes assinaturas de absorvância na espectroscopia de IR.

Comumente, grupos de vibrações de moléculas e grupos moleculares apresentam combinações de vibrações simétricas e assimétricas, de modo que, para se obter a informação completa sobre a estrutura vibracional molecular utiliza-se ambas as espectroscopias. Na figura 2.7, é possível ver ambos os espectros de absorção de IR (metade superior) e Raman (metade

inferior) para o ácido benzoico. É possível perceber que em alguns picos onde há sinal Raman intenso, como no pico em 1000 cm^{-1} , há uma baixa absorvância por parte do espectro IR marcada pelos alto valores de transmitância (%T).

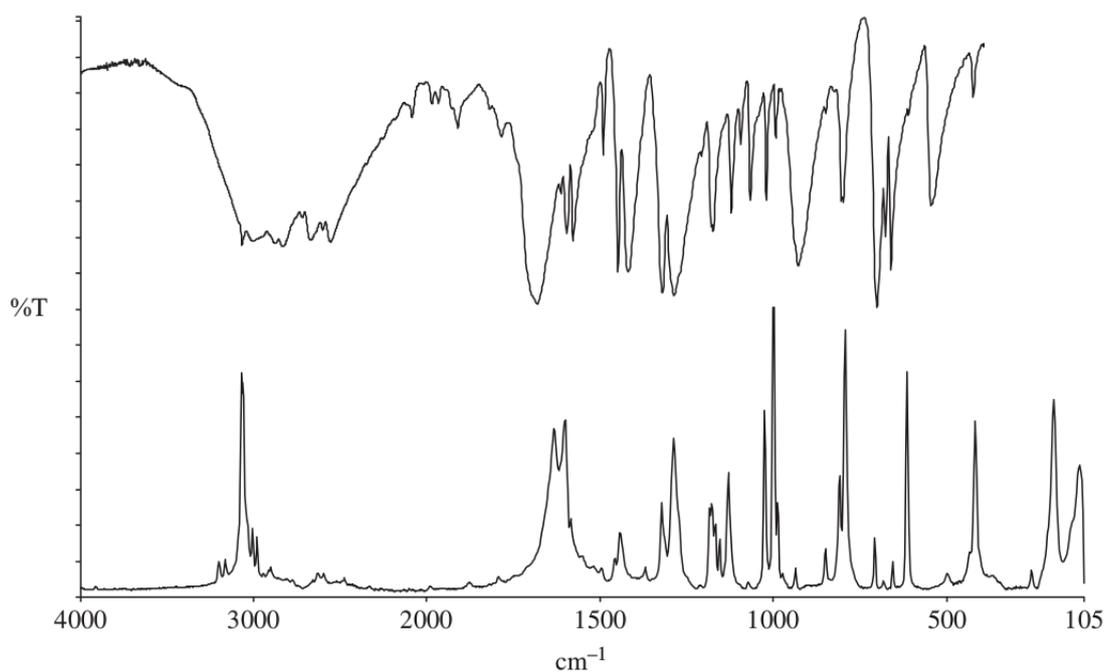


Figura 2.7: Espectros de absorção de IR e Raman do ácido benzoico, dois processos complementares. Fonte: Imagem retirada do primeiro capítulo de [25].

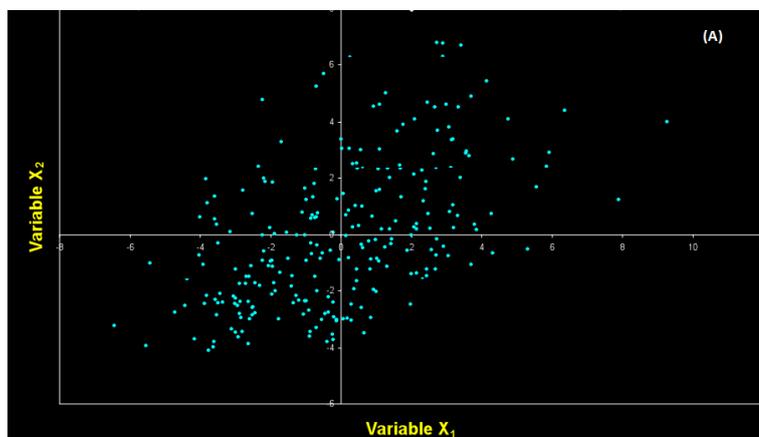
2.4 Análise de componentes principais - PCA

A análise de de componentes principais (ACP ou PCA do inglês) é uma das técnicas de múltiplas variáveis mais empregadas na discriminação de padrões entre amostras. Isso se deve à simplicidade de sua concepção e ao seu poder gráfico de criação de clusters de variáveis

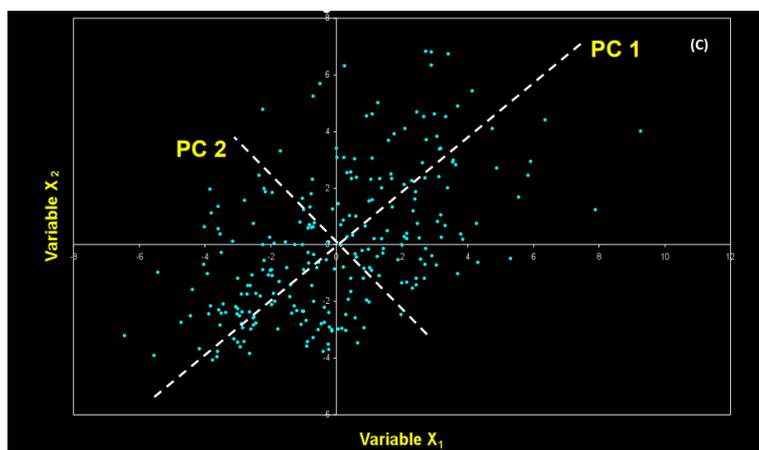
descorrelacionadas. O PCA visa a redução do espaço vetorial de variáveis originais e a sua reorganização ordenada em termos da contribuição das variâncias das componentes. Isso torna possível a eliminação de sobreposições de informação e permite a escolha de formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Em outras palavras, o PCA reorganiza a distribuição de dados em termos de eixos significativos, as componentes principais (PC's), onde ocorrem as maiores variâncias dos dados. Visualmente, isso é uma rotação dos eixos das componentes originais para um novo sistema de eixos, os das componentes principais. Isso pode ser visualizado na figura 2.8. Nela, podemos ver, em (A), um conjunto de dados bidimensionais dado pelas variáveis X_1 e X_2 . Em seguida, em (B), sob a nuvem de dados aplica-se dois eixos que caracterizam os sentidos de maiores variações no conjunto de dados. Por fim, em (C), os dados são apresentados apenas pelos eixos das PC1 e PC2.

Para determinar as componentes principais, deve se:

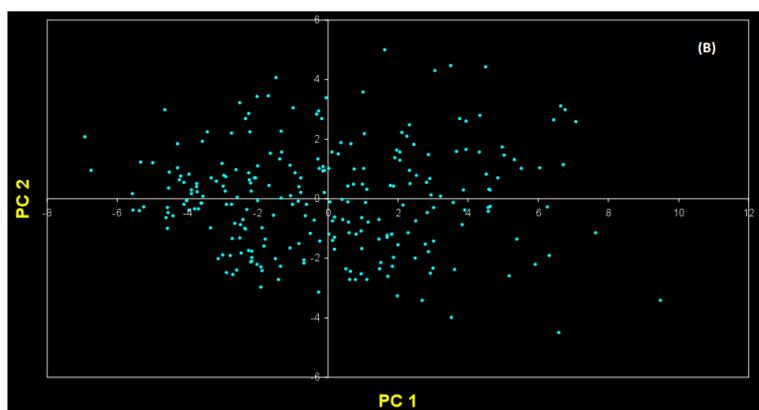
- obter os dados, M amostras de ordem N ;
- determinar a média destes dados;
- subtrair o vetor médio (outra maneira de se referir à média) de todos os itens que formam os dados;
- gerar a matriz de covariância. De ordem $n \times n$, essa matriz é gerada pela média do produto de cada subtração por ela mesma;
- determinar os autovalores e autovetores da matriz de covariância e



(a)



(b)



(c)

Figura 2.8: Esquematização do funcionamento do PCA sobre um conjunto de dados qualquer. De (a) para (c), vê-se o funcionamento progressivo do processo. Fonte: Imagens retiradas de [59]

-
- gerar a matriz de Hotelling, que nada mais é que uma matriz ordenada por ordem decrescente, com suas linhas formadas pelos autovetores, com base na ordem decrescente de autovalores.

O tratamento matemático que tange a teoria por trás do PCA, embora muito interessante, não é abordado aqui, com mais profundidade, por fugir ao escopo desta dissertação de mestrado. Porém, ao leitor mais interessado, o autor recomenda diversas obras, com diferentes graus de aprofundamento, como [60, 61, 62, 63, 64, 65].

2.5 Análise de Variância - ANOVA e o teste de Tukey

A análise de variância ou ANOVA é uma ferramenta de análise estatística usada para comparar três, ou mais, distribuições de uma medida entre si com base em um fator em comum entre as amostras. De modo que a ANOVA é uma generalização do teste-t de Student. Além de considerar a média das distribuições, informação essa que pode ser insuficiente para discriminar os grupos de amostras (principalmente quando estas possuem médias muito próximas), a ANOVA leva em consideração a variação da medida dentro de cada amostra.

Um dos principais objetivos da técnica, e um dos mais empregados, é verificar se há diferenciação entre três ou mais grupos de amostras com base em um teste estatístico. Para tal, assim como no teste de Student, é definido um teste de hipótese como se segue:

- H_1 - não há diferença significativa entre as amostras;
- H_2 - há ao menos uma amostra diferente das demais.

Caso os grupos apresentem a mesma variabilidade e a mesma média de desempenho, as suas médias tendem a se sobrepor, o que confirma a primeira hipótese, H_1 . Caso contrário, teremos a confirmação da segunda hipótese H_2 , com grupos de mesma variabilidade mas médias distantes entre si. Deste modo, temos distribuições cada vez menos sobrepostas entre si. Neste ponto, podemos fazer um paralelo com o conceito ótico de poder de separação. Onde, de início temos dois objetos tão próximos entre si, ou com uma baixa resolução do aparato ótico, que em relação ao observador, os objetos parecem ser um só. Quando substitui a ótica do equipamento por, digamos, um poder de resolução maior o contorno que antes era um só, agora é um contorno de dois objetos, como pode ser visto na figura 2.9. Deste modo, a técnica ANOVA é utilizada como aparato ótico para verificar se, de fato, duas distribuições são diferentes entre si. Para tal, e de maneira simplista, usa-se o critério do valor P para definir se de fato há separação entre os grupos amostrais.

Porém, embora capaz de discriminar grupos amostrais, a ANOVA não é capaz de indicar quais amostras diferem de qual sob uma mesma característica. Para que obtenhamos uma análise mais completa é necessário que outra análise seja feita em conjunto, o teste de pareamento de Tukey. O teste de Tukey é uma poderosa ferramenta estatística ao ser capaz de fazer comparações entre todas as amostras e por ser de fácil aplicação. O teste consiste de comparações entre todas as médias amostrais e se baseia na diferença mínima significativa. Neste cálculo utiliza-se a distribuição da amplitude de Student, o quadrado médio dos resíduos (anteriormente calculados pelo ANOVA), e o tamanho amostral dos grupos. Quando o tamanho amostral entre os grupos é igual, o teste de Tukey é dito exato. Caso contrário, é conhecido como teste de Tukey-Kramer.

Os tratamentos matemáticos que tangem as teorias por trás da ANOVA e do teste de Tukey, embora muito interessante, não são abordados aqui, com mais profundidade, por fugirem ao escopo desta dissertação de mestrado. Porém, ao leitor mais interessado, o autor recomenda diversas obras, com diferentes graus de aprofundamento sobre os assuntos, como [60, 61, 62, 63, 64, 65].

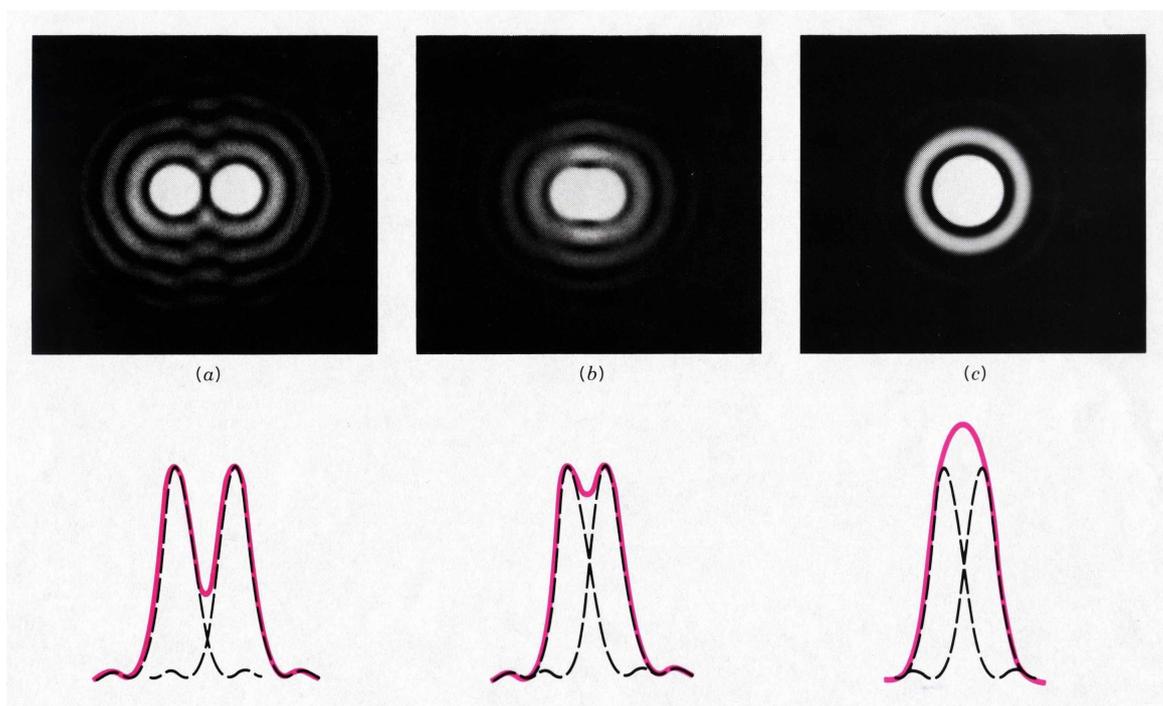


Figura 2.9: Poder de separação de dois sinais luminosos. Em (a), (b) e (c) vê-se, de fato, o grau de separação em dois sinais luminosos em diferentes graus. Logo abaixo, as respectivas curvas de cada fotografia. Fonte: Imagem retirada de [66]

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA

As atividades experimentais que guiaram esta dissertação podem ser divididas em quatro etapas principais. A primeira consiste na identificação por sequenciamento do RNA das microalgas utilizadas. Em especial, discute-se o por que da utilização da alga *Chlamydomonas sp.* como principal objeto de estudo da última etapa deste trabalho. A segunda etapa se refere à construção de uma bateria de micro-reatores automatizados para o estudo das algas. A terceira envolve o cultivo e a manutenção das cepas em ambientes controlados. Posteriormente, na quarta etapa, os materiais, equipamentos e o pré-tratamento dos dados são expostos em detalhes. Este capítulo traz considerações de natureza prática a respeito do uso de técnicas espectroscópicas para identificar e discriminar três cepas de microalgas e, também, o uso de tais ferramentas para analisar a produção de biomoléculas de uma cultura de microalgas, com diferentes aclimações.

3.1 Microlagas

Neste trabalho utilizamos três espécies de microalgas, *Chlamydomonas sp.* (LBA40), *Chlorella sorokiniana* (LBA39) e *Nannochloropsis oceanica*. As cepas LBA39 e LBA40 foram cedidas pela Embrapa, enquanto que a cepa de *Nannochloropsis* foi adquirida comercialmente. A identificação de microalgas nem sempre é uma tarefa fácil, visto que muitas espécies são morfológicamente idênticas entre si. Mesmo com tamanhos e formas aproximados, diferentes espécies apresentam metabolismos significativamente distintos. Assim, a distinção de espécies carece de uma identificação correta, e por isso, técnicas de identificação moleculares que analisam regiões específicas do DNA são amplamente utilizadas. A identificação precisa das algas utilizadas neste trabalho foi realizada pela EMBRAPA, a partir do isolamento de regiões específicas do DNA mitocondrial presente em 30 mg de biomassa fresca usando o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)[67]. Todas as algas utilizadas neste estudo passaram pelo processo de identificação. Para maiores detalhes do processo de extração de DNA, materiais e softwares utilizados, locais de coleta e todas as algas usadas consulte [67, 47].

Chlamydomonas sp.

Chlamydomonas é um gênero de alga verde unicelular com mais de 500 espécies já descritas [68]. Essas microalgas são encontradas em todo mundo, no solo, na água doce, nos oceanos e até mesmo na neve no topos de montanhas. Possuem parede celular, cloroplasto, um "olho vermelho" que serve como sensor de luz e dois flagelos utilizados para movimento do tipo nado de braçada. São utilizadas como sistemas modelo no estudo de diversos problemas em

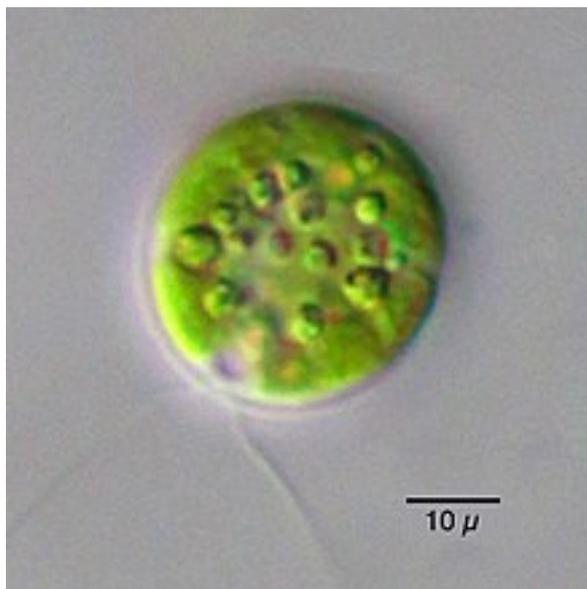


Figura 3.1: Imagem obtida por microscópio óptico de um indivíduo do gênero *Chlamydomonas*. Fonte:Imagem retirada de [73]

movilidade flagelar, genética, biologia molecular e celular. Em particular, elas têm recebido grande atenção pelo seu potencial na biorremediação, produção de biocombustíveis, hidrogênio molecular e fármacos [69, 70, 71, 40]. Além disso, o seu genoma revela a evolução de diversas funções importantes em plantas e animais [72]. Uma imagem desta microalga pode ser vista na Figura 3.1.

Neste trabalho, a alga *Chlamydomonas* recebe uma atenção especial. Em estudos preliminares de aclimação, com um cultivo em um meio de cultura carente de nutrientes, esta alga apresentou um notório amarelamento em relação as demais microalgas. Para mais detalhes veja a seção 4.3

3.2 Fotobiorreatores

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema automatizado para a cultura de microalgas de forma paralela e automatizada. Na Figura 3.2 o sistema é ilustrado através de diferentes perspectivas do modelo 3D. Na Figura 3.3 são mostradas algumas fotos do sistema real utilizado. Suas principais características são as seguintes.

O sistema é composto por oito fotobiorreatores (FBR) idênticos e independentes. Em cada um deles a cultura é mantida em um frasco circular de vidro borossilicato com diâmetro externo de 28 mm, altura 85 mm e volume total de até 40 ml. O frasco possui boca rosqueada na qual uma tampa de polipropileno pode ser enroscada. A parte superior da tampa possui uma abertura circular, com diâmetro igual ao diâmetro interno da boca do frasco de vidro. O frasco pode ser vedado de forma hermética colocando-se um septo de silicone entre a tampa e o frasco. Para que haja troca de ar com o ambiente externo, o septo pode ser substituído por um filtro de teflon, neste caso temos uma troca passiva. Para uma troca ativa e controlada, pode ser utilizado, no lugar do septo ou do filtro, um disco de plástico duas conexões para entrada e saída de ar embutidas.

Além do frasco, cada FBR possui um compressor de ar, um agitador, um painel de iluminação e um sensor de densidade. Todos esses componentes são presos no bloco do reator no qual o frasco é encaixado.

O objetivo do compressor é arear a cultura, mantendo as concentrações de dióxido de carbono e o oxigênio em níveis adequados além de promover a homogeneização da cultura através da agitação causada pelo movimento vertical da subida das bolhas de ar. Ele possui

conexões para tubos na entrada e na saída de ar, sendo capaz de bombear até 0,25 L/min dentro da cultura, e pode ser utilizado para bombear o ar natural atmosférico ou algum ar sintético preparado e armazenado em um reservatório externo.

O objetivo do agitador é manter a cultura homogênea, impedindo a precipitação no fundo do frasco e a formação de filme de microalgas nas paredes do frasco. Ele é um agitador do tipo magnético e foi construído colando-se um pequeno ímã de neodímio cilíndrico, encaixado em um disco de plástico, na parte central das pás de uma ventoinha com dimensões $30 \times 30 \times 10$ mm. O campo magnético desse ímã giratório faz girar outro ímã, envolto em teflon e submerso no fundo do frasco, que funciona como uma pá giratória. Um adaptador de plástico prende o agitador no bloco do reator, logo abaixo do fundo do frasco.

O painel de iluminação pode ser montado com diferentes tipos de leds. Neste trabalho utilizamos três leds brancos neutros (5000 K) com 3 W de potência máxima cada. Na Figura 3.4 é mostrada sua irradiância espectral, determinada através do uso de um espectrofotômetro (espectrômetro CCS200 com fonte de luz SLS201L, ambos da Thorlabs) e medidor de potência luminosa (PM160T, Thorlabs).

O sensor de densidade é composto por um led (5 mm, branco e 6000 K) colocado à frente de um sensor de luz digital (Tcs34725, AMS), ambos presos no bloco do reator, sendo que entre eles, ou seja, no caminho ótico do sensor, temos a região onde o frasco é encaixado. A densidade de microalgas pode ser calculada a partir da variação relativa da luz medida pelo Tcs34725, causada pela cultura dentro do frasco. O Tcs34725 é capaz de medir a luz a partir de três canais, azul, verde e vermelho, cada um relacionado a uma responsividade máxima em um comprimento de onda diferente, no caso, 465 nm, 525 nm e 615 nm, respectivamente. A

relação entre a responsividade em cada canal do sensor, dada em leitura $\mu W cm^{-2}$, e a densidade de microalgas na cultura dentro do frasco, dada em microalgas/ml, é obtida através da contagem direta de microalgas na cultura obtida com auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópio ótico. Na Figura 3.5 é mostrada a curva de calibração do sensor. Neste trabalho utilizamos o canal vermelho (615 nm) do Tcs34725 para acompanhar a densidade da cultura dentro do reator. No nosso caso, esse comprimento de onda é interessante pois, entre os três disponíveis, apresenta menor espalhamento na água e está fora das regiões de absorção dos pigmentos ativos.

O bloco de cada reator foi impresso em uma impressora 3D alimentada com plástico PLA. Ele foi projetado para que todos os componentes descritos acima possam ser facilmente montados e conectados através de cabos elétricos no conector de controle do reator.

O sistema completo é alimentado com uma fonte chaveada de 60 W (12 VDC e 5 A) e controlado a partir de uma placa micro-controlada Arduino Mega 2560. O software de controle permite que o sistema funcione de forma autônoma de acordo com parâmetros pré-definidos, além de permitir que o usuário altere esses parâmetros a qualquer instante através de uma interface de comunicação serial entre a placa Arduino Mega e um computador com tela, teclado e sistema operacional Linux ou Windows. O estado de cada reator (iluminação, fluxo de ar, agitação e densidade da cultura) ao longo do experimento é registrado periodicamente em um arquivo de log gravado no computador. A visualização desses dados é feita plotando o log em tempo real através de um programa escrito na linguagem de programação Python e que faz uso das bibliotecas Matplotlib e NumPy.

3.3 Cultivo e manutenção

O cultivo das microalgas foi performedo em meio BG11 [37, 74], e apenas ao cultivo de *Nannochloropsis* foi acrescentado sal marinho na concentração de 15 g/l. As trocas gasosas ocorrem naturalmente através de um filtro de teflon hidrofóbico acoplado individualmente à tampa de cada frasco. O processo de trocas gasosas é auxiliado por um agitador orbital configurado para operar em períodos de 15/15 min ligado/desligado a 180 rpm. Ambas as culturas são mantidas em viais de 40 ml que recebem manutenção a cada semana, quando a cultura é repiçada e os recipientes são trocados por frascos limpos. A iluminação é feita com o uso lâmpadas fluorescentes e um timer elétrico, para alternar em períodos de claro e escuro de 12 horas cada, ligados a rede de energia do laboratório. Além disso, amostras periódicas são coletadas para reinício das culturas. A temperatura de colheita das microalgas foi estimada em $27^{\circ} \pm 5^{\circ}$. O erro na temperatura foi estimado com a oscilação térmica diurna do laboratório e a transferência de calor da lâmpada no período de ativação. Todo o processo ocorre ao longo de uma semana.

3.4 Materiais, equipamentos e pré-tratamento dos dados

Aquisição dos espectros Raman

Preparação das amostras

Frequentemente, os experimento de espectroscopia Raman sofrem de fotodegradação e fluorescência da amostra [25]. Com o propósito de evitar tais problemas característicos, foi desenvolvido um procedimento de lavagens seriadas que resultam na formação de um aglome-

rado na forma de flocos homogêneos e úmidos. Tal técnica, permitiu que os flocos submetidos a análise permanecessem úmidos ao longo de todo o processo, o que evitava a fotodegradação por aquecimento e, por consequência, o aparecimento de bandas de fluorescência [75]. Para o caso excepcional da *Chlamydomonas*, além da formação dos flocos úmidos, a lavagem seriada evita a formação de grandes cristais de sal que atrapalham consideravelmente a aquisição dos espectros.

O processo consiste na deposição de 1 ml do material algal recém coletado dos reatores em frascos do tipo Eppendorf de 1,5 ml, que são submetidos a uma centrifugação a 10000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante é removido e no lugar aplicasse 1 ml de água destilada, que é submetido, novamente, ao processo de centrifugação. Este ciclo é repetido por mais três vezes ao longo do processo de lavagem. Após a lavagem, a amostra é depositada em uma lâmina de microscopia que é posta, por 4 minutos e a 50°C, em uma estufa. Tal procedimento, forma biofilmes concisos e espessos que retém a umidade na amostra, permitindo espectros reproduzíveis ao longo de todas as aquisições. Após o tratamento térmico, as amostras são prontamente submetidas ao espectrômetro Raman.

Instrumentação

Para a realização dos espectros foi usado o espectrômetro LabRAM HR Evolution da Horiba, equipado com grade de 1800 linhas/mm e com detector CCD [Syncerity OE]. Os espectros foram obtidos com um laser semiconductor sintonizado na linha 405 nm (0,4 mW) focalizados nas amostras com uma objetiva de 50 x (O foco foi escolhido de tal modo que o sinal de Raman fosse o máximo, isso implicou que o foco estivesse sobre as microalgas com

uma profundidade aproximada de 1 micrometro). Os espectros foram registrados no intervalo espectral entre $750\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de $0,5\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos por meio de 5 acumulações de 12 segundos cada. A remoção da radiação de fundo foi feita pelo software LabRAM6. Foram adquiridos entre 13 a 15 espectros por espécie de microalga. O autor presta os seus sinceros agradecimentos ao CNANO, por ceder o espaço e os equipamentos para a realização deste trabalho.

Processamento de dados

Os espectros Raman adquiridos foram submetidos a uma série de rotinas computacionais para que a comparação entre as amostras de diferentes tipos de preparo ou entre espécies estivessem em pé de igualdade, ou seja, em uma mesma escala. Tais diferenças entre os espectros brutos é devida a uma série de fatores oriundos da montagem da lâmina de microscopia, bem como a diluição das algas no reator.

Para que os espectros fossem comparáveis entre si, todos passaram por uma suavização com o uso de um filtro de Savitzky-Golay (windows=51, grau polinomial=7). Em seguida, os espectros foram submetidos a uma remoção de linha de base por quadrados mínimos assimétricos [76]. Por fim, os espectros foram normalizados pelas suas respectivas áreas e, foi gerado para cada amostra uma matriz de variâncias. Todas essas etapas foram desenvolvidas pelo autor com a linguagem PYTHON[77] e os pacotes computacionais NUMPY[78] e SCIPY[79]. As matrizes das variâncias foram submetidas a análise de multivariáveis via PCA em relação a covariância. A atribuição dos picos foi feita com a média dos espectros de cada amostra, após passarem por um processo de deconvoluções por pacotes de distribuições do tipo Pearson VII

[80] através do programa PEAKFIT.

Aquisição dos espectros de absorção de UV-VIS

Preparação das amostras - Extração de pigmentos em acetona

Para analisar a concentração de pigmentos no interior das células, foi utilizado um processo adaptado de extração por acetona pura [81, 82, 83, 84, 85]. Para tal, um mililitro das amostras retiradas dos reatores foram depositadas em tubos Eppendorf de 1,5 ml e submetidas a uma centrifugação de 5 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi substituído por acetona pura. Após isso, as amostras foram levadas a um banho de batimento ultrassônico por 30 minutos, para fragmentar as células e facilitar o processo de extração. Logo após, os pinos são centrifugados, com as mesmas configurações supracitadas, para que o material celular nadante não interfira com a leitura espectroscópica. Ao final do processo o material é prontamente depositado em cubetas de quartzo e submetidos a análise.

Instrumentação

Os espectros de absorção óptica foram obtidos à temperatura ambiente usando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR de duplo feixe (Shimadzu UV 2600), operado no intervalo de de 400 – 900 nm. O autor presta os seus sinceros agradecimentos ao CNANO, por ceder o espaço e os equipamentos para a realização deste trabalho.

Processamento de dados

Para propósitos de comparação, os espectros foram submetidos a alguns processos de tratamento de modo que, quando analisados, não fossem feitas aferições errôneas das concentrações relativas entre carotenóides e clorofilas. Deste modo, os espectros obtidos passaram por um programa para a remoção das linhas de base oriunda ou da fluorescência, ou de baixas concentrações de algas nos reatores. Logo após, os espectros foram normalizados de acordo com a amplitude da banda 432 nm.

Aquisição dos espectros de absorção de infravermelho - FTIR

Preparação das amostras

Os procedimentos adotados foram os mesmos empregados na preparação das amostras que foram submetidas a análise Raman. Com a exceção de que, ao final da lavagem, uma gota de biofilme foi depositada sobre o cristal do equipamento de FTIR. Como, no FTIR a água tem uma enorme banda característica, amostras úmidas possuem uma forte presença desta substância. Com o propósito de mitigar as bandas características da água, os espectros foram adquiridos ao longo de 40 minutos, com uma leitura a cada dois minutos. Assim, podemos acompanhar o decréscimo do excesso de água na amostra.

Instrumentação

As experiências de FTIR foram realizadas usando um espectrômetro Bruker (modelo Vertex 70). A análise foi realizada usando o módulo de refletância total atenuada – ATR. A

média das medidas foi de 96 varreduras, aos quais foram realizadas em uma resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . O autor presta os seus sinceros agradecimentos ao CNANO, por ceder o espaço e os equipamentos para a realização deste trabalho.

Processamento de dados

Para fins de comparação entre as amostras, foi realizada a remoção da linha de base dos espectros e a normalização pelo pico ao redor da posição de 1650 cm^{-1} , região característica da Amida I, atribuída às vibrações de estiramento $\nu(C=O)$, típicos desta proteína. Utilizamos esta normalização para evitar as flutuações de leituras oriundas da espessura variável da camada de biofilme das amostras. Os espectros de todas as microalgas mostraram bandas de absorção semelhante na faixa de 900 a 3100 cm^{-1} . No caso da aclimação das algas, essas bandas se modificaram em intensidade e formato, o que indica alguma modificação do biomolecular no interior das algas. Tais picos foram atribuídos a diferentes grupos moleculares com base em padrões bioquímicos disponíveis na literatura [86, 87, 88, 89, 90].

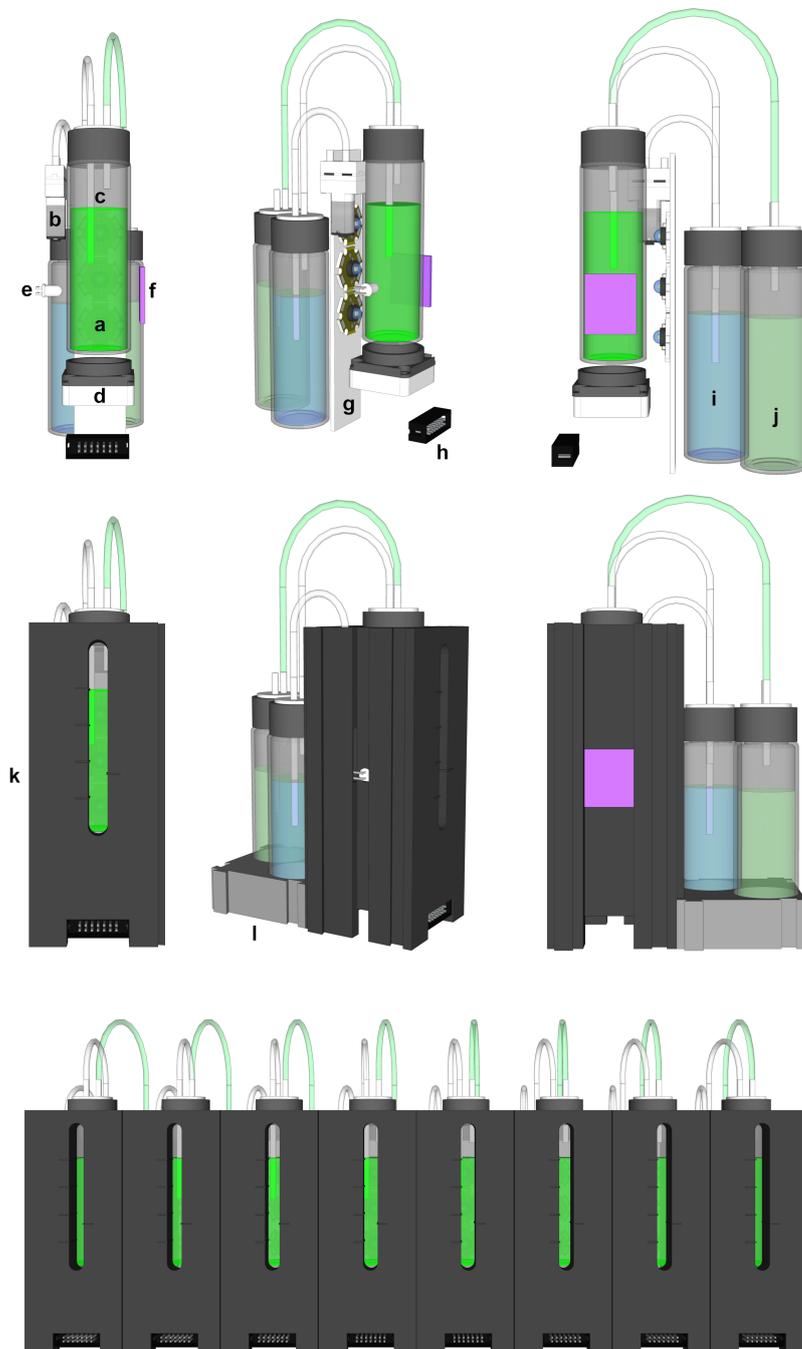


Figura 3.2: Modelo 3D esquemático de um micro-reator construído neste trabalho. Legenda: (a) vial de 40 ml contendo meio de cultura e um bastão de agitação (não mostrado na figura); (b) bomba de ar para aeração; (c) tubos para aeração e descarte; (d) ventoinha com um ímã na embutido, para ventilação e agitação do bastonete; (e) led branco 6000K; (f) sensor de atenuação ótica; (g) barramento para comunicação com o microcontrolador; (h) aleta com o sistema de leds; (i) vial com água para umidificar o ar e assim evitar perda de água por evaporação; (j) vial de descarte; (k) case plástico para acomodar o sistema e (m) case para acomodar os viais externos.



Figura 3.3: Sequência de fotografias do micro-reator desenvolvido ao longo deste trabalho. Nas três primeiras imagens, linha superior, têm-se diferentes ângulos de uma unidade de um micro-reator. Logo abaixo, uma imagem do bloco de reatores utilizados para realização dos experimentos de aclimação de microalgas.

Curva de irradiância espectral.

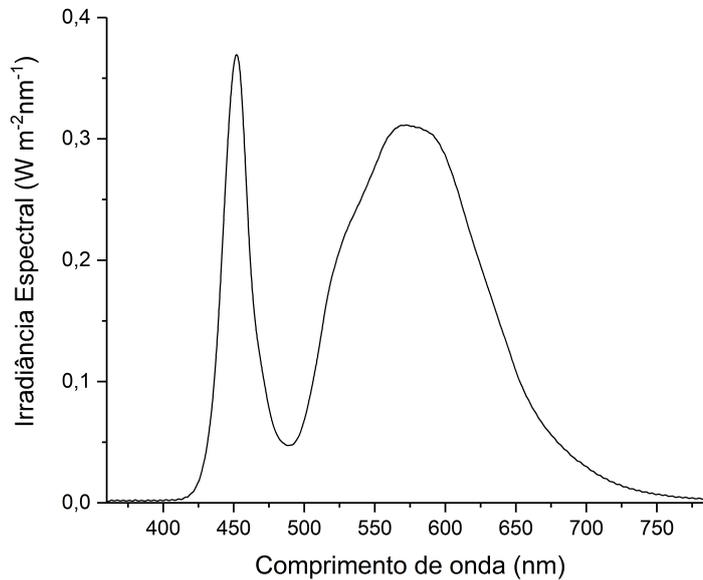


Figura 3.4: Curva de irradiância espectral, uma descrição gráfica da fonte de luz utilizada nos reatores. Os principais picos são distribuídos ao longo das regiões de maior aproveitamento fotossintético, azul e vermelho (picos em 450 nm e 590 nm, respectivamente). Há também uma deficiência na banda das cores verdes e amarelas (470-550 nm). Região marcada por não haver aproveitamento efetivo da luz pelas algas.

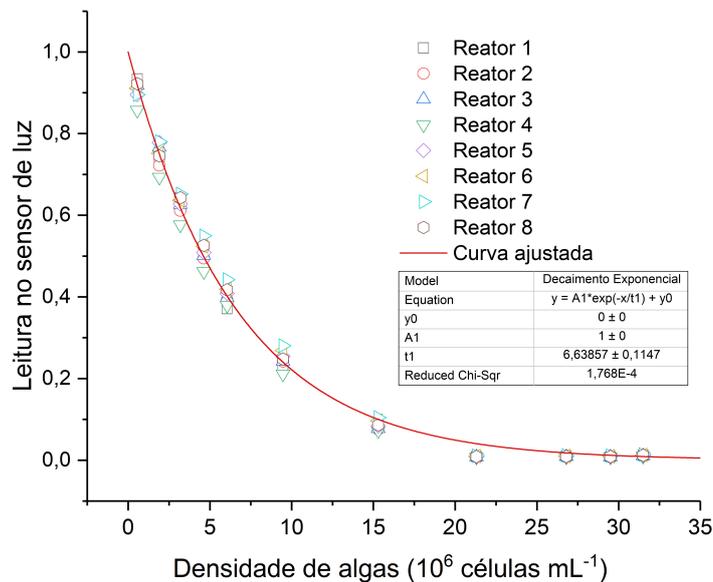


Figura 3.5: Leituras de calibração do sensor de atenuação óptica. Um modo de aferir a densidade de algas em um reator.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, estão sintetizados alguns dos resultados obtidos ao longo da realização deste trabalho, que comprovam que o aparato, a metodologia e o tratamento de dados aqui empregados podem ser utilizados no estudo efetivo da produção de biomoléculas no interior de microalgas. Inicialmente, são apresentados dados referentes ao processo de identificação e caracterização das três microalgas usadas. Este processo, serviu como balão de ensaio para o aperfeiçoamento da técnica até culminar na última etapa. Na segunda parte, apresentamos dados referentes a calibração do sistema de micro-reatores. Por fim, são mostrados os resultados dos experimentos finais, onde a utilização do sistema desenvolvido é empregada para estudar os efeitos de diferentes aclimações de intensidade luminosa e concentração de nutrientes disponíveis nas cepas de *Chlamydomonas sp.*

4.1 Primeira etapa

Espectroscopia Raman - identificação e caracterização de três espécies de microalgas.

A figura 4.1 mostra os espectros Raman médios das três microalgas utilizadas neste trabalho. Visualmente, os espectros são muito semelhantes entre si, ao ponto de que nenhum pico ou banda caracteriza unicamente uma amostra de alga das demais. Para que se diferencie as algas umas das outras, procurou-se por características comuns a elas que possam ser submetidas a análise e, por fim, gerem uma assinatura de cada espécie. Sendo assim, buscou-se por decompor o espectro médio de cada alga por alguns pacotes de curvas características de vibrações moleculares específicas de algumas moléculas. Estes espectros são ressonantes em relação a dois compostos, posteriormente atribuídos a dois grupos de pigmentos, carotenoides e clorofilas. Tal afirmação se deve ao fato de que, durante as investigações preliminares foi verificado que utilizando os lasers de 405 e 532 nm, constatou-se um acréscimo considerável à intensidade de alguns picos em relação a outros, como pode ser visto na figura 4.2. Na figura, vemos a comparação entre os espectros da *Chlorella*, obtido com as raias de 405 e 532 nm e o sinal Raman da clorofila-A (405 nm)[91]. Quando alternadas as frequências dos lasers de excitação, percebe-se que há um crescimento acentuado da banda entre 1200-1500 cm^{-1} e os picos em 1006, 1158, 1187, 1525 e 1555 cm^{-1} para o laser de 405 e 532 nm, respectivamente. A comparação direta entre os espectros adquiridos para a CO, o espectro da clorofila-A e o espectro Raman do β - caroteno [92](obtido com um laser de 632,8 nm e não mostrado na

figura) corrobora a ideia apresentada em [93], de que os espectros Raman resultantes de um conjunto de biomoléculas, todas as substâncias no interior das algas, são uma superposição linear dos espectros individuais de cada molécula presente. De fato, os picos mais pronunciados dos espectros das algas são prontamente atribuídos ao contorno característico dos carotenoides, principalmente quando comparamos o espectro de 532 nm com o espectro padrão em [92]. O mesmo acontece com a clorofila-A em comparação ao espectro da *Chlorella* com o laser de 405 nm, como pode ser visto na figura 4.2. O realce que ocorre em alguns picos, dependendo da fonte utilizada, é oriundo do fato de que o comprimento de onda dos lasers está próximo de uma frequência de transição eletrônica característica destas substâncias, conhecido como excitação Raman ressonante [25, 94, 95]. Isso pode ser usado, de maneira limitada e grosseira, para a construção de um perfil de excitação ressonante [25]. Os comportamentos espectrais encontrados para a *Chlorella* são também válidos para as demais algas utilizadas no trabalho. A relação do tipo de vibração e sua atribuição a presença de biomoléculas, para cada alga, pode ser conferida na tabela 4.1¹.

Como se pode perceber, os espectros Raman das microalgas são sensíveis aos comprimentos de onda utilizados para a análise. O que candidata o uso da espectroscopia Raman para estudos de microalgas. Porém, devido à grande similaridade entre os contornos espectrais das algas (figura 4.1), os sinais por si só não são suficientes para discriminar as cepas. Para tal, é necessário o uso de uma técnica estatística que possa lidar com as pequenas variações invisíveis por inspeção visual. De fato, existem uma miríade de técnicas candidatas [96] cuja a escolha é ditada pelo tipo de dados que o experimentador tem e qual o objetivo a ser alcançar ou verificar. Assim, utilizou-se de uma ferramenta de análise estatística multi-variacional, o PCA. Ao

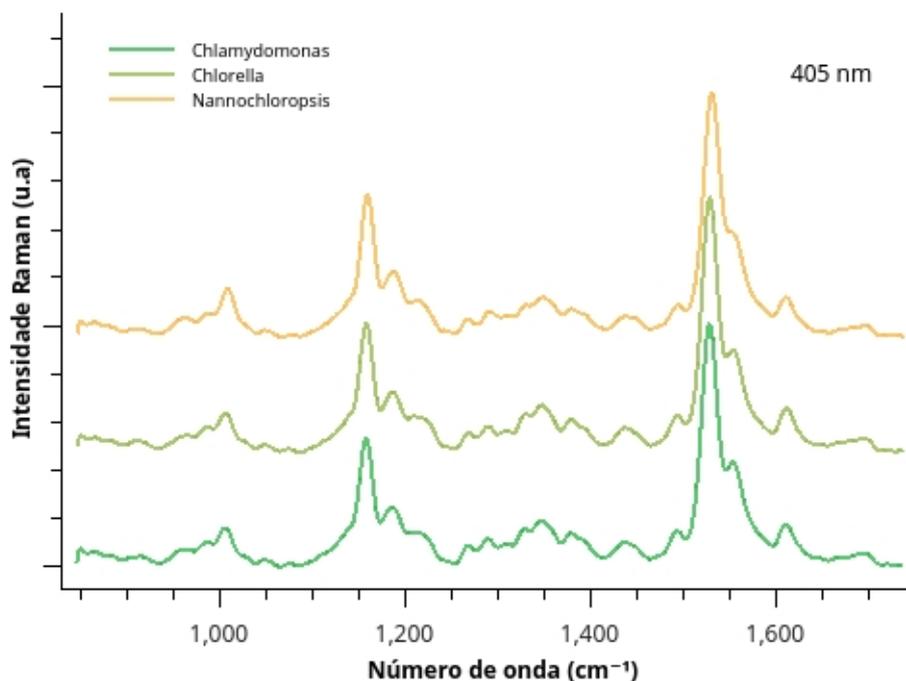


Figura 4.1: Os espectros da três microalgas utilizadas neste trabalho.

reduzir o espaço vetorial dos espectros, de medidas correlacionadas, para poucas componentes não correlacionadas (as principais), o PCA possibilita que segreguemos os grupos de cada alga em nuvens separadas no espaço das componentes principais (confira a seção 2.4), através da construção de um gráfico de clusters. De modo que cada ponto na nuvem está intimamente ligado com um dos espectros adquiridos para aquele tipo de cluster. Os resultados compilados do PCA das três semanas dos experimentos podem ser vistos na figura 4.4, onde cada semana está representada individualmente em (a), (b) e (c) e as três semanas juntas em (d), respectivamente. Prontamente, percebe-se a separação nítida das microalgas em nuvens características de cada espécie. Até este ponto, é suficiente para propósito de identificação das algas utilizar somente o diagrama de clusters do PCA. Porém, vale ressaltar que embora a análise de componentes principais discrimine as amostras, ela não aponta para onde reside as diferenças entre elas. De

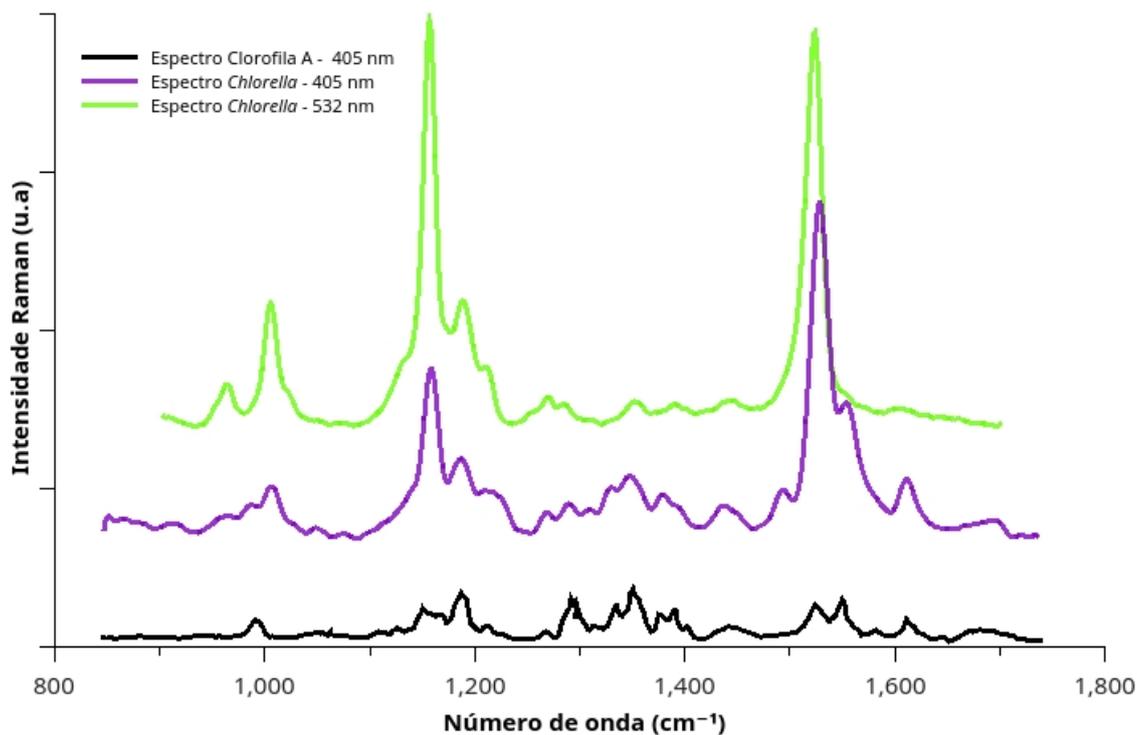


Figura 4.2: Em verde, o espectro da alga CO obtido com o laser de 532 nm. Em violeta, o espectro da CO obtido com a raia de excitação de 405 nm. Também obtido com o laser anterior, em preto tem-se o espectro da clorofila-A, retirado da literatura [91]

modo que uma análise complementar deve ser realizada para elucidar a origem das diferenças levantadas pelo PCA.

Para encontrar estas pequenas diferenças que caracterizam cada cepa, utilizou-se os gráficos de carregamento de pesos (*loading weights* - LW). Tais gráficos são feitos ao associar o score de cada PC (eixo das ordenadas) ao número de onda (eixo das abcissas), como pode ser visto na caixa (i) da figura 4.3. Assim, para cada componente principal, podemos verificar como elas se comportam ao longo de todo espectro. Fazendo isso, percebeu-se que não ocorriam variações significativas dos espectros na posição de $\approx 1326\text{cm}^{-1}$, a região característica por apresentar picos predominantes da clorofila-A, para a PC2. Deste modo, quando uma porção comum aos espectros variam muito pouco entre si, estimadas nesse trabalho com uma ordem de

3%, essa região pode ser usada para a normalização de ambos espectros ou, de modo análogo, usada para comparar razões entre picos, de modo a analisar teores relativos entre regiões e, posteriormente, entre substâncias (como pode ser visto na caixa (iii) da figura 4.3). Esta análise levanta a hipótese de que a clorofila-A não varia significativamente entre as espécies de algas analisadas. E que, a diferença entre as amostras, ao menos quando se trata de pigmentos², ocorre principalmente na concentração de carotenoides.

Assim, para comparar o percentual de carotenoides entre as espécies, a intensidade espectral integrada de cada pico atribuído aos carotenos foi dividida pela intensidade integrada do pico atribuído a clorofila-A, em 1326cm^{-1} , como pode ser visto na caixa (ii) da figura 4.3 como um diagrama de barras para cada pico identificado como sendo uma contribuição dos carotenoides. A média desses resultados foi utilizada para traçar um perfil de teor médio entre carotenoides e clorofila-A e são mostrados como um diagrama de barras na caixa lateral direita da figura 4.3. Assim, após tomar a média sobre as áreas integradas de cada pico individual, podemos inferir que o teor de carotenoides médio, em relação a concentração de clorofila-A, é 42% maior na *Nannochloropsis oceanica* quando comparada com a *Chlorella sorokiniana* e, 37% maior que a *Chlamydomonas sp.*

²Uma atribuição mais detalhada pode ser conferida em [27].

Como pode ser visto em [27], nesta porção de espectro analisada só foram atribuídas contribuições de pigmentos. Embora existam picos característicos de outras substâncias, estas não foram identificadas neste trabalho e na dissertação de [27].

Tabela 4.1: Tabela de atribuições de pigmentos no Raman

Microalgas			Atribuições	Biomoléculas
CA	CO	NN		
1005	1005	1005	$\delta(C - CH_3), \nu(C - C)$	Carotenóides
1158	1158	1158	$\nu(C - C), \delta(CH)$	Carotenóides
1187	1188	1187	$\delta(CH)$	Carotenóides
1326	1326	1326	$\nu(N - C)$	Clorofila A
1525	1525	1525	$\nu(C = C)$	Carotenóides
1555	1555	1554	$\nu(C - C)$	Carotenóides

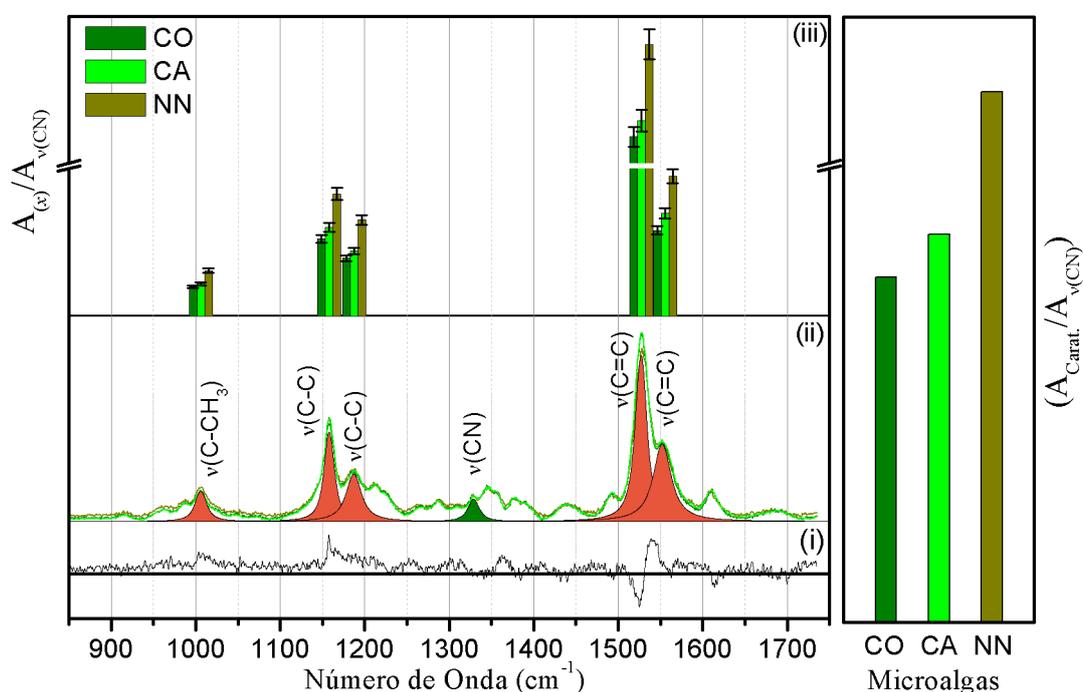


Figura 4.3: Análise da composição e teores de biomoléculas dos espectros da microalgas. Em (I), gráfico de carregamento de pesos (LW). Em (II), vê-se as atribuições por grupos moleculares e o ajuste dos picos por curvas do tipo Pearson-VII. As curvas em laranja são próprias dos carotenoides já as em verde, da clorofila. Em (III), as barras de dos teores entre carotenoides e clorofilas, com as barras de erro, para cada pico dos carotenos identificados. No quadro lateral, a média das barras do quadro (III).

Medidas de absorção de UV-VIS

Em via de corroborar o resultado anterior, obtido com a espectroscopia Raman ressonante, sobre aferição dos teores relativos entre carotenoides e clorofila, foram realizadas uma

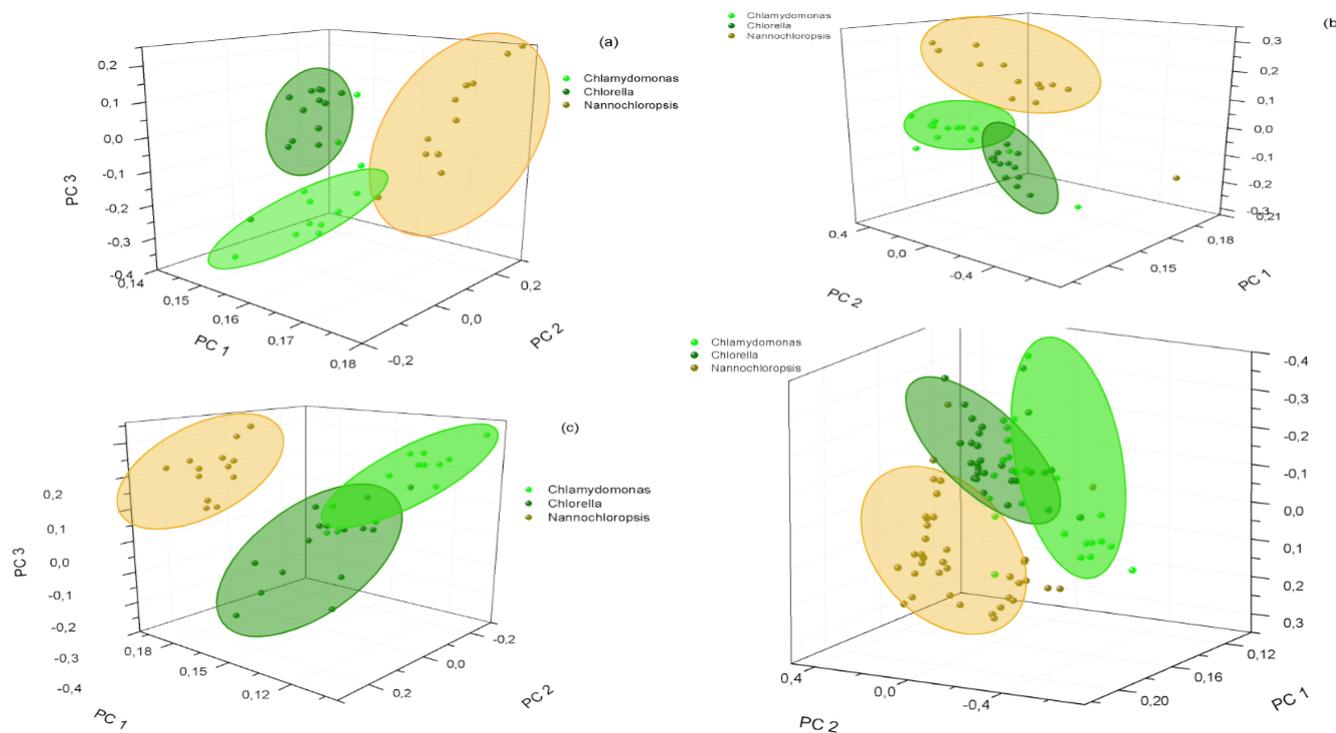


Figura 4.4: Compilado dos resultados para PCA das três semanas. Em (a), (b), (c) e (d) vê-se os resultados da semana 1, semana 2, semana 3 e as três semanas juntas, respectivamente.

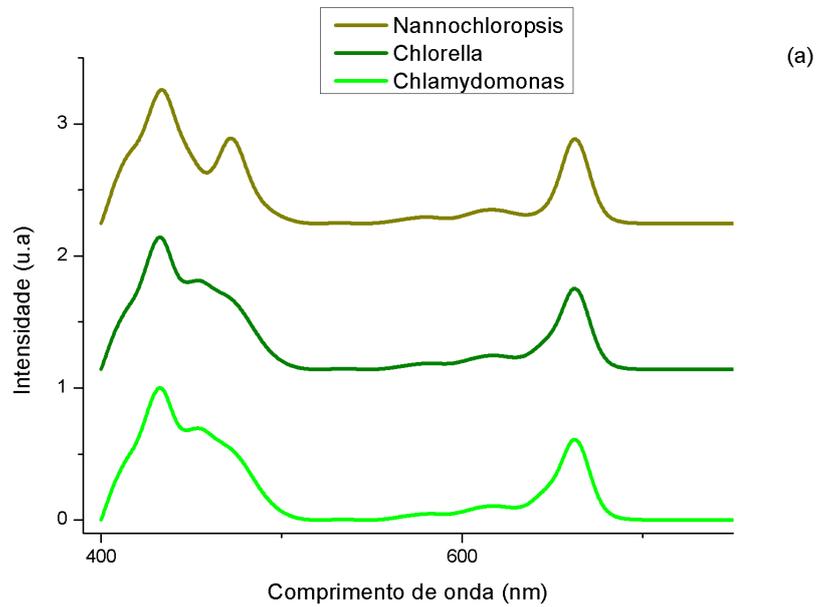
série de medidas de espectroscopia de absorção na região de UV-VIS nos pigmentos extraídos das três microalgas. Para maiores detalhes sobre o processo de preparação, instrumentos e medição, consulte a seção 3.4.

A determinação quantitativa em espectroscopia, geralmente, não é uma tarefa fácil. Cabe ao espectroscopista uma árdua tarefa de como balancear atributos experimentais (tipo de amostra, solvente utilizado, espectrômetro, tipo de cubeta, tempo de exposição e outros) e o tratamento de dados (suavizações, normalização dos espectros, comparação entre amostras, picos analisados e entre outros) afim de obter a relação mais próxima da realidade. Geralmente, os estudos espectroscópicos não são voltadas para as análises quantitativas e, sim, para aferições qualitativas ou semi-quantitativas para comparar amostras de diferentes tipos [25]. Ainda assim,

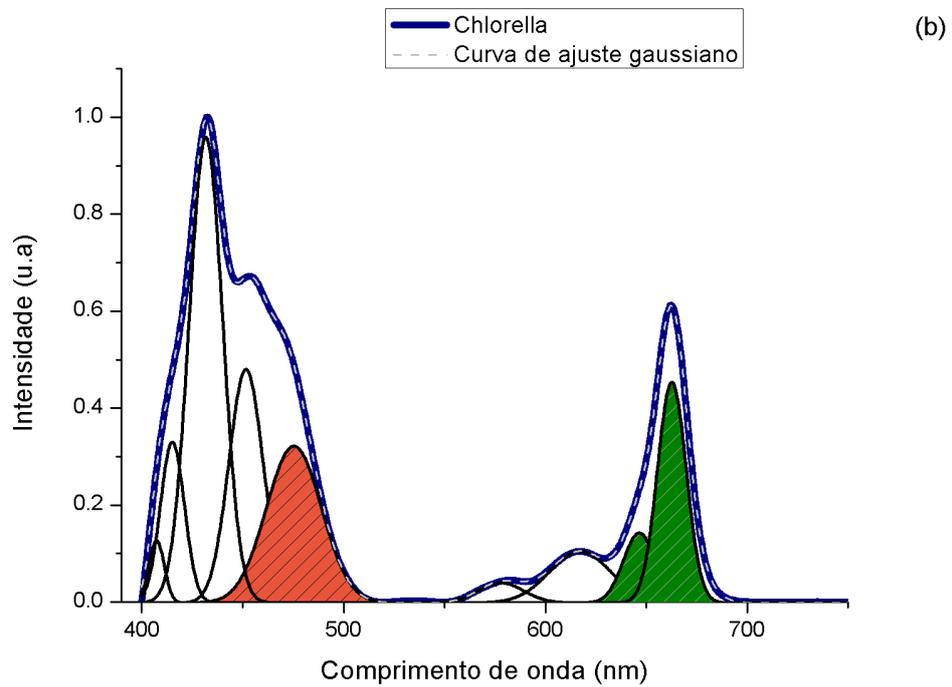
uma série de trabalhos na literatura propuseram diversas equações empíricas para a determinação da concentração de pigmentos, utilizando a absorção na região do UV-VIS, no interior de microalgas [97, 98, 99, 100, 101]. Assim, tomando com base esses trabalhos e usando parte dos procedimentos adotados por [27], foi possível estimar os teores de carotenoides e clorofilas A e B nas três cepas de algas.

Os espectros adquiridos, após o processo de extração de pigmentos, passaram por uma remoção de linha de base e então normalizados com relação a intensidade da banda de 432 nm e podem ser conferidos na figura 4.5 (a). Observa-se de imediato, que as algas CA e CO apresentam um perfil espectral muito semelhante entre si, o que não ocorre quando comparadas com o espectro da alga NN. Isso se deve ao fato de que o gênero *Nannochloropsis* não possui clorofila do tipo B [99], responsável pela absorção nas regiões 454 e 640 nm do espectro visível [102], e do tipo C. Além de uma alta concentração de astaxantinas, zeaxantinas e cantaxantinas [103]. De fato, os carotenoides apresentam uma contribuição significativa na região que compreende entre os 400 até 520 nm do espectro visível [104]. O que explica a formação de um pronunciado apêndice em 450-480 nm no espectro da NN.

Com o objetivo de estimar o teor relativo entre carotenoides e clorofilas, utilizamos a análise das áreas integradas das gaussianas que compõem o espectro de cada cepa. Isto é feito fazendo a razão entre as áreas das curvas identificadas para cada biomolécula. Um exemplo de como é feito o processo pode ser visto na caixa (ii) da figura 4.3. Como pode ser visto na figura 4.5 (b), a curva com um sombreado alaranjado é atribuída aos carotenoides, já as gaussianas com um sombreado verde são a contribuições das clorofilas. Resultados similares foram obtidos para as demais algas (não mostrados) e levando em conta que a NN não apresenta uma curva que



(a)



(b)

Figura 4.5: Em (a), espectros de UV-VIS das três microalgas utilizadas neste trabalho. Ambas normalizadas pelo pico em 432 nm . Em (b), espectro da alga CO decomposto em pacotes de gaussianas. Em laranja, a curva que caracteriza a presença de carotenoides na amostra. Em verde, curvas características da clorofila.

Tabela 4.2: Tabela de teores do UV-VIS e Raman

Amostras	UV-VIS	Raman
<i>Chlamydomonas sp.</i>	0.31	0.31
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0.35	0.32
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	0.48	0.44

contribua para a clorofila-B. A relação obtida para cada microalga, e a comparação com o teor obtido para a espectroscopia Raman, podem ser conferida na tabela 4.2. Quando comparados com os resultados obtido com o Raman, os teores encontrados são bastante próximos entre si. De modo que ambas as técnicas podem ser utilizadas para a aferição rápida da presença das substâncias nas microalgas de maneira razoavelmente equivalente. De modo que, isso constitui um ponto positivo para a espectroscopia Raman por se tratar, de quando utilizada como neste trabalho, de uma técnica de aquisição mais rápida de dados e não exigir insumos para sua aquisição, como acontece para a análise de UV-VIS aqui feita.

Medidas de FTIR

Assim como no Raman, a espectroscopia de infravermelho é uma técnica capaz de analisar as vibrações características de grupos moleculares e, por consequência, investigar a composição de macromoléculas que constituem um ser vivo. Tal qual como na espectroscopia Raman [93], um espectro pode ser decomposto em picos característicos de grupos moleculares. De modo que, o espectro final é uma combinação linear na base dos principais grupos de moléculas. Porém, além das diferenças conceituais entre os fenômenos de absorção de infravermelho e o efeito Raman, as diferentes ordens da energia de excitação incidente geram respostas espectroscópicas distintas. Assim, mesmo que analisemos o mesmo intervalo espectral, obte-

remos espectros distintos. De tal modo que, o FTIR apresenta uma ótima resposta de grupos moleculares posteriormente identificados como carboidratos, lipídeos e proteínas, como pode ser visto na figura 4.6. Na figura, após a suavização e normalização pela área integrada do pico, identificado como sendo pertencente a amida 1, podemos observar os espectros médios obtidos ao longo de uma semana de cultivo das três microalgas utilizadas neste trabalho. A predominância de contornos característicos das três macromoléculas supracitadas nesta seção faz com que a análise de FTIR seja uma ótima ferramenta para o estudo da dinâmica destes grupos moleculares no interior de microalgas. Nesta seção, foi empregado o uso da técnica de FTIR para diferenciação e caracterização das microalgas. Tal processo funcionou como um balão de ensaio para a realização dos trabalhos posteriores supracitados.

Os espectros presentes na figura 4.6 são dominados por dois forte picos em torno de 1540 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} (em vermelho). Estas porções são marcadas por serem uma combinação de estiramentos dos grupos C=O e C-N e uma deformação da ligação N-H. Os lipídeos são responsáveis por fortes picos entre 2850 e 3000 cm^{-1} , esses picos são oriundos de estiramentos dos grupos CH_2 e CH_3 . Além de uma pequena contribuição em 1740 cm^{-1} devido a vibrações C=O do grupo éster carbonil. Na figura, os lipídeos são representados por um sombreado amarelo. Por fim, os carboidratos (em laranja) contribuem com uma enorme porção entre 950 - 1200 cm^{-1} , regiões características do grupo e de fosfolipídeos. Esses picos foram atribuídos com base no banco de dados [105]. Assim como foi feito para os pigmentos, uma tabela de atribuições pode ser encontrada em [27].

Assim como foi feito com os espectro adquiridos no Raman, os espectros de FTIR são bastante semelhantes entre si. Deste modo, utilizou-se da análise de PCA para determinar se há

Espectros de FTIR das três microalgas utilizadas

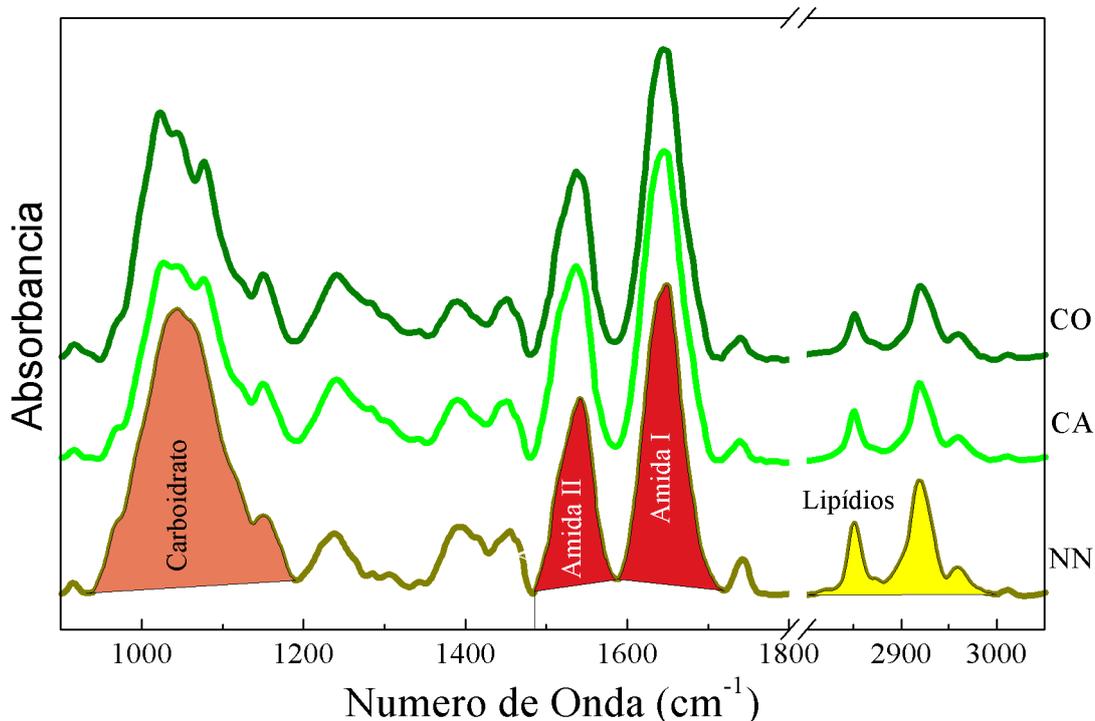


Figura 4.6: Espectro de FTIR das três algas. As biomolécula que mais se destacam estão assinaladas nas seguintes cores: laranja - carboidratos, vermelho - proteínas (amida I e amida II) e amarelo - lipídios.

diferenças significativas entre as cepas, de modo que a técnica de FTIR possa ser utilizada para diferenciar as espécies com base na distribuição dos grupos moleculares identificados. Como pode ser vistos na figura 4.7, cujo os dados se referem à primeira semana de aquisição, existe uma expressiva diferenciação entre as microalgas. Diferença essa mais nítida que a encontrada pelo Raman, embora apresente uma distribuição de clusters análoga. Conclui-se por [27] que embora possam ser diferenciadas pelo seu percentual do teor relativo de pigmentos, essa diferenciação é muito mais evidente entre as amostras quando lidamos com os percentuais³ de carboidratos, lipídeos e proteínas. Os resultados indicam a possibilidade do uso da técnica de FTIR como ferramenta de fácil e rápido uso no estudo de microalgas. Para propósito de com-

pleteza, o autor indica a leitura de [27]⁴. Lá, utilizou-se juntamente com o FTIR, a técnica de separação gravimétrica para estudos do percentual de lipídeos no interior das algas. Assim como, o mesmo tipo de análise para a aferição dos teores relativos entre a amida I e os carboidratos.

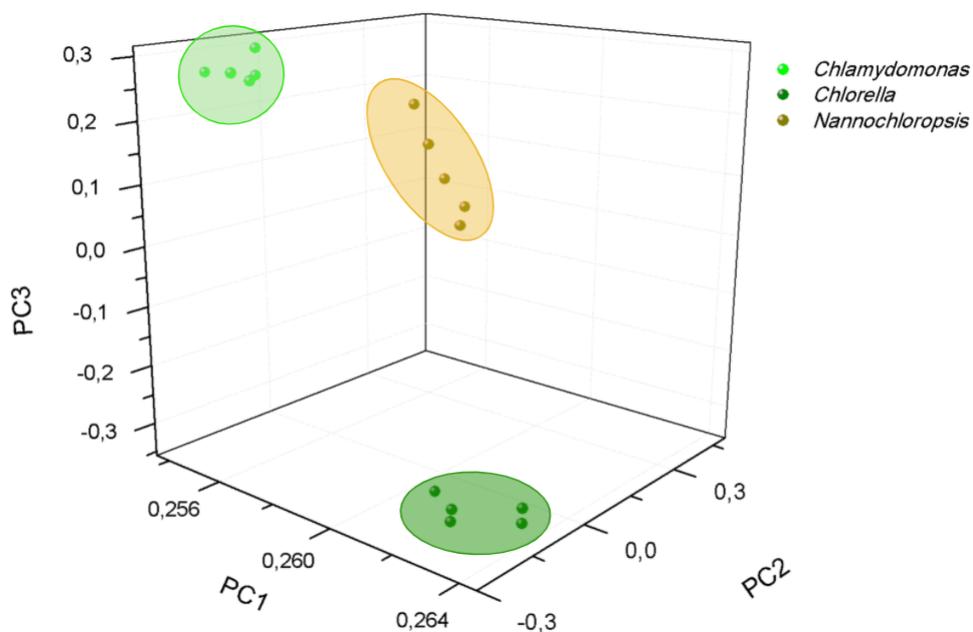


Figura 4.7: Gráfico de clusters dos espectros obtidos por FTIR.

⁴Embora neste trabalho não temos feito uma análise aprofundada sobre a caracterização das microalgas pelos seus percentuais dos teores de carboidratos, lipídeos e proteínas, esta análise foi feita em detalhes, e com uma prova real pelo método gravimétrico de separação de lipídeos, em [27]

⁴A metodologia e os dados obtidos, até este ponto, neste trabalho e os presentes em [27] foram obtidos em conjunto entre os autores. Ambos os trabalhos ocorreram em parceria entre autores, orientadores e laboratórios. Deste ponto em diante, o presente trabalho se distancia e dá continuidade ao que foi iniciado em [27].

4.2 Segunda etapa

Microreatores e a dinâmica de crescimento das microalgas

Nesta seção são abordados os resultados das curvas de crescimento de cada reator de acordo com os dois experimentos realizados, os estudos dos efeitos da disponibilidade de alimento e a potência luminosa entregue às algas. Aqui, com base nos dados coletados ao longo do estudo, descobriu-se informações sobre a otimização e economia de energia para o cultivo das algas do gênero *Chlamydomonas*. Informações estas que fornecem um ótimo guia para a produção de microalgas e a utilização de recursos energéticos, em termos de planejamento de projeto, em empreendimentos de níveis industriais e comerciais.

Os resultados das leituras do reatores realizados ao longo desta etapa podem ser conferidos ao longo da figura 4.8. Em (a) vê-se o aumento gradativo da concentração de células, alternado entre os períodos de claro e escuro (janelas brancas e cinzas, respectivamente) de crescimento efetivo e estabilização do número de indivíduos. É possível perceber que o padrão de leque com espaçamentos proporcionais entre as curvas de cada reator somem a partir da curva de 25 W.m^{-2} , de modo que deste ponto em diante, há uma sobreposição das curvas de crescimento. Em uma análise complementar, no quadro (c), construiu-se o perfil de crescimento de cada reator com base na derivada da densidade de algas de cada um deles, ou seja, a taxa de crescimento de cada reator, em função da irradiância. Assim, a interrupção do padrão de leque da figura (a) revela que a partir do ponto que fornecemos mais energia na forma de luz a cultura deixa de utilizar esta energia disponível para o aumento da taxa de crescimento da cultura, e rumo assintoticamente para um limite da velocidade de crescimento. Em termos de produção de

microalgas para fins comerciais, conclui-se que fornecer doses de luz acima de $25W.m^{-2}$ não altera significativamente a velocidade de crescimento das algas do gênero *Chlamydomonas*.

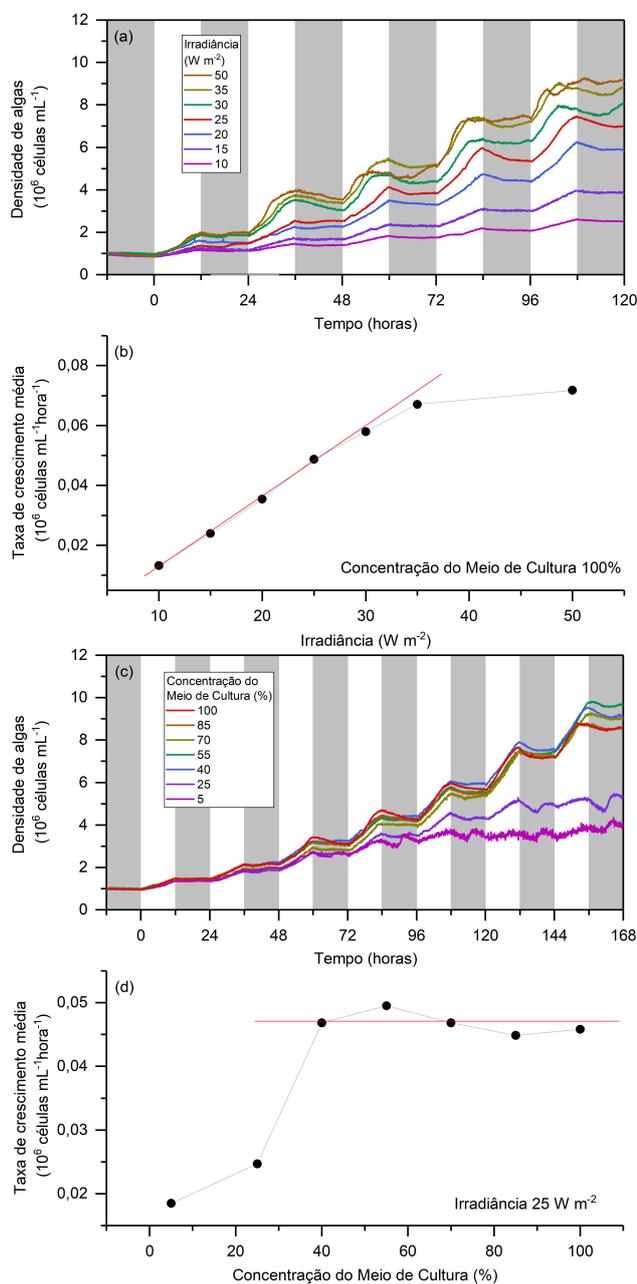


Figura 4.8: Curvas de crescimento dos reatores. Nos painéis (a) e (c), têm-se as curvas de crescimento da alga *Chlamydomonas sp* em termos da densidade de células (eixo y) ao longo do tempo, em horas (eixo x), para os experimentos sobre a potência luminosa entregue [$W.m^{-2}$] e a disponibilidade de alimento [%], respectivamente. Nos painéis (b) e (d), estão as curvas da taxa de crescimento das algas pela irradiância e concentração de meio de cultura, respectivamente.

Sabendo disso, na rodada de experimentos sobre a influência da disponibilidade de BG11 para as microalgas, configurou-se que todos os reatores estariam sujeitos a mesma intensidade luminosa de $25W.m^{-2}$. Os resultados de rodada de experimentos podem ser vistos nas colunas (b) e (d) da figura 4.8. De maneira análoga, porém muito mais imediata, há um comportamento assintótico para os reatores com uma concentração de a partir de 40% de concentração de nutrientes. De maneira complementar, seguindo o procedimento utilizado nos quadros (a) e (c), construiu-se o gráfico da taxa de crescimento das algas em função da concentração de BG11. Agora, vê-se que há um abrupto crescimento assintótico dos reatores em função da varredura da concentração de nutrientes. Em termos da produção de microalgas do gênero CA, é financeiramente interessante obter estes resultados já que boa parte do custo de produção de bio-derivados oriundos de microalgas está embutido na produção dos meios de cultura. Assim, obter a mesma taxa de crescimento de algas utilizando apenas 40% da concentração de meio necessário é uma ótima notícia para futuros investimentos na cultivo de algas para fins industriais e comerciais.

4.3 Terceira etapa

Aclimação das cepas e a carotenogênese

Nesta etapa, foram desenvolvidas as atividades experimentais que dão nome a este trabalho. Aqui, com base em tudo que foi desenvolvido ao longo deste processo de formação, aplicou-se as técnicas, tratamentos de dados e procedimentos de análise para entender como modificações nos processos de cultivos, no caso a potência luminosa e a disponibilidade de

nutrientes do meio de cultura, alteram a configuração interna de algumas macromoléculas e pigmentos no interior das microalgas⁵.

Primeiramente abordou-se a resposta Raman dos efeitos das alterações da potência luminosa entregue e a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo. Para tal, usou-se dos procedimentos anteriormente desenvolvidos na seção 4.1. Em seguida, tal qual os procedimentos aprendidos na seção 4.1, estudou-se os efeitos das modificações de cultivos com relação a alteração do perfil espectroscópico e, por consequência, a alteração dos perfis de teores relativos dos reatores. Por fim, na terceira etapa investigou-se os efeitos na dinâmica de proteínas, carboidratos e lípidios, pela espectroscopia de FTIR, oriundos das alterações de luz e alimentos disponíveis no cultivo das algas.

A escolha da *Chlamydomonas* se deve ao fato de que, durante as investigações preliminares sobre os efeitos da escassez de nutrientes nas microalgas, constatou-se que esta variedade de alga apresentou uma resposta muito mais intensa que as demais. Tal resposta, se apresentou como um radical amarelamento do cultivo quando comparada com as demais cepas que, quando sujeitas a inspeção visual, se mantiveram inalteradas. Este amarelamento pode ser visto por intermédio da espectroscopia de absorção de UV-VIS por meio da figura 4.9. Na figura, temos os espectros de UV-VIS de dois cultivos da alga CA em diferentes condições ambientais. Um grupo controle com uma condição padrão de nutrientes, a curva em preto, e em vermelho temos

⁵Aqui é apresentado uma pequena série de experimentos que, por conta do período da epidemia de 2020, se tornou bastante enxuto em sua execução. A intenção do autor e de seus orientadores era de que a natureza profunda da dinâmica das biomoléculas presentes nas algas fosse mais amplamente explorada com uma série maior de experimentos, mais diversos e cirúrgicos em sua execução. Embora tais experimentos não tenham sido executados, o autor reconhece que não há qualquer dúvida quanto a possibilidade de que este tema possa ser melhor explorado pelo grupo de pesquisa dos orientadores, visto que estes dispõem de ótimos equipamentos e pessoal adequado para o trabalho.

um cultivo com uma carência de nutrientes, cerca de 10% do grupo controle. Ambas as curvas foram normalizadas pela área visto que não era sabido como diferentes cultivos iriam alterar os teores relativos entre carotenoides e clorofilas das cepas e como tal alteração iria modificar os espectros de UV-VIS. Embora as curvas se apresentem fora de escalas quando comparadas umas com as outras, a mudança no perfil espectroscópico na porção 400 e 500 nm é notável. Tal diferença expressiva é creditada ao aumento do teor relativo de pigmentos, carotenoides e clorofilas, que é marcado pelo visível amarelamento do cultivo com apenas 10% de nutrientes disponíveis. Embora a alteração da disponibilidade de nutrientes tenha alterado significativamente a coloração das cepas de CA, o mesmo não ocorreu para as cepas de CO e NN sob inspeção visual. Deste modo, adotamos a alga CA como principal objeto de estudo de agora em diante.

Análise de espectroscopia Raman

Na figura 4.10 vemos, os resultados dos experimentos Raman para os estudos da influência da potência luminosa entregue e a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Nela, na primeira coluna (quadros a e c), estão os espectros médios adquiridos de cada reator, relacionados com sua intensidade de luz e a concentração de nutrientes disponíveis, relacionadas por meio da legenda de cores no canto superior esquerdo de cada gráfico. Já na segunda coluna (quadros b e d) estão as médias totais dos teores relativos entre carotenóides e clorofilas, como feito anteriormente em 4.1, figura 4.3. Nos quadros (b) e (d), as barras de erros foram estimadas com base na propagação de erros com base no erro característico de cada cada pico, fornecida pelo programa de ajuste de curvas. No quadro (b) da figura 4.10 não há qualquer pa-

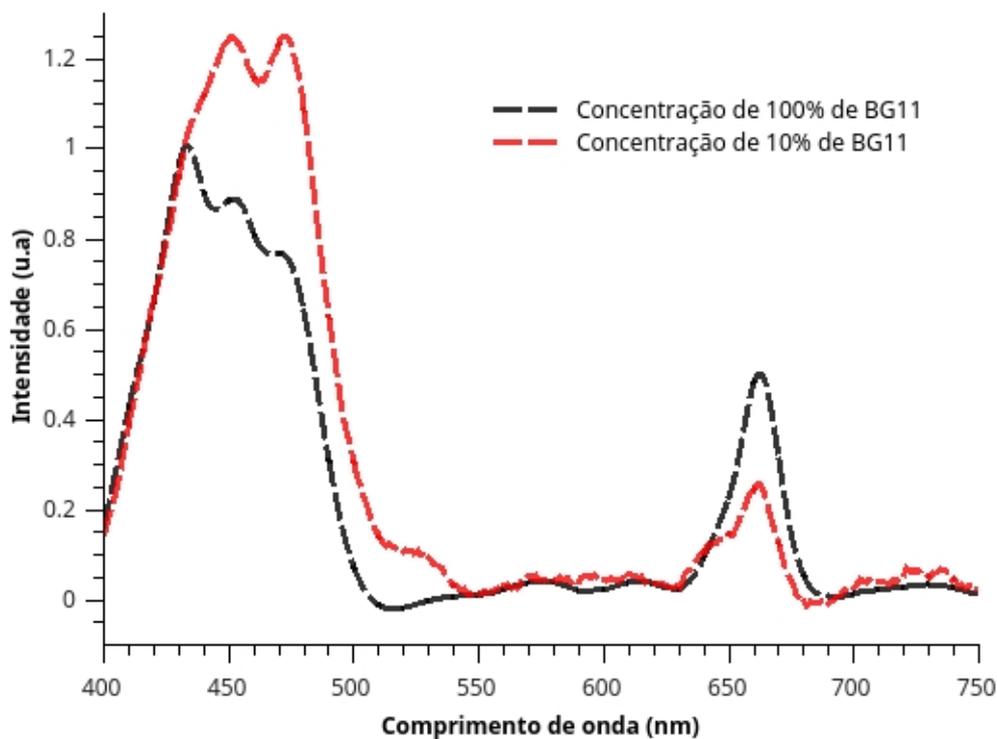


Figura 4.9: Espectros de absorção de UV-VIS para alga *Chlamydomonas sp.* Em preto, vemos o espectro de uma cultura padrão (meio com 100% de concentração) usada como controle. Em vermelho, vê-se a assinatura espectroscópica de um reator com apenas 10% de concentração de meio de cultura. É notório a predominância da banda típica dos carotenóides em aproximadamente 480 nm.

drão aparente de comportamento entre o efeito da potência luminosa entregue e a resposta das algas. De modo que, até mesmo uma interpolação dos dados por uma média (uma constante) não gera um ajuste razoável entre os dados. Quando se trata da influência da disponibilidade de nutrientes há, de maneira grosseira, um comportamento levemente crescente na relação entre a resposta dos teores e a disponibilidade de alimento nos reatores. Porém, o ajuste não é de todo satisfatório com $R^2 \approx 0,53$ (não mostrado neste trabalho). Sendo assim, é razoável concluir que para o período de síntese de uma semana das amostras, a técnica de análise de teores relativos não foi suficiente para evidenciar qualquer padrão.

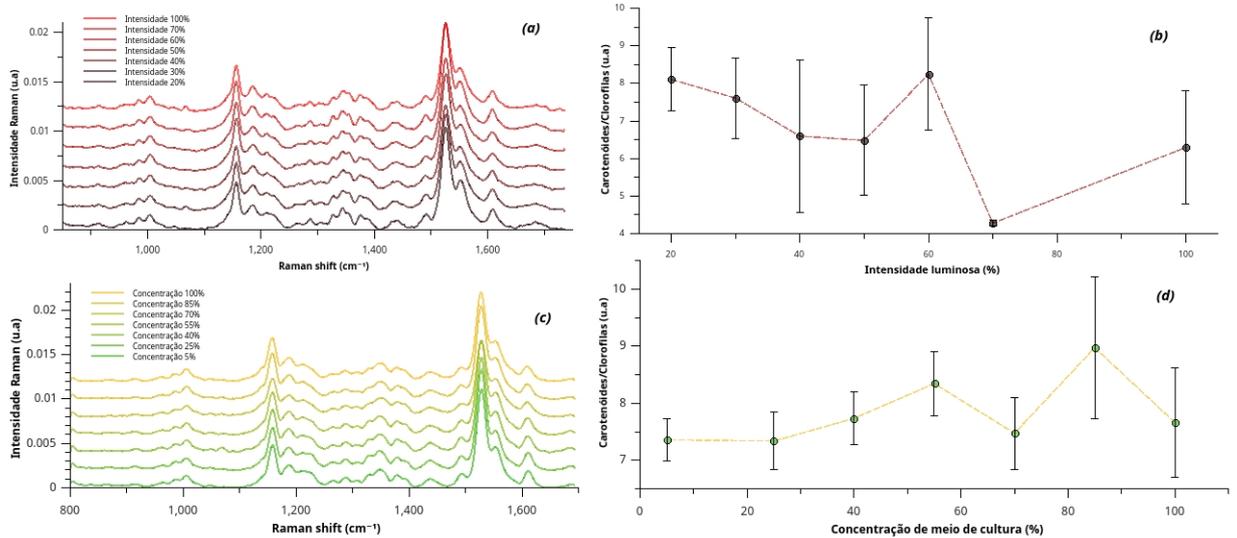


Figura 4.10: Resultados dos experimentos Raman para os estudos da influência da potência luminosa entregue e a disponibilidade de nutrientes no meio de cultura. Na primeira coluna (quadros a e c), estão os espectros médios adquiridos de cada reator, relacionados com sua intensidade de luz e de nutrientes por meio da legenda de cores no canto superior esquerdo de cada gráfico. Já na segunda coluna (quadros b e d) estão as médias totais dos teores relativos entre carotenóides e clorofilas.

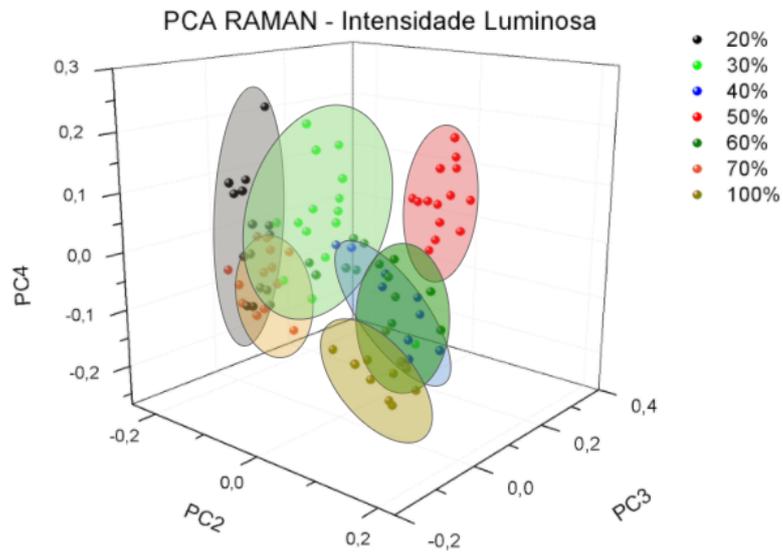
Seguindo a metodologia utilizada anteriormente empregada, pelo PCA de ambos os experimentos, na figura 4.11, vemos que há uma separação dos clusters de cada reator. Porém, na figura 4.11 (a), ao contrário das separações nítidas previamente encontradas para o PCA das três algas utilizadas, agora não há uma separação esparsa. Isso é um indicativo de que há uma ineficácia da técnica empregada, sob as condições de cultivo deste experimento. Já na figura 4.11 (b), percebe-se também ocorre sobreposições do clusters. Mas, ao contrário da figura (a), há uma sutil separação entre as nuvens de dados. Representada pela linha tracejada em vermelho, há uma interface de separação entre dois aglomerados de clusters do tipo "tudo ou nada". Isso indica que ocorre um diferenciação sensível à técnica apenas a partir de um patamar. Conjuntamente com a curva presente em 4.10 (d), essa informação aponta para a possibilidade de que, sob os efeitos do cultivo de diferentes concentrações de meio BG11, haja uma ação

sensível deste experimento no perfil de teores de carotenóides e clorofilas. Para que de fato se verifique que as diferenças apontadas são estatisticamente relevantes buscou-se por alguma ferramenta de análise, neste caso a análise das variâncias (ANOVA). Utilizando a técnica de ANOVA e, complementarmente, o teste de pareamento de Tukey (ver 2.5) constatou-se que, de fato, há diferenças entre as amostras como pode ser visto nas figuras 4.12 e 4.13.

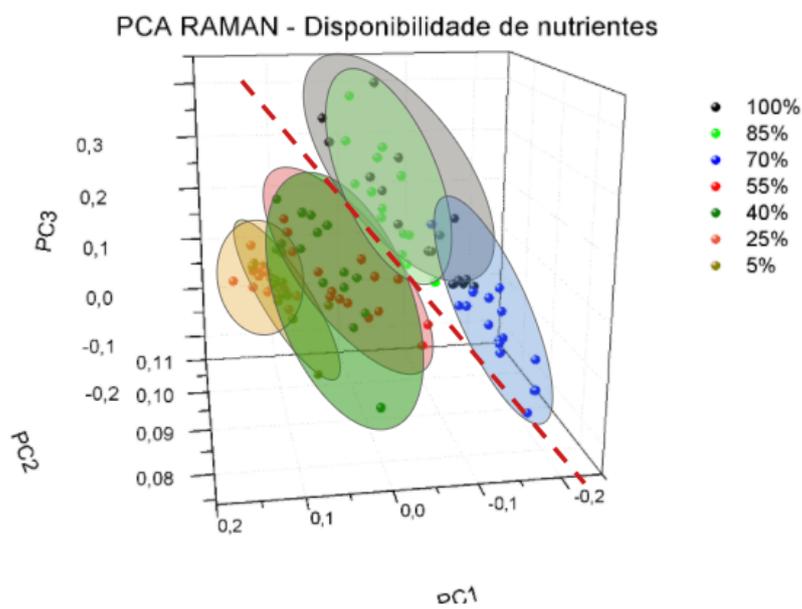
Como pode ser visto na figura 4.12, percebe-se que embora haja diferenças estatisticamente significantes entre as amostras, suficientes para a separação entre grupos dos reatores, não há qualquer padrão aparente entre as amostras. De modo que a análise por ANOVA sobre os efeitos da potência luminosa sobre a dinâmica de produção de nutrientes no interior de algas, se mostra ineficaz. Quando aplicada ao estudo da concentração de nutrientes, percebe-se que, agora na figura 4.13, a ANOVA revela que em todos os picos selecionados para análise, na concentração de 70% há um declínio dos teores. Um comportamento análogo ao encontrado na figura 4.10 (d). Este comportamento aponta novamente para uma provável maior sensibilidade da técnica Raman, sob as condições de realização destes experimentos, a detecção de mudanças no interior das algas oriundas a disponibilidade de nutrientes. Isto aponta que, em termos da produção de pigmentos, o cultivo com diferentes concentrações de alimento são mais impactantes nesta dinâmica.

Análise de UV-VIS

Os resultados da análise de UV-VIS para a aferição dos teores de carotenóides e clorofilas pode ser visto na figura 4.14. Na primeira coluna, quadros (a) e (c), vemos os gráficos em cascata do efeito da intensidade luminosa e concentração de BG11, respectivamente, na pro-

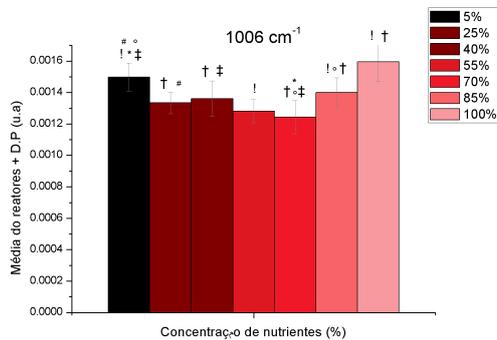


(a)

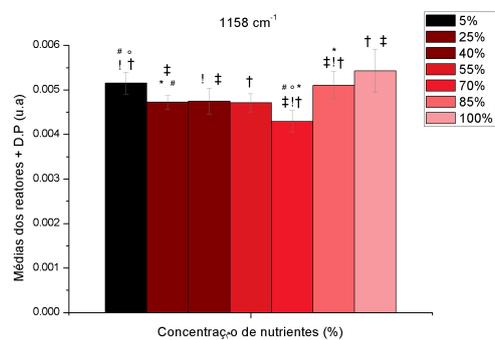


(b)

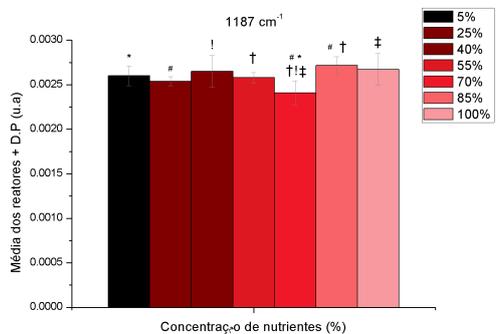
Figura 4.11: Resultado do PCA para os dois experimentos realizados. Em (a) temos PCA-Raman da potência luminosa. Em (b) temos PCA-Raman da concentração de nutrientes.



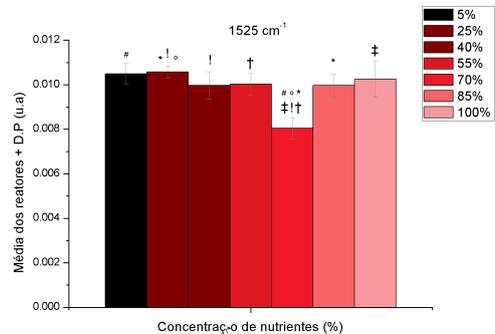
(a)



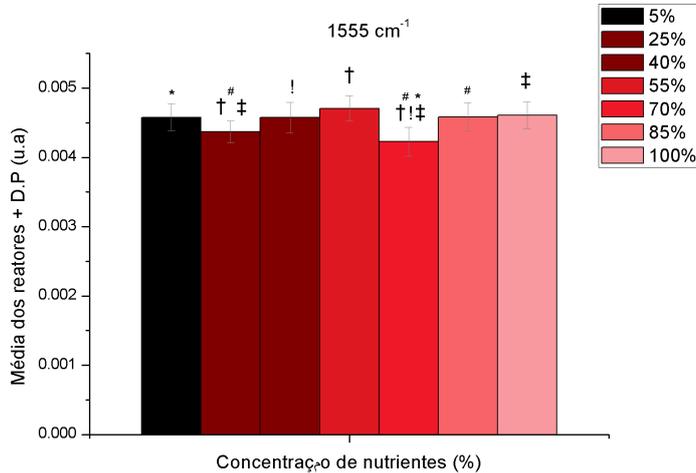
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.13: Disponibilidade de nutrientes - Média da intensidade espectral de cada reator nos picos: (a) 1006cm^{-1} , (b) 1158cm^{-1} , (c) 1187cm^{-1} , (d) 1525cm^{-1} e (e) 1555cm^{-1} . Os símbolos acima das barras indicam se há uma diferença estatística entre as barras. Barras com o mesmo símbolo são diferentes entre si.

dução de pigmentos. Dando prosseguimento a análise, agora com base nos métodos utilizados anteriormente em 3.4, nos quadros (b) e (d) temos o perfil UV-VIS dos teores entre carotenóides e clorofilas.

No quadro (a) é possível perceber que há um progressivo, embora sutil, alargamento da banda entre 450 e 500 nm. Esta região, como visto em 4.1, é característica da presença de carotenóides. Isso se reflete no quadro (b) como uma crescente tendência na leitura dos teores, embora não seja possível interpola-los com uma reta razoável, isto é: com um R^2 satisfatório. Já no quadro (c) não vemos uma mudança significativa entre os espectros, com a exceção do espectro de 25% que apresenta mais flutuações em sua leitura. Estas flutuações são a provável causa do alto valor, e sua grande barra de erro, encontrado no gráfico no quadro (c). Com a exceção do já citado reator com uma concentração de 25% de BG11, em (c) não há qualquer padrão da dinâmica dos reatores.

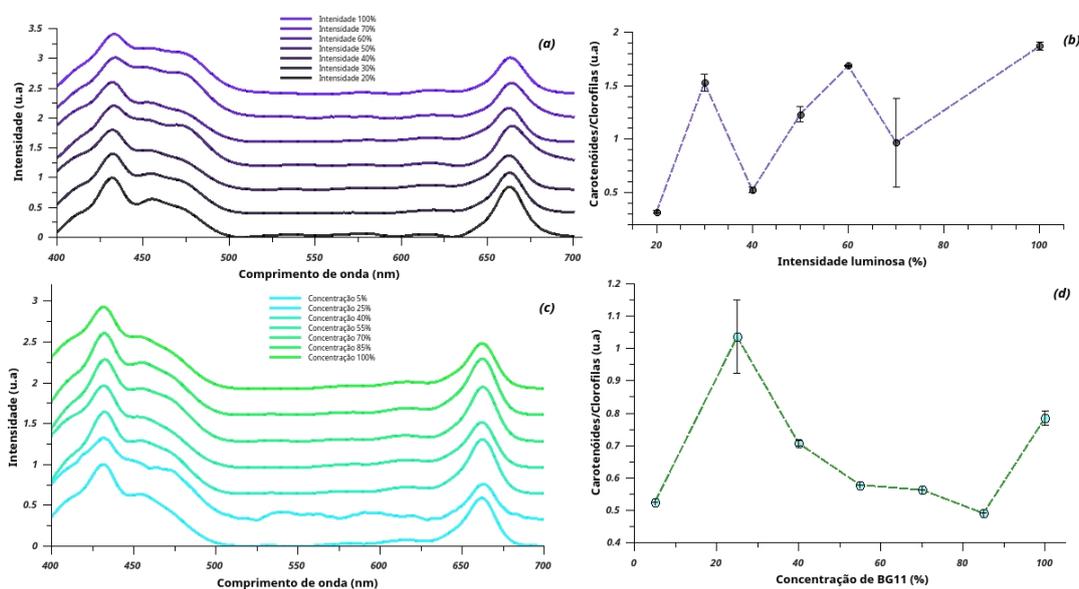
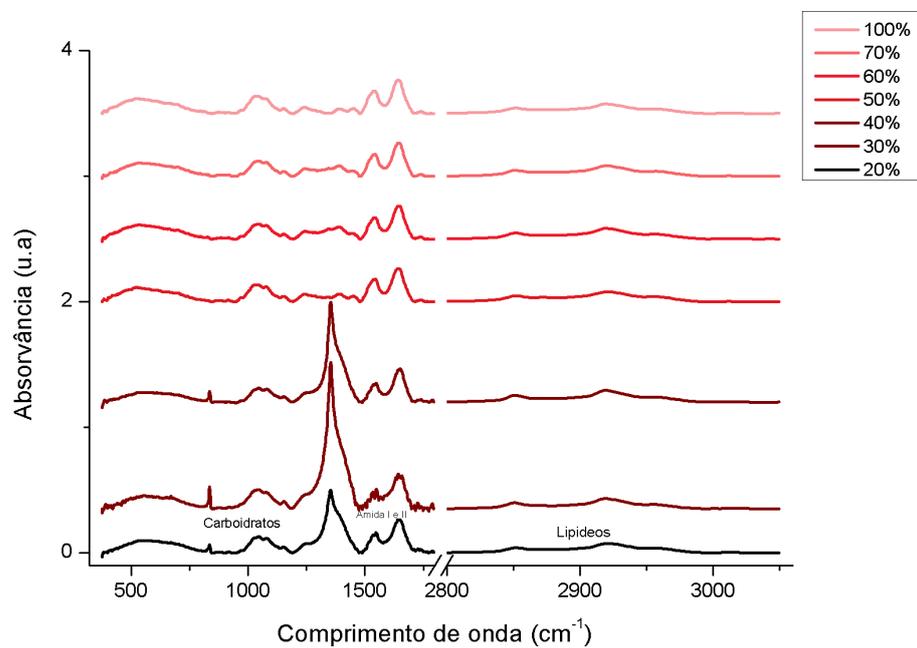


Figura 4.14: Compilado dos resultados das medidas de UV-VIS. Na primeira coluna, quadros (a) e (c), vemos os gráficos em cascata do efeito da intensidade luminosa e concentração de BG11, respectivamente, na produção de pigmentos. Em (b) e (d) temos o perfil UV-VIS dos teores entre carotenóides e clorofilas.

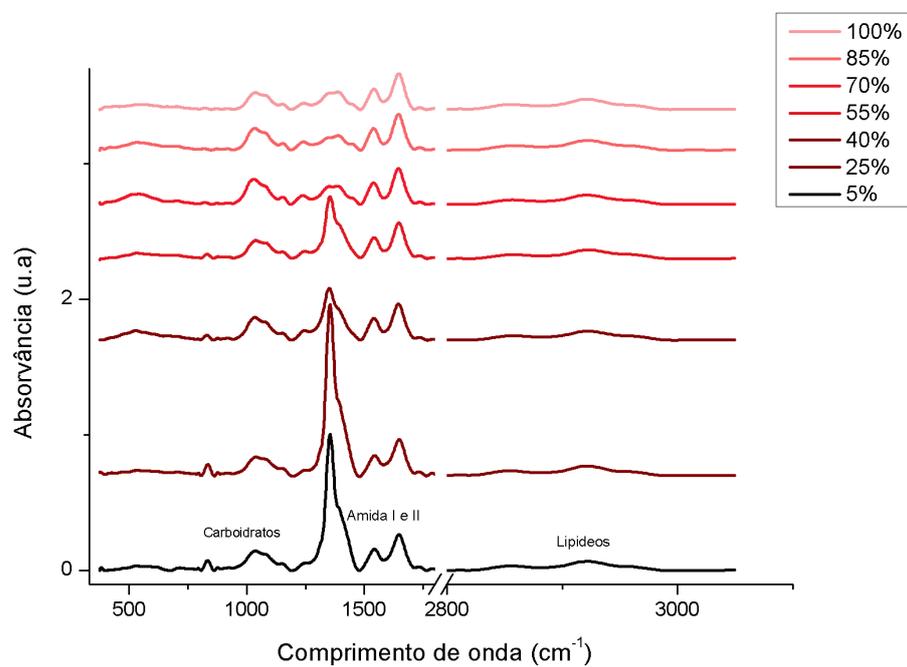
Análise de FTIR

Os resultados da aquisição de FTIR para os experimentos sobre o efeito da iluminação e da disponibilidade de meio nutritivo podem ser vistos na figura 4.15. Em (a) vemos que em reatores com uma intensidade menor que 50% apresentam um pronunciado crescimento do porção espectral de $\approx 1350\text{cm}^{-1}$. Região esta característica de vibrações moleculares do tipo *bending* de lipídeos e proteínas ($\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_2)$), como pode ser visto em [27]. E também o aparecimento de um pico, sem qualquer atribuição conhecida pelo autor, em aproximadamente 900cm^{-1} . Analogamente, no quadro (b), percebe-se que para reatores com concentrações de nutrientes inferiores a 70% também são marcadas pelo crescimento exacerbado do pico em 1350cm^{-1} e, também, há o aparecimento do pico em 900cm^{-1} porém, muito mais difuso que a contraparte encontrada no experimento sobre a iluminação.

Como de praxe, os resultados encontrados pelo PCA podem ser conferidos na figura 4.16. No quadro (a) nota-se que os reatores se dividem em agrupamentos pontuais e bem separados entre si, com as exceções dos reatores com 20% e 50% de potência luminosa. No quadro (b) é possível ver que embora haja notáveis separações entre as amostras, elas não são tão pontuais e distantes entre si. Isso leva a formulação da hipótese de que, embora o PCA funcione bem em todos os dois tipos de experimentos, há uma sensibilidade maior da técnica de FTIR aos efeitos causados pela dinâmica de interação entre bio-moléculas e a intensidade luminosa entregue, em relação a concentração de meio de cultura. Essa relação é a oposta a encontrada pela técnica Raman.

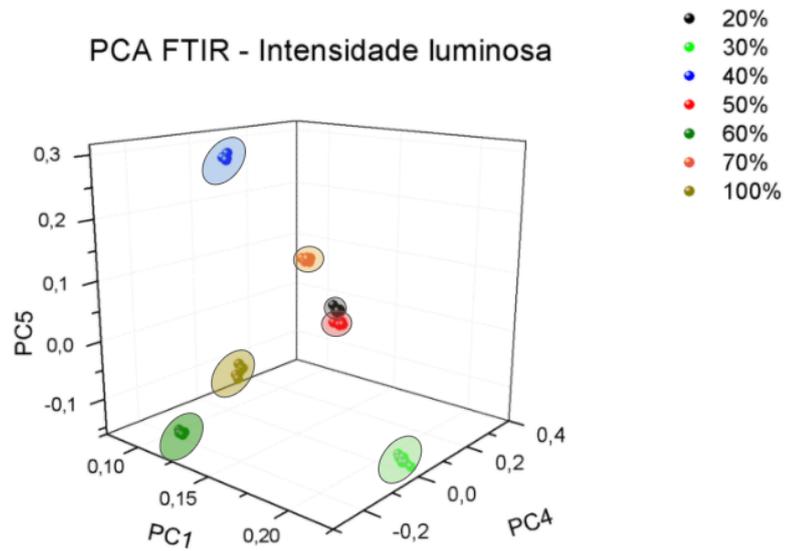


(a)

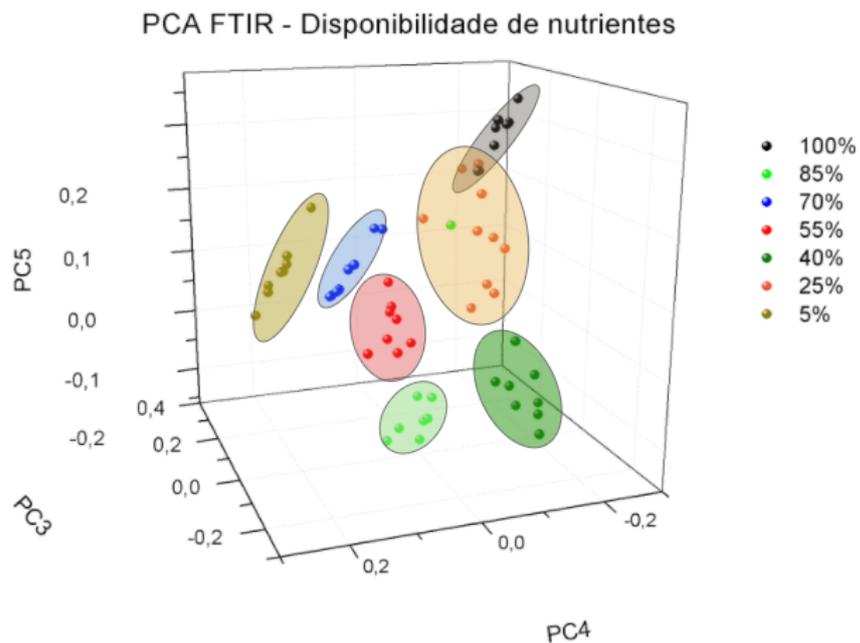


(b)

Figura 4.15: Compilado dos resultados da espectroscopia de FTIR para os experimentos sobre o efeito da potência luminosa entregue e da disponibilidade de meio nutritivo em (a) e (b), respectivamente.



(a)



(b)

Figura 4.16: Compilado dos resultados do PCA aplicado aos dados de FTIR para os experimentos sobre o efeito da potência luminosa entregue e da disponibilidade de meio nutritivo em (a) e (b), respectivamente.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste capítulo estão sumarizadas as conclusões que tangem a este trabalho. Na primeira etapa, disserta-se sobre a eficiência dos métodos espectroscópicos para a identificação e caracterização das microalgas. Na segunda etapa, discute-se sobre a eficácia dos métodos para o estudo de aclimação da alga *Chlamydomonas sp* no interior de bioreatores automatizados. Por fim, na última etapa, alguns pontos não cobertos neste trabalho são abordados e seguem com guias para trabalhos futuros.

5.1 Primeira etapa

Com base na figuras 4.1 e 4.2, têm-se que os espectros Raman obtidos são visualmente idênticos e dominados pela presença de pigmentos, corotenóides e clorofila. Tais espectros são marcados por picos bem delimitados característicos das substâncias supracitadas. Isso se deve

ao fato de que o laser utilizado é ressoante com os modos vibracionais da clorofila e a massiva presença de carotenóides nas algas.

Para diferenciar as algas, já que seus espectros são muitíssimos semelhantes, com base na presença dos pigmentos assinalados, usou-se o PCA para diferenciação e a criação de um método de análise dos espectros. Pelo Raman, viu-se que a clorofila não varia significativamente entre as amostras. E por isso foi utilizada como parâmetro para a normalização dos espectros. Com isso, construiu-se um perfil de teores relativos entre as algas e, assim, ranquear as algas pelo seu teor entre carotenóides e clorofilas. Assim, após tomar a média sobre as áreas integradas de cada pico individual, podemos inferir que o teor de carotenóides médio, em relação a concentração de clorofila-A, é 42% maior na *Nannochloropsis oceanica* quando comparada com a *Chlorella sorokiniana* e, 37% maior que a *Chlamydomonas sp.* O diagrama de clusters, uma ferramenta visual auxiliar, revela uma diferenciação clara entre as espécies. E talvez haja uma correlação entre a separação euclidiana entre as nuvens de cada espécie com relação ao seu teor relativo e presença (ou ausência) de pigmentos, como não há presença de clorofila B na alga NN. Em acordo com as medidas feitas com a espectroscopia Raman, a análise de teores relativos feita por UV-VIS retorna valores muito próximos aos encontrados anteriormente.

Diferentemente dos espectros Raman, os espectros obtidos por FTIR são dominados por picos característicos de outras biomoléculas: carboidratos, lipídios e proteínas. Assim como no Raman, não há uma diferenciação aberrante entre os contornos espectrais das amostras. Pelo PCA viu-se uma claríssima diferenciação entre as cepas. O que candidata a técnica de FTIR, juntamente com o Raman, com fortíssimos potenciais para o uso em métodos computacionais, como uma barata e rápida técnica de identificação de microalgas. Além disso, ambas as técnicas

estão aptas para o uso em estudos da dinâmica das moléculas identificadas no interior das algas.

5.2 Segunda etapa

Microrreatores

Pela figura 4.8 é possível perceber que o padrão com espaçamentos proporcionais entre as curvas de cada reator somem a partir da curva de $25W.m^{-2}$, de modo que deste ponto em diante, há uma sobreposição das curvas de crescimento dos reatores. Utilizando, complementarmente, o quadro (c) vê-se através da derivada da densidade de algas de cada reator que até uma irradiância de $25 W.m^{-2}$ há um comportamento linear entre a relação potência fornecida e a velocidade de crescimento. Porém acima deste valor, há um comportamento assintótico em direção a um patamar constante, onde fornecer mais energia não implicará em um crescimento da taxa de densidade significativa. Quando visto sob espectro prático, industrial e comercial, é uma informação muito interessante. Um dos aspectos a se considerar sobre a construção de bio-reatores é a relação entre gasto energético para sustento e manutenção das algas e a biomassa produzida, uma relação de custo benefício. Uma relação que definitivamente impacta no custo final de qualquer subproduto das microalgas.

Conjuntamente, ainda na figura 4.8, mantendo uma potência entregue de $25 W.m^{-2}$, obtemos um comportamento assintótico análogo. No caso, vemos que acima de uma concentração de 40% de meio de cultura os reatores apresentam curvas de crescimento semelhantes entre si. Em termos sobre a produção de microalgas do gênero CA, é financeiramente interessante obter estes resultados já que boa parte do custo de produção de bio-derivados oriundos

de microalgas está embutido na produção dos meios de cultura. Assim, obter a mesma taxa de crescimento de algas utilizando apenas 40% da concentração de meio necessário é uma ótima notícia para futuros investimentos na cultivo de algas para fins industriais e comerciais.

Há um paralelo interessante entre as figuras 4.8, quadro (d) e a figura 4.15, item (b). Por mais que as curvas tendam para um comportamento assintótico e indistinguíveis entre si na primeira figura, isso já não ocorre na segunda. Os reatores não são capazes de distinguir as culturas entre si, porém, por meio da espectroscopia de FTIR, há uma diferenciação entre as cepas com concentrações de 40% e 55%. Assim por mais que as cepas sejam indistinguíveis em uma macroescala, a característica do indivíduo, a microescala, são evidentes sob a luz da espectroscopia.

Estudo de aclimação

Nos estudos preliminares, percebeu-se que a alga *Chlamydomonas* é a que melhor responde a privação de nutrientes, tornando-se amarela ao final do experimento, como visto na figura 4.9. E portanto, usada como objeto principal de estudo desde então.

Submetidas as cepas, cultivadas nos reatores automatizados, sob diferentes regimes de luminosidade e concentração de nutrientes, constatou-se que, no Raman, a análise empregada anteriormente para descrever o teor relativo entre as espécies, não é tão efetiva. Embora haja indícios de que o cultivo por privação de alimento seja mais efetivo na separação das amostras, vide o gráfico de clusters e os resultados do ANOVA, os dados são insuficientes para fundamentar uma conclusão mais sólida. De maneira análoga, a análise dos espectros de UV-VIS não revelam nenhuma mudança notável dos perfis de pigmentos. De modo geral, para sanar as

dúvidas que surgem sobre a eficiência da metodologia desenvolvida ao longo deste e da dissertação de [27], é desejável que estudos munidos de mais uma semana de cultivo sejam conduzidos ou, de maneira complementar, os espectros de varredura tanto de iluminação, quanto de concentração de BG11, sejam reajustados.

Ao contrário da contraparte obtida pela análise de componentes principais do Raman, no FTIR há resultados muitíssimo contundentes. Em ambos os estudos conduzidos as separações dos grupos são nítidas e, com apenas uma exceção no estudo da influência da concentração de nutrientes, sem sobreposições de grupos. Nos dois experimentos realizados, há uma forte influência na produção do grupo molecular CH_3 , um pico não atribuído na análise da primeira etapa. Tal formação é típica do grupo metil, um grupo de hidrocarbonetos comum a muitos compostos orgânicos. Acredita-se que este sinal seja oriundo da produção de lipídios, porém estudos adicionais são necessários.

5.3 Terceira etapa

Trabalhos futuros

As técnicas de espectroscopia utilizadas neste trabalho e o poder de síntese dos reatores não foram explorados em todo o seu potencial. O autor credita a esse fato o estranho ano de 2020, marcado por um evento único, em sua escala, na história humana, a pandemia de Covid-19. Sendo assim, estudos com sínteses mais finas como: um maior tempo de aclimação das cepas, diferentes varreduras de potências luminosas entregues e um estudo de concentrações de alimentos disponíveis e o uso de fontes luminosas com comprimentos de ondas específicos

são ótimos pontos de partida para estudos vindouros. Bem como, o enorme acervo de informação espectral adquirido ao longo desse processo de formação permitirá desenvolver uma série de processos e rotinas de identificação computacionais das características espectrais das algas aqui utilizadas. Sendo assim, utilizando as técnicas aqui desenvolvidas, poder-se-á criar um banco de referência e um programa, para propósitos científicos, industriais e comerciais, para identificação e caracterização de microalgas.

Referências Bibliográficas

- [1] E. Rabinowitch and R. Govindjee. *Photosynthesis*. Wiley, 1969.
- [2] Bettina E Schirromeister, Jurriaan M de Vos, Alexandre Antonelli, and Homayoun C Bagheri. Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the great oxidation event. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5):1791–1796, 2013.
- [3] Nathan Nelson and Adam Ben-Shem. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12):971–982, 2004.
- [4] Nathan Nelson. Photosystems and global effects of oxygenic photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8):856–863, 2011.
- [5] Nathan Nelson and Charles F Yocum. Structure and function of photosystems i and ii. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:521–565, 2006.
- [6] Robert E Blankenship. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. John Wiley & Sons, 2014.
- [7] Patricia Müller, Xiao-Ping Li, and Krishna K Niyogi. Non-photochemical quenching. a response to excess light energy. *Plant physiology*, 125(4):1558–1566, 2001.
- [8] Zhirong Li, Setsuko Wakao, Beat B Fischer, and Krishna K Niyogi. Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*, 60:239–260, 2009.

-
- [9] Peter Jahns and Alfred R Holzwarth. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem ii. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1):182–193, 2012.
- [10] Michael D Guiry. How many species of algae are there? *Journal of phycology*, 48(5):1057–1063, 2012.
- [11] Daniel G Boyce, Marlon R Lewis, and Boris Worm. Global phytoplankton decline over the past century. *Nature*, 466(7306):591–596, 2010.
- [12] Esther EM Luiten, Ida Akkerman, Albert Koulman, Pauline Kamermans, Hans Reith, Maria J Barbosa, Detmer Sipkema, and René H Wijffels. Realizing the promises of marine biotechnology. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6):429–439, 2003.
- [13] Otto Pulz and Wolfgang Gross. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(6):635–648, 2004.
- [14] Karina HM Cardozo, Thais Guaratini, Marcelo P Barros, Vanessa R Falcão, Angela P Tonon, Norberto P Lopes, Sara Campos, Moacir A Torres, Anderson O Souza, Pio Colepicolo, et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2):60–78, 2007.
- [15] H Christopher Greenwell, LML Laurens, RJ Shields, RW Lovitt, and KJ Flynn. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the royal society interface*, 7(46):703–726, 2010.

-
- [16] Stuart A Scott, Matthew P Davey, John S Dennis, Irmtraud Horst, Christopher J Howe, David J Lea-Smith, and Alison G Smith. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology*, 21(3):277–286, 2010.
- [17] Teresa M Mata, Antonio A Martins, and Nidia S Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1):217–232, 2010.
- [18] Suphi S Oncel. Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26:241–264, 2013.
- [19] Clifford J Unkefer, Richard T Sayre, Jon K Magnuson, Daniel B Anderson, Ivan Baxter, Ian K Blaby, Judith K Brown, Michael Carleton, Rose Ann Cattolico, Taraka Dale, et al. Review of the algal biology program within the national alliance for advanced biofuels and bioproducts. *Algal research*, 22:187–215, 2017.
- [20] Peter J Lammers, Michael Huesemann, Wiebke Boeing, Daniel B Anderson, Robert G Arnold, Xuemei Bai, Manish Bhole, Yalini Brhanavan, Louis Brown, Jola Brown, et al. Review of the cultivation program within the national alliance for advanced biofuels and bioproducts. *Algal research*, 22:166–186, 2017.
- [21] Babetta L Marrone, Ronald E Lacey, Daniel B Anderson, James Bonner, Jim Coons, Taraka Dale, Cara Meghan Downes, Sandun Fernando, Christopher Fuller, Brian Goodall, et al. Review of the harvesting and extraction program within the national alliance for advanced biofuels and bioproducts. *Algal research*, 33:470–485, 2018.

-
- [22] Rafaela Forzza, José Baumgratz, Carlos Bicudo, Dora Canhos, Anibal Jr, Marcus Nadruz, Andrea Costa, Denise Costa, Michael Hopkins, Paula Leitman, Lucia Lohmann, Eimear Nic Lughadha, Leonor Maia, Gustavo Martinelli, Mariângela Menezes, Marli Morim, Ariane Peixoto, Jose Rubens Pirani, Jefferson Prado, and Daniela Zappi. New brazilian floristic list highlights conservation challenges. *BioScience*, 62:39–45, 01 2012.
- [23] Sámed IIA Hadi, Hugo Santana, Patrícia PM Brunale, Taísa G Gomes, Márcia D Oliveira, Alexandre Matthiensen, Marcos EC Oliveira, Flávia CP Silva, and Bruno SAF Brasil. Dna barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PloS one*, 11(2):e0149284, 2016.
- [24] Patrícia Verdugo Pascoal, Sámed Ibrahim Isa Abdel Hadi, AS STEINDORFF, EF FORMIGHIERI, and B BRASIL. Sequenciamento do dna mitocondrial de chlamydomonas biconvexa revela um mitogenoma compacto. In *Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., 2017 ... , 2017.
- [25] Ewen Smith and Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. 08 2005.
- [26] I.E. Borissevitch, P.J. Gonçalves, and F.A. Schaberle. *Fundamentos Da Espectroscopia De Absorção Óptica*. LIVRARIA DA FISICA.
- [27] John Fredy Ricardo Marroquin. O uso da espectroscopia óptica na diferenciação e caracterização de microalgas. 2020.

-
- [28] Gabriela Possa, Hugo Santana, Bruno Brasil, and Luiz Roncaratti. Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of nanochloropsis. *Journal of Molecular Modeling*, 23, 03 2017.
- [29] Quantum leap wellness.
- [30] L.E. Graham, J.M. Graham, and L.W. Wilcox. *Algae*. Benjamin Cummings, 2009.
- [31] I.M.F.A.L.B.B. de Reviers | João Fernando Prado | Sahima Hamlaoui. *Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Artmed Editora, 2009.
- [32] Pesquisa revela a curiosa relação entre o bicho-preguiça e a traça.
- [33] O amigo oculto da preguiça.
- [34] Algae, protist.
- [35] Source of half earth's oxygen gets little credit.
- [36] Se-Kwon Kim and Mustafa Zafer Karagozlu. Marine algae: natural product source for gastrointestinal cancer treatment. In *Advances in food and nutrition research*, volume 64, pages 225–233. Elsevier, 2011.
- [37] Robert Andersen. *Algal Culturing Technique*. 01 2005.
- [38] Martek bioscience.
- [39] Liang Wang, Min Min, Yecong Li, Paul Chen, Yifeng Chen, Yuhuan Liu, Yingkuan Wang, and Roger Ruan. Cultivation of green algae chlorella sp. in different wastewaters

-
- from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4):1174–1186, 2010.
- [40] Anastasios Melis and Thomas Happe. Trails of green alga hydrogen research – from hans gaffron to new frontiers. *Photosynthesis research*, 80:401–9, 02 2004.
- [41] Photobioreactor.
- [42] Synoxis - model lucy - accessible photobioreactor cultivation system.
- [43] Biomass and astaxanthin productivities of haematococcus pluvialis in an angled twin-layer porous substrate photobioreactor: Effect of inoculum density and storage time.
- [44] Csgör Z, Michael Herrenbauer, Karsten Schmidt, and Clemens Posten. Light distribution in a novel photobioreactor - modelling for optimization. *Journal of Applied Phycology*, 13:325–333, 08 2001.
- [45] R. Radmer, P. Behrens, and K. Arnett. Analysis of the productivity of a continuous algal culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIX:488–492, 03 1987.
- [46] R. Radmer, P. Behrens, and K. Arnett. Analysis of the productivity of a continuous algal culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIX:488–492, 03 1987.
- [47] Gabriela Cunha POSSA. *Desenvolvimento de fotobiorreator automatizado e dinâmica de crescimento de microalgas*. Doutorado em física, Universidade de Brasília, 2017.
- [48] Yuan-Kun Lee and S. Pirt. Co₂ absorption rate in an algal culture: Effect of ph. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology*, 34:28 – 32, 03 2008.

-
- [49] Herch Moysés Nussenzveig. *Curso de física básica: Ótica, relatividade, física quântica (vol. 4)*. Editora Blucher, 2014.
- [50] O Sala. Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho. 2ª edição, unesp, são paulo. 20 sala. *O. Qui. Nova*, 31(4), 2008.
- [51] Attila Szabo and Neil S Ostlund. *Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory*. Courier Corporation, 2012.
- [52] Jun Jon Sakurai and Jim Napolitano. *Mecânica quântica moderna*. bookman, 2013.
- [53] Albert Messiah. Quantum mechanics two volumes bound as one, 2000.
- [54] Adalberto Fazzio and Kazunori Watari. Introdução à teoria de grupos aplicada em moléculas e sólidos. *Santa Maria: UFSM*, 2009.
- [55] A. Smekal. Zur quantentheorie der dispersion. *Naturwissenschaften*, page 873–875, 1923.
- [56] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, pages 501–502, 1928.
- [57] Jun John Sakurai. *Advanced quantum mechanics*. Pearson Education India, 1967.
- [58] Quantum theory of rayleigh scattering and raman scattering: Kramers-heisenberg formula.
- [59] Análise de componentes principais (pca).

-
- [60] Análise de componentes principais.
- [61] Análise de componentes principais (pca).
- [62] Sam Kash Kachigan. *Multivariate statistical analysis: A conceptual introduction*. Radius Press, 1991.
- [63] Chris Chatfield and Alexander Collins. *Introduction to multivariate analysis*, volume 1. CRC Press, 1981.
- [64] Joseph F Hair, William C Black, Barry J Babin, Rolph E Anderson, and Ronald L Tatham. *Análise multivariada de dados*. Bookman editora, 2009.
- [65] Alvin C Rencher. *Methods of multivariate analysis*, volume 492. John Wiley & Sons, 2003.
- [66] What does it mean by resolving power of a microscope and telescope?
- [67] Sámed Hadi, Hugo Santana, Patrícia Brunale, Taísa Gomes, Márcia Oliveira, Alexandre Matthiensen, Marcos Oliveira, Flávia Silva, and Bruno Brasil. Dna barcoding green microalgae isolated from neotropical inland waters. *PLOS ONE*, 11:e0149284, 02 2016.
- [68] Elizabeth H Harris, David B Stern, and George B Witman. *The chlamydomonas source-book*, volume 2. Academic Press San Diego, 1989.
- [69] Maria L Ghirardi, Matthew C Posewitz, Pin-Ching Maness, Alexandra Dubini, Jianping Yu, and Michael Seibert. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:71–91, 2007.

-
- [70] Olivia Demurtas, Silvia Massa, Paola Ferrante, Aldo Venuti, Rosella Franconi, and Giovanni Giuliano. A chlamydomonas-derived human papillomavirus 16 e7 vaccine induces specific tumor protection. *PloS one*, 8:e61473, 04 2013.
- [71] James Gregory, Fengwu Li, Lauren Tomosada, Chesa Cox, Aaron Topol, Joseph Vinetz, and Stephen Mayfield. Algae-produced pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PloS one*, 7:e37179, 05 2012.
- [72] Sabeeha S Merchant, Simon E Prochnik, Olivier Vallon, Elizabeth H Harris, Steven J Karpowicz, George B Witman, Astrid Terry, Asaf Salamov, Lillian K Fritz-Laylin, Laurence Maréchal-Drouard, et al. The chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848):245–250, 2007.
- [73] Chlamydomonas.
- [74] Muhammad Imran Khan, Moon Lee, Hyo Seo, Jin Shin, Tai Shin, Yoon Ho, Min Kim, Jong Choi, and Jong-Deog Kim. Enhancing the feasibility of microcystis aeruginosa as a feedstock for bioethanol production under the influence of various factors. *BioMed Research International*, 2016:1–9, 01 2016.
- [75] Sonia Milena Villamizar Gomez. CaracterizaÇÃo de carotenÓides e lipideos de microalgas in vivo utilizando espectroscopia raman. Mestrado profissional em engenharia industrial, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.
- [76] Paul Eilers and Hans Boelens. Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. *Unpubl. Manuscr*, 11 2005.

-
- [77] Python.
- [78] numpy.org.
- [79] scipy.org.
- [80] Pearson family of distributions.
- [81] Ramesh Kumar Saini and Young-Soo Keum. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 07 2017.
- [82] M Henriques, A Silva, and J Rocha. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex*, 2:586–593, 2007.
- [83] HARTMUT K LICHTENTHALER and Alan R Wellburn. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, 1983.
- [84] T Vimala and TV Poonghuzhali. Estimation of pigments from seaweeds by using acetone and dmso. *International Journal of Science and Research*, 4(10):1850–1854, 2015.
- [85] P Kumar, CM Ramakritinan, and AK Kumaraguru. Solvent extraction and spectrophotometric determination of pigments of some algal species from the shore of puthumadam, southeast coast of india. *International Journal of Oceans and Oceanography*, 4(1):29–34, 2010.
- [86] Ana Catarina Guedes, Helena M Amaro, and Francisco Xavier Malcata. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4):625–644, 2011.

-
- [87] Yingying Meng, Changhong Yao, Song Xue, and Haibo Yang. Application of fourier transform infrared (ft-ir) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource technology*, 151:347–354, 2014.
- [88] Katja Stehfest, Jörg Toepel, and Christian Wilhelm. The application of micro-ftir spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7):717–726, 2005.
- [89] Mario Giordano, Mustafa Kansiz, Philip Heraud, John Beardall, Bayden Wood, and Don McNaughton. Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37(2):271–279, 2001.
- [90] Arthur MA Pistorius, Willem J DeGrip, and Tatjana A Egorova-Zachernyuk. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of ft-ir spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(1):123–129, 2009.
- [91] Bayden R Wood, Philip Heraud, Slobodanka Stojkovic, Danielle Morrison, John Beardall, and Don McNaughton. A portable raman acoustic levitation spectroscopic system for the identification and environmental monitoring of algal cells. *Analytical Chemistry*, 77(15):4955–4961, 2005.
- [92] W Zha, Y Cheng, W Yu, X Zhang, Aiguo Shen, and J Hu. HPLC assisted raman spectroscopic studies on bladder cancer. *Laser Physics Letters*, 12:045701, 04 2015.

-
- [93] Niranjan Parab and Vikas Tomar. Raman spectroscopy of algae: A review. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 3, 03 2012.
- [94] Fran Adar. Carotenoids—their resonance raman spectra and how they can be helpful in characterizing a number of biological systems. 2017.
- [95] Bruno Robert. Resonance raman studies in photosynthesis—chlorophyll and carotenoid molecules. In *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, pages 161–176. Springer, 1996.
- [96] What is multivariate analysis?
- [97] Hartmut K Lichtenthaler and Claus Buschmann. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by uv-vis spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1):F4–3, 2001.
- [98] RW Wellburn. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3):307–313, 1994.
- [99] M Henriques, A Silva, and J Rocha. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 2:586–593, 2007.
- [100] Chiasa Uragami, Denise Galzerano, Andrew Gall, Yusuke Shigematsu, Maiwen Meisterhans, Naohiro Oka, Masahiko Iha, Ritsuko Fujii, Bruno Robert, and Hideki Hashimoto. Light-dependent conformational change of neoxanthin in a siphonous green

-
- alga, *Codium intricatum*, revealed by raman spectroscopy. *Photosynthesis research*, 121(1):69–77, 2014.
- [101] Lavanya Premvardhan, Luc Bordes, Anja Beer, Claudia Buchel, and Bruno Robert. Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll *a/c2* proteins from resonance raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(37):12565–12574, 2009.
- [102] Chlorophyll b.
- [103] Luis M Lubián, Olimpio Montero, Ignacio Moreno-Garrido, I Emma Huertas, Cristina Sobrino, Manuel González-del Valle, and Griselda Parés. Nannochloropsis (eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5):249–255, 2000.
- [104] Lucia Guidi, Massimiliano Tattini, and Marco Landi. *How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light?* 05 2017.
- [105] Ftir and raman characteristic peak frequencies in biological studies.