

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para
Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Scenedesmus sp.***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cecília Dutra Garcia Cougo

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para
Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em *Scenedesmus sp.***

Cecília Dutra Garcia Cougo

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Co-orientadora:

Profa. Dra. Luciane Ferreira Trierweiler

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Utilização da Técnica Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) para Estimativa das Concentrações de Carboidratos e de Lipídeos em Scenedesmus sp.*, elaborada por Cecília Dutra Garcia Cougo, como requisito parcial para obtenção do Grau Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin

Profa. Dra. Mariliz Gutterres Soares

Prof. Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu

Resumo

Com as descobertas das inúmeras aplicações potenciais da biomassa de microalgas é necessário o desenvolvimento de ferramentas que visem auxiliar o aumento da produtividade dos cultivos. A espectrometria por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica versátil e rápida utilizada na identificação, caracterização e quantificação de diversos compostos moleculares. Sua aplicação está definida de acordo com a região espectral a ser analisada. O objetivo deste trabalho é desenvolver uma metodologia que torne possível a utilização da espectroscopia FTIR na região do infravermelho médio (MIR) para quantificar os teores de lipídeos, proteínas, carboidratos e células de *Scenedesmus sp.* Para tanto, a biomassa de *Scenedesmus sp.* foi analisada diariamente por métodos tradicionais e através do espectro FTIR. Posteriormente os dados foram correlacionados com as bandas de absorção características de cada composto. O modelo gerado para lipídeos na região entre 3000-2800 cm^{-1} obteve o maior coeficiente de correlação (R^2) de 0,8265. Para os carboidratos, a banda de absorção que melhor representou as ligações características foi entre 1200-950 cm^{-1} , com $R^2=0,8023$. Já para proteínas, a escolha do método tradicional não mostrou boa relação com os resultados do FTIR. Quando a concentração celular foi correlacionada com a área total foi obtido $R^2=0,7900$. Por fim, realizaram-se experimentos para validar os modelos preditos, obtendo bons resultados para a quantificação de lipídeos e carboidratos. O FTIR mostra ser uma ferramenta eficiente para estimar os conteúdos de lipídeos e carboidratos de *Scenedesmus sp.* Além disso, o FTIR permite análise simultânea de múltiplos metabolitos que permitirá o monitoramento mais detalhado do cultivo em um tempo de análise muito mais curto e com alta reprodutibilidade dos resultados.

Palavras-chave: Carboidratos, FTIR, Lipídeos, MIR, *Scenedesmus sp.*

Abstract

With the discoveries of the numerous potential applications of microalgal biomass, it is necessary to develop tools to help increase the productivity of cultivation. Infrared spectrometry with Fourier transform (FTIR) is a versatile and fast technique used in the identification, characterization and quantification of several molecular compounds. Its application is defined according to the spectral region to be analyzed. The objective of this work is to develop a methodology that makes possible the use of FTIR spectroscopy in the medium infrared region (MIR) to quantify lipid, protein, carbohydrate and cells contents of *Scenedesmus sp.* For this, the *Scenedesmus sp.* biomass was analyzed daily by traditional methods and through the FTIR spectrum. Subsequently the data were correlated with the absorption bands characteristic of each compound. The model generated for lipids in the region between 3000-2800 cm^{-1} obtained the highest coefficient of correlation (R^2) of 0.8265. For carbohydrates, the absorption band that best represented the characteristic bonds was between 1200-950 cm^{-1} , with $R^2=0.8023$. For proteins, the choice of the traditional method did not show a good relation with the FTIR results. When the cell concentration was correlated whit the total area an $R^2=0.7900$. Finally, experiments were carried out to validate the predicted models, obtaining good results for the quantification of lipids and carbohydrates. The FTIR shows to be an efficient tool to estimate lipid and carbohydrate contents of *Scenedesmus sp.* In addition, the FTIR allows simultaneous analysis of multiple metabolites that will enable more detailed monitoring of the cultivation in a much shorter analysis time and with high reproducibility of the results.

Key words: Carbohydrates, FTIR, Lipids, MIR, *Scenedesmus sp.*

“Nós devemos ser a mudança que desejamos para o mundo.”

Gandhi

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meu caminho, sempre me iluminando.

Aos meus pais, José Carlos e Rita, e minha irmã, Cândida, pela criação, pelo exemplo, pelo apoio e amor incondicional.

À família Specht, que estão sempre me apoiando e incentivando.

Ao meu companheiro Mateus, que sempre se doa a me ajudar, acalmar e me faz ver a vida de uma forma mais simples.

Aos meus amigos e familiares, pela compreensão da minha ausência em muitos momentos.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Marcelo Farenzena e Profa. Dra. Luciane Ferreira Trierweiler, pela receptividade, confiança, conversas, ensinamentos e dedicação.

Aos colegas, especialmente à Caroline Weber, Juliana Tolfo da Fontoura e Juliano Antônio Sebben, que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho sempre ajudando e me motivando.

Ao Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler e à Prof. Dra. Mariliz Gutterres Soares, que auxiliaram para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Química, especialmente à Bruna dos Santos, ao Eduardo Foutoura Birnfeld e à Tatiana Calvete, pela ajuda e disposição.

Aos membros da Comissão Examinadora pela disponibilidade e sugestões.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ), pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Lista de Figuras	X
Lista de Tabelas	XII
Lista de Abreviações.....	XIV
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Histórico.....	2
1.1. Objetivos	3
1.2. Estrutura da Dissertação	4
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1 Microalgas.....	5
2.1.1 <i>Scenedesmus</i>	7
2.2 Composição Química das Microalgas	8
2.2.1 Proteínas.....	8
2.2.2 Lipídeos.....	9
2.2.3 Carboidratos	9
2.3 Parâmetros que Influenciam o Crescimento das Microalgas	10
2.3.1 Temperatura	10
2.3.2 pH.....	12
2.3.3 Nutrientes	12
2.3.4 Iluminância	15
2.4 Métodos Analíticos para Caracterização da Biomassa	16
2.4.1 Métodos Tradicionais.....	16
2.4.2 Métodos Alternativos.....	18
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	30
3.1 Manutenção da Microalga.....	30
3.2 Cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i>	30
3.3 Métodos Tradicionais.....	33
3.3.1 Crescimento Celular.....	33
3.3.2 Determinação do pH	33
3.3.3 Pré-tratamento da Biomassa	33

3.3.4	Determinação de Carboidratos.....	35
3.3.5	Determinação de Proteínas.....	35
3.3.6	Determinação de Lipídeos	35
3.4	Método Alternativo	36
3.4.1	Análise de Infravermelho.....	36
3.5	Validação dos Modelos	37
Capítulo 4	- Resultados e Discussão.....	38
4.1	Curvas Padrões.....	38
4.2	Pré-Tratamentos	40
4.3	Avaliação do Crescimento Celular	42
4.3.1	Lipídeos.....	44
4.3.2	Carboidratos	48
4.3.3	Proteínas.....	51
4.3.4	Concentração Celular	54
4.3.5	Fator de Conversão	55
4.4	Validação dos Modelos.....	57
Capítulo 5-	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	63
Referências Bibliográficas	65
Apêndice I.....	73

Lista de Figuras

Figura 2.1. <i>Scenedesmus sp.</i>	8
Figura 2.2. Desenho esquemático de uma função de potencial vibracional e do nível de energia. Fonte: Wellner (2013).....	19
Figura 2.3. Ilustração esquemática do espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009)	24
Figura 2.4. Esquema de um sistema de reflectância total atenuada (ATR) de reflexão múltipla.....	26
Figura 2.5. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de lipídeos, sendo utilizado óleo de oliva.	27
Figura 2.6. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de carboidratos, sendo utilizado amido de trigo.....	28
Figura 2.7. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de proteínas, sendo utilizado albumina do soro bovino.	28
Figura 3.1. Fluxograma geral do procedimento realizado no laboratório.	32
Figura 3.2. Ilustração do espectro FTIR de <i>Scenedesmus sp.</i> e realce nas bandas características de cada composto. (a) Lipídeos; (b) Proteínas e (c) Carboidratos.....	37
Figura 4.1. Curva padrão de <i>Scenedesmus sp.</i> a 570 nm.....	38
Figura 4.2. Curva padrão de albumina.	39
Figura 4.3. Curva padrão de glicose.....	39
Figura 4.4. Espectro obtido no FTIR para glicose, utilizada como padrão de carboidrato.	42
Figura 4.5. Espectro obtido no FTIR para o padrão de proteína albumina do soro bovino.	43
Figura 4.6. Espectro FTIR da biomassa seca de <i>Scenedesmus sp.</i> Em destaque as regiões características (a) Lipídeos, (b) Proteínas e (c) Carboidratos.....	43
Figura 4.7. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR ($1800-1000\text{ cm}^{-1}$) e método tradicional (BLIGH; DYER, 1959) quanto ao percentual de lipídeos.	45
Figura 4.8. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$) e método tradicional (BLIGH; DYER, 1959) quanto ao percentual de lipídeos.	46
Figura 4.9. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR ($1200-950\text{ cm}^{-1}$) e método tradicional (DUBOIS <i>et al.</i> , 1956) quanto ao percentual de carboidratos.	49

Figura 4.10. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1180-1133 cm^{-1}) e método tradicional (DUBOIS <i>et al.</i> , 1956) quanto ao percentual de carboidratos.	50
Figura 4.11. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1728-1578 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY <i>et al.</i> , 1951) quanto ao percentual de proteínas.	52
Figura 4.12. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1590-1476 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY <i>et al.</i> , 1951) quanto ao percentual de proteínas.	52
Figura 4.13. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1728-1476 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY <i>et al.</i> , 1951) quanto ao percentual de proteínas.	53
Figura 4.14. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR e métodos tradicionais quanto à concentração celular.	54
Figura 4.15. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo do conteúdo de carboidratos pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. (a) 1200-950 cm^{-1} e em (b) entre 1180-1133 cm^{-1}	58
Figura 4.16. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo do conteúdo lipídico pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. Em (a) 3000-2800 cm^{-1} , em (b) 1800-1000 cm^{-1}	59
Figura 4.17. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo da concentração celular pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. (a) Área total, (b) Área Amida I, (c) Área Amida II; (d) Área Amida I e II.	60
Figura 4.18. Comportamento da quantificação de lipídeos pelo método de Bligh e Dyer (1959) (■) e a área calculada para lipídeos na região de 3000-2800 cm^{-1} (●).	61
Figura 4.19. Comportamento da quantificação de carboidratos pelo método de Dubois <i>et al.</i> (1956) (■) e a área calculada para carboidratos na região de 1200-950 cm^{-1} (●), referente ao experimento 1.	62

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Teores de proteína, carboidrato e lipídeo em diferentes espécies de microalgas.....	10
Tabela 2.2. Funções biológicas de alguns micronutrientes para as microalgas.....	15
Tabela 3.1. Composição do meio de cultivo Guillard Modificado.	30
Tabela 3.2. Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento fatorial 2 ³ , com seus níveis codificados e reais.	31
Tabela 4.1. Média percentual da concentração de proteínas na biomassa de <i>Scenedesmus sp.</i> Todos os pré-tratamentos realizados na presença de NaOH 1M.	40
Tabela 4.2. Média percentual da concentração de carboidratos na biomassa de <i>Scenedesmus sp.</i> em função dos diferentes pré-tratamentos.	41
Tabela 4.3. Resumo dos resultados encontrados por diversos autores para quantificação de lipídeos por FTIR.....	48
Tabela 4.4. Resumo dos resultados encontrados por diversos autores para quantificação de carboidratos por FTIR.....	51
Tabela 4.5. Síntese dos resultados obtidos para as correlações das diferentes áreas de proteínas versus concentração celular.	55
Tabela 4.6. Fatores de conversão de células em percentual de lipídeos.....	56
Tabela 4.7. Fatores de conversão de células em percentual de carboidratos.....	57
Tabela I.1. Dados obtidos de concentração celular (mg.mL ⁻¹) para <i>Scenedesmus sp.</i> durante os cultivos utilizando o método tradicional.....	73
Tabela I.2. Dados obtidos de percentual de proteínas para <i>Scenedesmus sp.</i> durante os cultivos utilizando o método tradicional.	74
Tabela I.3. Dados obtidos de percentual de carboidratos para <i>Scenedesmus sp.</i> durante os cultivos utilizando o método tradicional.....	74
Tabela I.4. Dados obtidos de percentual de lipídeos para <i>Scenedesmus sp.</i> durante os cultivos utilizando o método tradicional.	75
Tabela I.5. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação dos lipídeos.....	75
Tabela I.6. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação dos carboidratos.....	75
Tabela I.7. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação das proteínas.	78

Tabela I.8. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação da concentração celular. 82

Lista de Abreviações

ATP	Adenosina trifosfato
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
IR	Infravermelho
MIR	Infravermelho Médio
R ²	Coefficiente de determinação
UV	Ultravioleta

Capítulo 1 – Introdução

No mercado atual, a demanda por produtos derivados de microalgas no ramo alimentício é crescente; já para a indústria dos biocombustíveis esta biomassa tem sido referenciada como uma fonte potencial, pela produtividade superior às oleaginosas. Todavia, seu custo é ainda elevado. Visando reduzi-lo, surge a necessidade de se desenvolver técnicas que possam controlar e otimizar os cultivos em tempo real, de forma a monitorar os compostos presentes na biomassa de microalgas. Estas informações são essenciais para verificar as potenciais aplicações da biomassa em questão, visando o melhor aproveitamento dos produtos sintetizados que possuam valor agregado.

Nos cultivos em grande e pequena escalas, as análises para caracterização da biomassa das microalgas são realizadas de forma *off-line*, ou seja, realiza-se a amostragem no biorreator e, posteriormente, a análise é feita em laboratório, acarretando um atraso das informações do processo. Ainda, no momento que se obtém o resultado da análise, a condição fisiológica que o cultivo se encontrava foi alterada. Além disso, os métodos utilizados para as análises são adaptados para a matriz biomassa de microalgas, tendo sido desenvolvidos para outras biomassas, e empregam reagentes químicos que acabam degradando a amostra. Estes reagentes são, em sua maioria, compostos orgânicos (exemplo: metanol, clorofórmio, fenol e ácido sulfúrico), altamente tóxicos ao trabalhador e ao meio ambiente, os quais devem ser descartados e tratados corretamente. Ao mesmo tempo, as análises requerem a atuação de profissional habilitado, são metodologias trabalhosas e, por vezes, demoradas e laboriosas.

Uma alternativa é a utilização das técnicas espectrométricas que, em geral, consistem em métodos rápidos, práticos, que não degradam a amostra e podem ser

aplicados em tempo real. Assim, neste trabalho, a espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) na região do infravermelho médio (MIR) foi estudada a fim de permitir a caracterização da composição química da biomassa de microalgas e, com isso, dar continuidade nas posteriores operações unitárias necessárias para a utilização do composto de interesse sem atraso no processo.

A espectroscopia por infravermelho é uma ferramenta versátil aplicada a determinações qualitativas e quantitativas. Com exceção de moléculas homonucleares, todas as moléculas orgânicas e inorgânicas absorvem radiação na região do infravermelho. Além disso, a singularidade do espectro infravermelho conduz a um grau de especificidade que é raramente igualado ou excedido por outros métodos analíticos. Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho podem ser entendidos assumindo que todos se originam de numerosas variações de energia produzidas por transições de moléculas entre diferentes estados vibracionais ou rotacionais (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

1.1. Histórico

O Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP) vem estudando o cultivo de microalgas visando a otimização das condições de cultivo, produção e colheita da biomassa, buscando um menor custo de produção de tal biomassa.

Para alcançar tal objetivo, Gris *et al.* (2013) desenvolveram uma planta em escala de laboratório para a otimização dos cultivos de microalgas. A mesma possibilitou o estudo simultâneo de variáveis como temperatura, iluminância, fotoperíodo e concentração de CO₂ no fluxo de aeração, bem como variáveis relacionadas à concentração de nutrientes dos meios de cultura. Os autores também estudaram influência da temperatura, concentração de nitrato de sódio e os efeitos da iluminância sobre o conteúdo de lipídeos em *Nannochloropsis oculata*.

Ramirez, Farenzena e Trierweiler (2014) avaliaram o uso de vinhaça como fonte de nutriente, intensidade luminosa e temperatura para o crescimento de *Scenedesmus sp.* Com até 40 % de vinhaça no meio de cultivo foi possível cultivar a microalga e a intensidade luminosa também interferiu no crescimento celular.

Outros estudos visaram otimizar os processos de colheita da biomassa, tendo como objetivo a redução dos custos do cultivo de microalgas (BORGES, 2014). O

Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) possui parceria com o grupo de pesquisa para estudar o cultivo de microalgas sob o efluente dos curtumes, reduzindo as cargas de contaminantes (FONTOURA *et al.*, 2015a, 2015b) e visando a utilização da biomassa como matéria prima para a produção de biodiesel. Estes estudos encontram-se em desenvolvimento.

Sendo assim, este trabalho propõe o estudo da espectroscopia FTIR visando auxiliar a otimização do cultivo de microalgas. O desenvolvimento de um método que facilita a quantificação dos lipídeos, carboidratos e proteínas vêm a contribuir para todos os trabalhos que têm sido desenvolvido no laboratório. Os resultados deste estudo visam permitir que os pesquisadores reduzam o tempo de análise, não gerem resíduos tóxicos, nem se exponham a agentes químicos. Além disso, tal técnica pode ser realizada por sensores customizados em tempo real e os compostos podem ser analisados simultaneamente.

1.1 Objetivos

Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia para a utilização da espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para monitorar o cultivo quanto ao teor de células, proteínas, carboidratos e lipídeos.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos da presente dissertação são:

- Monitorar a biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* no espectrofotômetro FTIR na região do infravermelho médio (MIR) pela técnica de refletância total atenuada (ATR);
- Monitorar o crescimento da biomassa da microalga *Scenedesmus sp.*, bem como os teores de carboidratos, proteínas e lipídeos por métodos tradicionais;
- Testar a influência dos pré-tratamentos realizados na biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* para quantificação dos carboidratos e proteínas;
- Estudar e desenvolver uma metodologia que utilize as relações entre a quantificação por FTIR e os métodos tradicionais;
- Validar a repetitividade da metodologia proposta em novos cultivos.

1.2. Estrutura da Dissertação

A presente dissertação está dividida em cinco capítulos. No Capítulo 2 será realizada a revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados neste trabalho. Esta, apresenta tópicos sobre microalgas, nutrientes necessários e alguns de seus metabolismos; metodologias utilizadas para quantificação de proteínas, carboidratos e lipídeos, além da espectroscopia FTIR aliada à caracterização da biomassa de microalgas. O Capítulo 3 descreve a metodologia empregada para determinação dos teores de proteínas, lipídeos e carboidratos pelos métodos tradicionais e pela espectroscopia FTIR, como um método alternativo não destrutivo para caracterização da biomassa. Já no Capítulo 4 são apresentados os resultados e discussão dos mesmos. Por fim, o Capítulo 5 apresenta as conclusões obtidas durante este trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

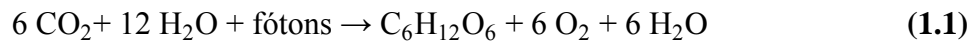
2.1 Microalgas

Cerca de dois terços da superfície da Terra está coberta por oceanos e mares, onde vivem a maior parte das algas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). As microalgas são encontradas em diversas condições ambientais e habitats tais como lagoas salobras, de água doce, hipersalinas, lagoas de maturação de águas residuais, barragens, rios, áreas marinhas e costeiras (MUTANDA *et al.*, 2011).

Por definição algas representam micro-organismos fotossintéticos, incluindo organismos procarióticos, ou seja, cianobactérias (*Chloroxybacteria*) e eucarióticos, por exemplo, algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) (SINGH; GU, 2010). O termo alga não possui valor taxonômico, por designar micro-organismos distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia (LOURENÇO, 2006).

Há muitos anos, as algas são utilizadas por diversos povos como alimento. Após a Segunda Guerra Mundial, desencadeou-se a pesquisa pelo potencial das microalgas como fonte proteica, sendo sugerida como suplemento alimentar para humanos e animais (SPOLAORE *et al.*, 2006). Posteriormente, com início da crise energética, foi sugerido o uso da biomassa de microalgas para a produção de metano (biocombustível) e em seguida sendo avaliado seu potencial para a síntese de produtos químicos (CHAUMONT, 1993).

As microalgas são organismos fotossintéticos, ou seja, a energia da luz é fixada como energia química durante o crescimento fotoautotrófico. A energia captada é utilizada no Ciclo de Calvin onde o dióxido de carbono (CO₂) é fixado em precursores dos metabólitos, como por exemplo, lipídeos e amido (AKKERMAN *et al.*, 2002). A equação abaixo representa a reação da fotossíntese.



A estrutura simples das microalgas permite atingir altos valores de eficiência fotossintética quando comparado com plantas terrestres (BRENNAN; OWENDE, 2010). Os tipos e combinações de pigmentos fotossintéticos presentes, a natureza química dos produtos de armazenamento e das paredes celulares e os aspectos citológicos e morfológicos desempenham importante papel na classificação das algas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

A composição química da biomassa de microalgas varia bastante em relação às macromoléculas constituintes de seus metabolismos, normalmente possuem quantidades elevadas de proteínas, lipídeos e carboidratos. Além disso, podem conter substâncias de alto valor agregado como pigmentos, ácidos graxos e vitaminas (SPOLAORE *et al.*, 2006). Esta composição pode ser alterada por diferentes condições de crescimento e, assim, direcionar a rota metabólica para a produção de alguns compostos de interesse. As condições de crescimento dependem principalmente da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, intensidade da luz, pH e temperatura (MIRÓN *et al.*, 2003; QIN, 2005).

As potenciais aplicações das microalgas são as mais diversas como por exemplo, mitigação do efeito estufa através da assimilação do CO₂ (DERNER *et al.*, 2006; HIRANO *et al.*, 1997) e tratamento de efluentes orgânicos provenientes das indústrias agroalimentar, utilizando os nutrientes remanescentes para o seu cultivo (CANTRELL *et al.*, 2008). Aliado a estes tratamentos, uma grande variedade de produtos pode ser obtido a partir da biomassa de microalgas, estes vão desde os suplementos alimentares e nutrientes para a alimentação humana e animal (desempenham um papel crucial na aquicultura) (HARUN *et al.*, 2010), adubos para o solo (RODOLFI *et al.*, 2009), cosméticos, produtos de alto valor agregado (pigmentos e ácidos graxos) (SPOLAORE *et al.*, 2006) e biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biometano) (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2008; HIRANO *et al.*, 1997).

Algumas das vantagens da biomassa de microalgas são: (1) cultura não sazonal, permitindo sua produção durante todo o ano; (2) possuem potencial de crescimento rápido (HIRANO *et al.*, 1997); (3) podem ser cultivados em terras não aráveis, não competem com alimentos ou outras culturas (RODOLFI *et al.*, 2009); (4) não necessitam exclusivamente de água doce (HIRANO *et al.*, 1997; RODOLFI *et al.*, 2009)); (5) tem potencial de minimização dos impactos ambientais principalmente pela fixação de CO₂

(1 kg de biomassa de algas secas fixam cerca de 1,8 kg de CO₂) (HIRANO *et al.*, 1997; RODOLFI *et al.*, 2009); além de que (6) os nutrientes para o cultivo de microalgas (especialmente nitrogênio e fósforo) podem ser obtidos a partir de águas residuais (DISMUKES *et al.*, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009).

Algumas espécies de microalgas podem ser utilizadas na produção de biocombustíveis pelo potencial para sintetizar maiores quantidades de biomassa com alto teor de lipídeos por hectare do que qualquer tipo de biomassa terrestre (culturas oleaginosas) (CHISTI, 2008; RODOLFI *et al.*, 2009; SINGH; GU, 2010; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Existem também limitações significativas associadas com esta tecnologia: (1) a dificuldade de manutenção de espécies em reatores abertos; (2) limitação de dados sobre as culturas de microalgas em larga escala; (3) o alto consumo de energia relacionados principalmente a colheita e ao processamento da biomassa (RODOLFI *et al.*, 2009).

Considerando a enorme biodiversidade das microalgas e os recentes desenvolvimentos na engenharia genética e metabólica, este grupo de organismos representa uma das mais promissoras fontes dos novos produtos e aplicações. Com o desenvolvimento das técnicas de cultura e de rastreamento detalhados, a biotecnologia de microalgas pode atender a alta demanda das indústrias de alimentos, energia e farmacêutica (HARUN *et al.*, 2010).

2.1.1 *Scenedesmus*

Scenedesmus pertencem ao grupo das algas verdes, da família *Scenedesmaceae*, ordem *Chlorococcales* e classe *Chlorophyceae* (SANT'ANNA *et al.*, 2012). *Scenedesmus* é uma microalga eucariótica, que se destaca entre os gêneros de água doce por ser um dos mais comuns (BARKA; BLECKER, 2016).

Scenedesmaceae englobam os indivíduos unicelulares que formam cenóbios em um ou mais planos. A parede celular é constituída por uma camada interna de celulose e uma ou mais camadas externas de esporopolenina, podendo apresentar diversas ornamentações como espinhos, costelas ou granulações. A reprodução ocorre por autósporos formando autocenóbios no interior da célula-mãe, os quais são liberados pelo rompimento da parede (COMAS, 1996 *apud* RAMOS; BICUDO; MOURA, 2015).

A família *Scenedesmaceae* é o maior grupo de algas verdes cocóides em ecossistemas de água doce. A grande variabilidade morfológica de *Scenedesmaceae* pode ser atribuída à propagação estritamente assexuada (HEGEWALD, 1997 *apud*

KRIENITZ; BOCK, 2012). A Figura 2.1 apresenta a microalga *Scenedesmus sp.*, que será estudada nesta dissertação.

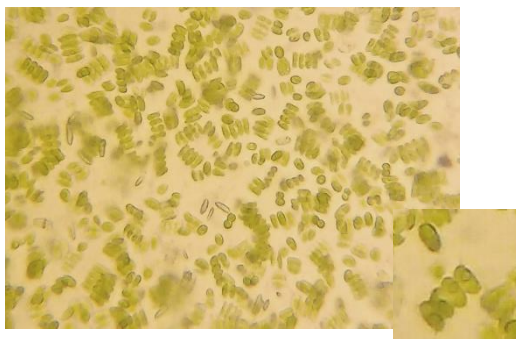


Figura 2.1. *Scenedesmus sp.*

2.2 Composição Química das Microalgas

As microalgas convertem o CO₂ em carbono orgânico, através da fotossíntese. O carbono orgânico gerado a partir da fotossíntese fornece o esqueleto carbônico para a biossíntese de compostos mais complexos como proteínas, carboidratos e lipídeos, além de ser fonte de energia metabólica que move todos os processos bioquímicos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

2.2.1 Proteínas

As proteínas estão presentes na maior parte dos processos biológicos. Praticamente todas as reações no organismo são mediadas por enzimas, as quais são proteínas catalisadoras que aumentam a velocidade das reações, sem sofrerem alterações no processo global (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

As proteínas são sintetizadas a partir de diversas combinações de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Estas são ligações covalentes que envolvem a remoção do hidrogênio do grupo amino de um aminoácido, e da hidroxila de outro aminoácido, com formação de uma molécula de água. As proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes nas células de algas e compreendem cerca de 50 % do seu peso seco (SERVAITES; FAETH; SIDHU, 2012).

O valor nutricional de uma proteína depende do seu conteúdo de aminoácidos essenciais e da sua digestibilidade. Os aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina,

metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) não são sintetizados pelo organismo humano, devendo ser obtidos a partir da dieta (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

2.2.2 Lipídeos

O termo lipídeo é utilizado para gorduras e substâncias gordurosas, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (CECCHI, 2003). Lipídeos exercem diversas funções biológicas, como componentes de membranas, isolantes térmicos e reservas de energia. Os quais, para as algas são compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados ou insaturados. Dentre os ácidos graxos existentes em microalgas, alguns componentes poli-insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6 são de interesse particular por terem elevado valor agregado quando utilizados como suplemento alimentar para humanos. O montante total, bem como as proporções relativas a ácidos graxos, podem ser afetadas por fatores nutricionais e ambientais, como a limitação de nitrogênio, por exemplo (LOURENÇO, 2006).

A biomassa das microalgas possui um teor lipídico que pode variar entre 1 e 70 % e, sob certas condições, algumas espécies podem atingir até 90 % do peso seco (METTING-JR, 1996).

2.2.3 Carboidratos

Os carboidratos compreendem os grupos de compostos que fazem parte das substâncias orgânicas mais abundantes da biosfera. Além disso, constituem a principal fonte de energia para os primeiros níveis tróficos da cadeia alimentar (LEHNINGER *et al.*, 1993). Os carboidratos de microalgas podem ser encontrados na forma de glicose, dissacarídeo, amido e outros polissacarídeos. Sua digestibilidade é alta, razão pela qual não existe nenhuma limitação ao uso de microalgas secas em alimentos ou rações (LOURENÇO, 2006)

Os carboidratos constituem reservas de polissacarídeos e constituintes da parede celular. Amido e glicogênio são polissacarídeos de reserva, que são em geral depositados no citoplasma das células, na forma de grânulos de grande tamanho. Em eventuais excessos de glicose, suas unidades são armazenadas através de ligações glicosídicas, nas extremidades das cadeias de amido ou glicogênio; em eventuais necessidades metabólicas, elas são liberadas, enzimaticamente, para o uso como energia (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

A Tabela 2.1 apresenta uma visão geral da composição de algumas espécies de microalgas de acordo com Singh, Gu (2010) e Spolaore *et al.* (2006).

Tabela 2.1. Teores de proteína, carboidrato e lipídeo em diferentes espécies de microalgas.

Espécie	Proteína (%peso seco)	Carboidrato (%peso seco)	Lipídeo (%peso seco)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	18
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-6	6-7
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Fonte: Singh, Gu (2010) e Spolaore *et al.* (2006).

2.3 Parâmetros que Influenciam o Crescimento das Microalgas

Para avaliar o desenvolvimento das microalgas, é necessário acompanhar o crescimento do cultivo e a concentração dos produtos de interesse. Alguns fatores como a espécie, o pH, a aeração, a temperatura, a iluminância e a quantidade e qualidade dos nutrientes afetam o metabolismo das microalgas e são decisivos tanto para a velocidade de multiplicação da espécie quanto para o perfil de produtos (NETO *et al.*, 2011).

2.3.1 Temperatura

Em geral, cada uma das espécies de microalgas é caracterizada por uma temperatura ótima de crescimento. Temperaturas de crescimento ideais permitem que a célula se submeta à fotossíntese sem modificar quaisquer parâmetros bioquímicos ou fisiológicos inerentes (RAS; STEYER; BERNARD, 2013)

A influência da temperatura sobre a fotossíntese é causada pelo estado de ativação da enzima Rubisco. Esta enzima catalítica da fotossíntese está envolvida em vias

fisiológicas, fotossíntese e fotorrespiração, com atividade de carboxilase e de oxigenase respectivamente (SALVUCCI; CRAFTS-BRANDNER, 2004).

Baixas temperaturas geralmente reduzem a atividade da Rubisco. Em ambientes com as temperaturas prevaletentes abaixo ou acima do ideal, os organismos se adaptam (morfológica, fisiológica, bioquímica e biofísica) para manter a integridade funcional. Tal modificação devido a condições de temperatura é geralmente chamada de aclimatação fotossintética (OQUIST, 1983).

O aumento da temperatura até a ideal tem um efeito positivo sobre a fotossíntese e a divisão celular. Esta tendência é explicada pelo aumento das atividades enzimáticas ligadas ao Ciclo de Calvin. Para temperaturas superiores à temperatura ideal, a taxa de crescimento das microalgas diminui drasticamente. Isto é esclarecido pelo *stress* de calor, que pode afetar as funcionalidades de enzimas (por inativação, desnaturação) ou modificar proteínas que estão envolvidas em processos fotossintéticos inibindo assim o crescimento (RAS; STEYER; BERNARD, 2013). Condições de *stress*, não só ocasionado por alteração da temperatura, ocasionam um desequilíbrio de energia e aumentam a produção de radicais livres. De modo a minorar o efeito destes compostos nocivos e, conseqüentemente, assegurar o crescimento, as células são capazes de gerar moléculas com propriedades anti-oxidantes. Os pigmentos, tais como beta-caroteno, são produzidos para eliminar os radicais livres (MOLLER *et al.*, 2000).

A mesma tendência foi encontrada por Xin, Hong-Ying e Yu-Ping (2011), quando estudaram o efeito da temperatura sobre o acúmulo de lipídeos em *Scenedesmus sp.* LX1, uma diminuição da temperatura de 25 para 20 °C aumentou o teor de lipídeos em 42 %, com uma pequena redução da taxa de crescimento celular (8 %). Em geral, as espécies resistem a flutuações de temperatura moderadas, com uma tendência que as temperaturas abaixo das temperaturas favoráveis para o crescimento seriam favoráveis para o acúmulo de lipídeos.

A temperatura é um fator muito importante para atividades metabólicas e de crescimento de microalgas. Entretanto, é também um fator de fácil controle no cultivo de microalgas (XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011). As condições de temperatura, em conjunto com outros fatores ambientais, são capazes de direcionar a produção de determinados tipos de componentes em células de microalgas, confirmando a necessidade de seu controle em cultivos (RAS; STEYER; BERNARD, 2013).

2.3.2 pH

Muitas enzimas são altamente dependentes do pH e se tornam inativas em pH ácido. As algas acidófilas desenvolveram várias estratégias para a manutenção do pH citosólico neutro, que resultam em maior demanda de energia na célula e, portanto, diminuem as taxas fotossintéticas sob pH ácido. As condições extremas de pH influenciam a fotossíntese, o crescimento e a assimilação de nutrientes em algas intolerantes a condições ácidas, uma vez que o processo de regulação do pH interno requer energia, sendo esta desviada de outros metabolismos (GERLOFF-ELIAS; SPIJKERMAN; PROSCHOLD, 2005; LANE; BURRIS, 1981).

A introdução de CO₂ no meio diminui o pH pois ocasiona a hidrólise da água e forma o bicarbonato. A forma de carbono inorgânico é relevante para o sistema celular, enquanto sua concentração é importante para as taxas de fotossíntese. A maioria dos produtores primários aquáticos possuem metabolismos para suportar elevadas concentrações de CO₂ através do Ciclo de Calvin, situação na qual a função oxigenase da Rubisco é suprimida, mesmo quando o fluxo de fótons é alto. A maioria das algas pode regular de forma eficaz estes mecanismos de concentração de CO₂ (IHNKEN *et al.*, 2014).

2.3.3 Nutrientes

Os nutrientes (macronutrientes, micronutriente e vitaminas) possuem diversas funções no metabolismo das algas e são requeridos em diferentes concentrações. Alguns são essenciais por serem constituintes estruturais de biomoléculas, membranas e do meio intracelular, por participarem de processos de trocas energéticas, por regular atividades metabólicas, dentre outras funções. Cada nutriente tende a ter várias funções para as algas, e sua insuficiência pode comprometer processos distintos para o organismo (LOURENÇO, 2006).

Carbono

Um dos elementos essenciais para as algas é o carbono, o qual é requerido em elevadas concentrações, pelo fato de fazer parte dos principais componentes sintetizados pela célula, como: proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e vitaminas (LOURENÇO, 2006).

Nos cultivos autotróficos as células de microalgas recebem energia luminosa e assimilam CO₂ fixando o carbono na forma de gliceraldeído-3-fosfato, que entra na via glicolítica através do Ciclo de Calvin. Nos cultivos heterotróficos algumas microalgas crescem na ausência de luz, utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono para biossíntese e energia. Nos cultivos mixotróficos as microalgas dispõem simultaneamente de compostos orgânicos, luz e CO₂ como fonte de carbono e energia (YANG; HUA; SHIMIZU, 2000)

Nitrogênio

O nitrogênio, após o carbono, é o elemento com maior participação, em termos quantitativos, na matéria seca das algas. O nitrogênio apresenta importância acentuada para as algas por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, sendo fundamental para três classes de substâncias estruturais das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintéticos (LOURENÇO, 2006).

Se o suprimento de nitrogênio é abundante nos cultivos, a tendência é de aumentar as concentrações de proteínas e clorofilas nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio disponíveis para microalgas são baixas, verifica-se a diminuição na taxa de divisão celular, além da redução da concentração de proteínas e clorofila (LOURENÇO, 2006). A redução no teor de nitrogênio no meio de cultivo intensifica a síntese de lipídios e carboidratos. Uma vez que o cultivo seja exposto à iluminação adequada, a fotossíntese continua sendo realizada a uma taxa reduzida, e o fluxo de carbono fixado é desviado à síntese de lipídios e carboidratos (SHIFRIN; CHISHOLM, 1981).

Durante o cultivo de *S. dimorphs* visando o acúmulo de lipídeos, houve uma redução do teor de proteínas de 33 % para 15 %, no decorrer de 10 dias, devido à redução do nutriente nitrogênio (WANG *et al.*, 2013). Schulze *et al.* (2016) estudaram a redução gradual do nível de nitrogênio no meio de cultivo, e verificaram um decréscimo no teor de proteínas de 39,5 % para 11 %, mostrando outra vez a influência do nitrogênio no metabolismo proteico, desta vez a cepa estudada foi *Scenedesmus obtusiusculus*.

Pancha *et al.* (2014) em seus estudos com *Scenedesmus sp.* CCNM 1077 apontam um aumento no teor de carboidratos de 18 % para 45,75 % alterando as condições do meio de cultivo. Este aumento no teor dos carboidratos foi observado no terceiro dia após remoção total do nitrogênio. Chen *et al.* (2013) ao avaliarem o cultivo de *S. obliquus* verifica que os cultivos atingiram teores de 46,65 % de carboidrato quando submetida a

um dia na ausência de nitrogênio. Schulze *et al.* (2016) encontraram níveis de 27 % a 45 % de carboidratos para *S. obtusiusculus* em diferentes condições de cultivo, atingindo as maiores concentrações de carboidratos com redução do nitrogênio correspondente na faixa de 25 % a 5 % da concentração original do meio de cultivo, no décimo dia de cultivo (sendo o referente a cinco dias após o consumo total do nitrogênio do meio).

Fósforo

Processos que envolvem trocas energéticas nas células estão associados ao fósforo. Adenosina trifosfato (ATP), açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas são os principais componentes estruturais que apresentam fósforo em algas. O fósforo possui duas funções fundamentais na célula: transferir energia e constituir moléculas estruturais (LOURENÇO, 2006).

Em cultivos, o fósforo tende a ser adicionado aos meios de cultura como fosfatos ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4) ou como pentóxido de fósforo (P_2O_5) (LOURENÇO, 2006). A restrição deste nutriente afeta o metabolismo de energia dos micro-organismos, resultando na diminuição da síntese de proteínas e acúmulo de metabólitos de reserva, como carboidratos e/ou lipídios (MARKOU, 2012).

Em *S. obliquus* cultivada com diferentes teores de nitrogênio e fósforo, nos quatro primeiros dias do cultivo, os teores de proteínas reduziram rapidamente de 52,8 % para em média 17,9 % em todas condições de escassez de nitrogênio, mostrando que o nitrogênio é fator essencial para a síntese proteica. Com a redução de fósforo, observou-se um pequeno declínio nos teores de proteínas, o que pode ser explicado pela falta de energia metabólica (ATP) ocasionada pela redução do fósforo (CHU *et al.*, 2014).

Micronutrientes

O principal papel dos micronutrientes é participar da estrutura e da atividade de diversas enzimas como cofatores. Outra função genérica dos micronutrientes é a participação na estruturação de certas organelas celulares, como os ribossomos. Muitos metais classificados como micronutrientes podem ser tóxicos às algas se encontrados em concentrações elevadas (LOURENÇO, 2006). A Tabela 2.2 apresenta alguns micronutrientes e síntese das suas funções metabólicas.

Tabela 2.2. Funções biológicas de alguns micronutrientes para as microalgas.

Elemento	Funções conhecidas ou prováveis
Cobre	Transporte de elétrons na fotossíntese; enzimas; necessário para síntese de clorofila
Manganês	Transporte de elétrons no fotossistema II; manutenção da estrutura da membrana no cloroplasto
Molibdênio	Redução de nitrato; absorção iônica; fixação de nitrogênio gasoso
Selênio	Co-fator de enzimas peroxidases
Sódio	Ativação enzimática, balanço da água
Zinco	Diversas enzimas; proteínas estruturais; estrutura do ribossomo; necessário para a síntese de triptofano

Fonte: Adaptado de Lobban, Harrison, (1994) *apud* Lourenço, (2006)

Vitaminas

Diversas espécies de algas podem sintetizar as vitaminas que necessitam, porém para obter cultivos com maiores densidades celulares é necessária a adição de três vitaminas importantes para as algas: timina (vitamina B₁), biotina (vitamina H) e cianocobalamina (vitamina B₁₂). A timina age como coenzima no processo de respiração celular. A biotina é transportadora de CO₂, e a cianocobalamina está envolvida como cofator para a síntese de metionina (LOURENÇO, 2006).

2.3.4 Iluminância

Iluminância é a quantidade de luz que incide sobre a superfície, medida em lux por equipamentos específicos, como por exemplo o luxímetro (SCHREDER, 2017).

A fotossíntese pode ser afetada pela quantidade de energia disponível (intensidade luminosa); pela periodicidade do suprimento (fotoperíodo) e pela composição do espectro de radiação (FREITAS, 2012). A disponibilidade da luz é um dos principais problemas observados no cultivo fotoautotrófico de microalgas, uma vez que a luz precisa ser continuamente fornecida ao sistema, pelo fato de que não pode ser acumulada (GRIMA *et al.*, 1996).

À medida que a concentração celular muda, os requisitos de luz mudam também. O crescimento de algas é limitado pela baixa intensidade luminosa, mas seu excesso pode

ser prejudicial. Organismos fotoautotróficos devem receber luz suficiente para exceder seu ponto de compensação para proporcionar o seu crescimento. Aumentar a intensidade luminosa para além do ponto de compensação resulta num aumento da taxa de crescimento e intensidades de luz mais elevadas podem levar à fotoinibição (ANDERSEN, 2005).

A fotoinibição pode ocorrer quando níveis extremos de iluminância incidem no cultivo de microalgas, podendo acarretar em fenômenos desfavoráveis ao crescimento celular. A fotoinibição ocorre quando o fluxo de fótons absorvido nos tilacóides provoca uma concentração de elétrons de alta energia na célula excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com água e formam peróxido de hidrogênio, tóxico às células (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

2.4 Métodos Analíticos para Caracterização da Biomassa

Cultivos de microalgas são realizados objetivando a síntese de inúmeros produtos, sendo as condições do cultivo e a cepa utilizada determinantes para o rendimento do metabólito de interesse. Assim, é importante o acompanhamento dos cultivos, o qual comumente é realizado através de análises *offline*, o que implica em retirada de amostras e análises posteriores, causando um atraso no conhecimento das condições atuais do processo. O monitoramento do cultivo em tempo real visa atender as necessidades da biotecnologia e proporcionar amparo à implementação dos cultivos de microalgas. Uma vez que, havendo maior controle e entendimento sobre a síntese dos compostos de interesse, estes produtos poderão ser extraídos e utilizados de maneira mais apropriada, acarretando em melhor aplicabilidade do cultivo em questão.

2.4.1 Métodos Tradicionais

Segundo Lourenço (2006), as medidas mais usuais para aferir o crescimento celular são: contagem de células por microscopia, contagem de células por contadores automáticos, medidas de densidade óptica, avaliação por gravimetria (peso seco) e medidas de composição química.

As medições de proteínas e carboidratos, as quais são amplamente utilizadas para biomassa de microalgas, consistem geralmente em métodos colorimétricos. Baseiam-se na variação de cor do sistema inerente aos compostos presentes na amostra ou em relação às reações químicas geradas pela adição de reagentes. A colorimetria tem como objetivo

determinar a concentração de substâncias através da absorção relativa da luz, padronizadas por concentrações conhecidas (VOGEL, 1989).

Este princípio é aplicado para a quantificação de proteínas como, por exemplo, no método descrito por Lowry *et al.* (1951), que consiste na redução do reagente Folin-Ciocalteu (mistura contendo ácido fosfórico, sais de molibdato e tungstato) na presença de proteínas e do cobre (Cu^{2+}), que atua como catalisador. A reação produz um composto com absorção no comprimento de onda de 750 nm (SANTOS, 2012). Este método é utilizado por diversos autores para a quantificação de proteínas a partir da biomassa de microalgas (ANSARI *et al.*, 2015; BARBARINO; LOURENÇO, 2005; LÓPEZ *et al.*, 2010; SAFI *et al.*, 2014; SRIRANGAN *et al.*, 2015; URSU *et al.*, 2014).

No método de Bradford (1976) ocorre também reação colorimétrica onde o corante azul brilhante de Coomassie liga-se a proteínas, principalmente por resíduos de arginina. A ligação entre o corante e os aminoácidos é atribuída a forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (BARBARINO; LOURENÇO, 2005)

O método Kjeldahl determina a concentração de nitrogênio total por análise elementar. É menos suscetível a interferências, mas fatores de conversão devem ser estabelecidos para relacionar o nitrogênio medido com a quantidade de proteína (LÓPEZ *et al.*, 2010). O método de Kjeldahl baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para a digestão até que o carbono e nitrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio e posteriormente ocorre a destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada (ANDRADE; OLIVEIRA; KICH, 2013; CECCHI, 2003).

Da mesma forma, análises colorimétricas são utilizadas para quantificar carboidratos pelo método de Dubois *et al.* (1956). Este se baseia na desidratação dos carboidratos pelo ácido sulfúrico e posterior complexação dos produtos formados com fenol. Tal adição acarreta a coloração amarelo-alaranjada na solução, sendo esta determinada por espectroscopia em um comprimento de onda de 490 nm (SILVA *et al.*, 2003). Para microalgas, há relatos na literatura da utilização deste método para quantificação dos carboidratos (ARRIADA, 2014; MAYERS; FLYNN; SHIELDS, 2013; PLEISSNER *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015). Pelo método de Miller (1959) são quantificados os açúcares redutores a partir da redução do reagente ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) pelo açúcar, que por meio da análise espectrofotométrica é quantificado através da reação colorimétrica gerada.

O extrator Soxhlet permite que os lipídeos sejam extraídos a quente que trabalha com um refluxo descontínuo e intermitente de solvente com a vantagem de evitar a temperatura alta de ebulição do solvente, pois a amostra não fica em contato direto com o solvente quente, evitando assim a decomposição da gordura na amostra. Os dois solventes mais utilizados são o éter de petróleo e o éter etílico. Este método utiliza grandes quantidades de solventes porque o volume total tem que ser suficiente para atingir o sifão do extrator de Soxhlet (CECCHI, 2003).

O método de Folch, Lees e Stanley (1957), empregado para extração e quantificação de lipídeos, utiliza uma mistura de clorofórmio e metanol (na proporção 2:1), seguido da adição da solução salina de KCl, para obter uma melhor separação da fase lipídica. Bligh e Dyer (1959) modificaram o metodologia de Folch a fim de obter um método mais rápido. Este último é utilizado com frequência para biomassa de microalgas (ANSARI *et al.*, 2015; ARRIADA, 2014; LI *et al.*, 2010; SHEKH *et al.*, 2016; TOYOSHIMA; SATO, 2015), visto que proporciona a extração dos lipídeos a partir de biomassa com alto teor em água. A presença de água enfraquece a parede celular pela energia liberada durante a evaporação, o que facilita a extração por solventes orgânicos (clorofórmio e metanol) (ARAUJO, 2011). Este método apresenta as seguintes vantagens frente às extrações a quente: (1) extrai todas as classes de lipídeos, inclusive os polares; (2) os lipídeos são extraídos sem aquecimento; (3) podem ser utilizados para biomassas com altos teores de umidades ou secas; (4) não necessita de equipamentos especializados e sofisticados (CECCHI, 2003). Ambas as técnicas de extração citadas utilizam a gravimetria para a quantificação dos lipídeos.

Os métodos tradicionais geram perda das amostras pelo fato de serem baseados em reações químicas para a quantificação do metabólito de interesse e ainda são análises específicas e demoradas. Com isso, técnicas que sejam ágeis e não degradem a amostra vêm sendo estudadas para a caracterização da biomassa de microalgas.

2.4.2 Métodos Alternativos

Métodos óticos envolvem medidas baseadas na luz e outras formas de radiação eletromagnética. O objetivo principal do estudo da espectroscopia são as interações da radiação com a matéria. Métodos espectroscópicos analisam a intensidade da radiação emitida ou absorvida por moléculas, íons e átomos de interesse. Estes métodos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvido na medida (SETTLE, 1997).

O maior apelo para o uso de métodos ópticos como técnicas analíticas se deve a sua: (1) rapidez, especialmente em ambientes industriais onde o tempo é essencial; (2) baixa necessidade de preparo de amostras, uma vez que, em geral, são técnicas não destrutivas, e (3) a possibilidade do desenvolvimento de sensores em linha (*in situ*) evitando a perda de informação estrutural devido a etapas de separação química e/ou física (WELLNER, 2013).

Entre os métodos espectroscópicos de maior destaque no ramo industrial, é possível citar espectroscopia de luminescência molar (incluindo medidas por fluorescência, fosforescência e quimiluminescência), a espectroscopia vibracional (espectrometria no infravermelho próximo, médio e distante) e as técnicas baseadas em espectroscopia Raman (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Apesar da espectroscopia de infravermelho médio (MIR), infravermelho próximo (NIR) e Raman serem diferentes em vários aspectos, estas possuem o mesmo princípio, isto é, compostos químicos podem ser identificados por alterações vibracionais das moléculas através de sinais em espectros. A Figura 2.2 mostra as diferentes energias de ativação, necessárias para cada análise. No entanto, enquanto a espectroscopia de Raman é uma técnica de espalhamento, MIR e NIR são baseadas na absorção da radiação (BURNS; CIURCZAK, 2007).

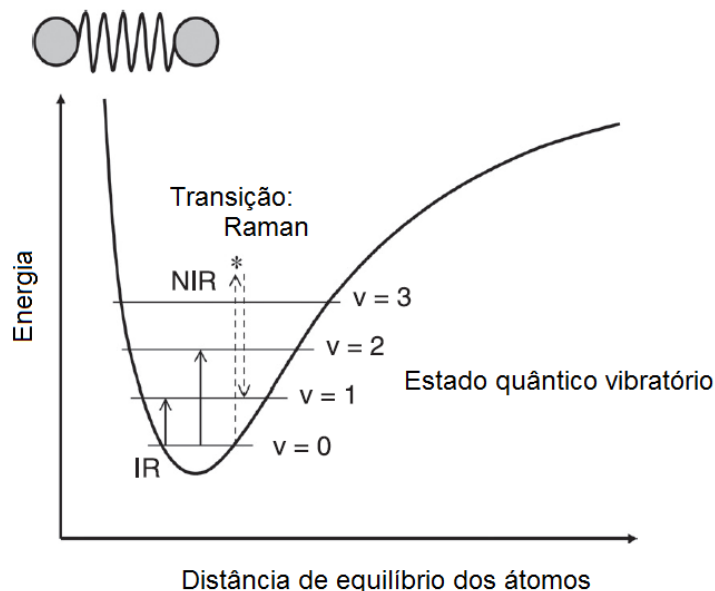


Figura 2.2. Desenho esquemático de uma função de potencial vibracional e do nível de energia. Fonte: Wellner (2013)

As diferentes condições de excitação das espectroscopias Raman, MIR e NIR levam a intensidades de sinal extremamente diferentes entre estas técnicas para a mesma vibração molecular específica. Estas diferentes condições de excitação conduzem à complementaridade do Raman e MIR como ferramentas de elucidação estrutural, uma vez que a espectroscopia Raman foca predominantemente em vibrações homonucleares (por exemplo, C = C, C - C, S - S), enquanto que as mais intensas absorções do MIR podem rastrear os grupos polares (por exemplo, C-F, Si-O, C = O e C-O-C) (BURNS; CIURCZAK, 2007).

A espectroscopia MIR, normalmente requer preparação da amostra antes da aquisição dos dados. Somente a técnica de reflexão total atenuada (ATR) evita longos procedimentos de amostragem (BURNS; CIURCZAK, 2007).

A fotoluminescência é um tipo de espectroscopia ótica na qual uma molécula é promovida a um estado eletrônico excitado por absorção de energia radiante. A molécula excitada retorna ao seu estado fundamental com a emissão de um fóton. Os processos de fotoluminescência são subdivididos em fluorescência e fosforescência. A espectroscopia de fluorescência, é um tipo de espectroscopia eletromagnética a qual analisa a fluorescência de uma amostra (SETTLE, 1997).

Espectroscopia Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho é uma técnica simples, rápida e não destrutiva, a qual pode ser utilizada na caracterização de compostos orgânicos. Assim como outros tipos de espectroscopia, ela se baseia em interações entre as moléculas ou átomos e a radiação eletromagnética, provocando vibrações de acordo com a amplitude das ligações covalentes existentes na molécula (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013).

Na região espectral do infravermelho (*IR* – do inglês *infrared*), ocorrem três categorias principais, baseadas nas suas três regiões espectrais. A região mais usada é a do MIR, que se estende entre 670 a 4000 cm^{-1} , cujos espectros são aplicados tanto para análise qualitativa como quantitativa. A região do infravermelho próximo (NIR), de 4000 a 14000 cm^{-1} , também é utilizada na determinação quantitativa. Já a região do infravermelho distante tem sido usada principalmente na determinação de estruturas de espécies inorgânicas e organometálicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Na espectroscopia no infravermelho, a frequência da radiação absorvida é resultado da frequência da vibração molecular que ocasiona o processo de absorção.

Tendo como fundamento a teoria corpuscular, a radiação eletromagnética que provoca as vibrações é quantizada, envolvendo fótons de energia específica, ou seja, pacotes de energia. A radiação infravermelho não possui energia suficiente para provocar transições eletrônicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), entretanto, a sua absorção ocorre em frequências específicas para cada grupo funcional, devido ao arranjo característico de átomos e ligações presentes na molécula (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013).

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e deformações angulares. Tais modos vibracionais podem ser simétricos ou assimétricos. Uma vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação que faz com que a distância interatômica aumente e diminua alternadamente. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas de ligações que têm um átomo em comum ou ao movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem. Somente as vibrações que levam à alteração rítmica do momento de dipolo da molécula são observadas no infravermelho convencional. As bandas características de grupamentos químicos úteis para a identificação da estrutura molecular envolvem frequentemente vibrações acopladas. Interações de acoplamento ocorrem entre deformações axiais, entre deformações angulares, ou entre deformações axiais e angulares. Podem ocorrer também interações entre modos fundamentais e modos harmônicos ou modos de combinação (STUART, 2004)

Muitas das absorções de grupos funcionais químicos variam em uma larga faixa porque as bandas provêm de interações complexas com moléculas. As bandas de absorção correspondem predominantemente a um único modo vibracional. Certas bandas de absorção permanecem razoavelmente fixas no espectro como, por exemplo, as provenientes dos modos de deformação axial de C-H, O-H e C=O, independentemente de possíveis interações. A posição exata da banda de absorção e as mudanças nos contornos das bandas revelam detalhes importantes da estrutura da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

As duas bandas mais importantes para o exame preliminar dos espectros são as regiões de 900 a 650 cm^{-1} e de 4000 a 1300 cm^{-1} . A ausência de bandas fortes na região de 900 a 650 cm^{-1} indica geralmente que a estrutura em questão não contém anéis aromáticos. A região de 4000 a 1300 cm^{-1} é chamada região dos grupos funcionais, na qual ocorrem as absorções que correspondem a grupos funcionais importantes, como O-H, N-H e C=O. A região intermediária do espectro, de 1300 a 900 cm^{-1} , é usualmente

conhecida como a região da “impressão digital”. O espectro nela observado é, com frequência, complexo e com as bandas se originando de modos de vibração acoplados. A absorção nessa região intermediária é provavelmente diferente para diferentes espécies moleculares (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Na década de 1980, a maioria dos equipamentos disponíveis para análises por MIR era do tipo dispersivo que utilizavam redes de difração. Atualmente, a maioria dos espectrofotômetros de infravermelho é do tipo transformada de Fourier (FTIR). Este tipo de espectrômetro ampliou a utilização de equipamentos de análises na região do infravermelho devido à obtenção de melhor relação sinal/ruído e menores limites de detecção (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Subsequentemente, tais instrumentos serão detalhados.

Instrumentos para o Infravermelho

Três tipos de instrumentos para medidas de absorção no infravermelho estão disponíveis no mercado: (1) espectrofotômetros dispersivos, que empregam monocromador baseado em rede de difração; (2) espectrômetros com transformada de Fourier, que empregam um interferômetro; e (3) fotômetros não-dispersivos que empregam um filtro ou gás absorvente, que são usados para análises de gases (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), este último não será discutido a seguir, por analisar amostras gasosas, as quais não serão utilizadas neste trabalho.

Instrumentos dispersivos

A maioria dos equipamentos dispersivos disponíveis são equipamentos de feixe duplo que utilizam redes de difração. Há preferência pela utilização deste tipo de equipamento em relação ao feixe simples, pois água e gás carbônico atmosféricos são absorvidos nessa região espectral, podendo gerar interferências e a utilização de um feixe de referência é capaz de compensar tal absorção. A utilização de feixe duplo é importante também devido à baixa intensidade das fontes de infravermelho, à baixa sensibilidade dos transdutores e à necessidade de amplificação do sinal. Os equipamentos dispersivos exigem baixas taxas de modulação pelos longos tempos de resposta dos transdutores infravermelho. Após a dispersão por um prisma, a radiação incide no transdutor que converte em sinal elétrico os feixes incididos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Instrumentos com Transformada de Fourier

A espectrometria FTIR foi desenvolvida a fim de superar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos. A principal dificuldade era o lento processo de varredura. Um método para medir todas as frequências de infravermelho simultaneamente, ao invés de individualmente, era necessário. Isso levou ao emprego do interferômetro (SUN, 2009 *apud* ALISKE, 2010), que nada mais é que um dispositivo utilizado para modular um sinal de alta frequência para um sinal de frequência mensurável (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Na espectroscopia FTIR, radiação contendo todos os comprimentos de onda de interesse (4000 a 400 cm^{-1} , por exemplo) é separada em dois feixes. Um deles permanece fixo e o outro se move com o espelho móvel. Fazendo variar as distâncias percorridas pelos dois feixes, obtém-se uma sequência de interferências construtivas e destrutivas e, conseqüentemente, variações na intensidade de radiação recebida pelo detector, o chamado interferograma. Uma transformada de Fourier converte o interferograma obtido, que está no domínio do tempo, para a forma mais familiar de um interferograma no domínio da frequência. Passando a radiação pela amostra, a transformada de Fourier em posições sucessivas do espelho móvel dá origem ao espectro completo de infravermelho. Como não se usam monocromadores em instrumentos FTIR, a totalidade da faixa de radiação passa simultaneamente pela amostra com enorme ganho de tempo, permitindo resoluções altas. Além disso, como os dados sofrem conversão analógico-digital, os resultados são manipulados facilmente. O resultado de várias varreduras é combinado para diminuir o ruído, e espectros excelentes podem ser obtidos com pequena quantidade de amostra (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Embora existam vários fabricantes de espectrômetros interferométricos, as características básicas dos modelos não apresentam diferenças marcantes de concepção. Estes equipamentos funcionam com o princípio do interferômetro de Michelson, que é um dispositivo que divide um feixe de radiação em dois feixes com aproximadamente a mesma potência e os recombina, de forma que as variações de intensidade do feixe resultante possam ser medidas em função das diferenças das distâncias percorridas pelos dois feixes. A Figura 2.3 representa um diagrama de um espectrômetro FTIR típico, em que a radiação com todas as frequências da fonte do infravermelho é refletida no interferômetro, a qual é modulada pelo espelho móvel da esquerda. A radiação modulada é então refletida pelos dois espelhos da direita através da amostra que está no compartimento na parte inferior. Após passar pela amostra, a radiação atinge o transdutor

e um sistema de aquisição de dados acoplado ao transdutor registra o sinal, armazenando-o na memória de um computador como um interferograma (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

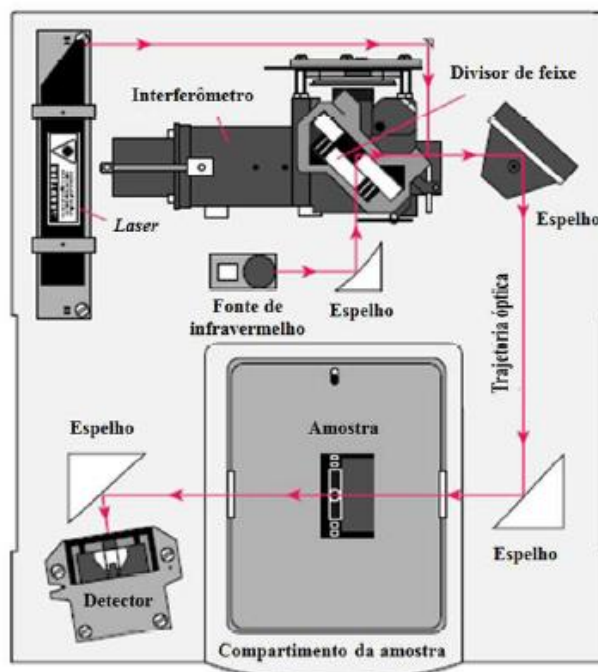


Figura 2.3. Ilustração esquemática do espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Fonte: Holler, Skoog e Crouch (2009)

Diversas vantagens são apresentadas pelo espectrômetro FTIR, entre elas pode-se citar, primeiramente, a vantagem de *Jaquinot*, que é relacionada à utilização de poucos elementos óticos e nenhuma fenda, permitindo uma melhora na relação sinal/ruído devido à maior potência de radiação que incide no detector. Outras vantagens são a alta resolução e reprodutibilidade do comprimento de onda, as quais permitem a análise de espectros complexos. Além disso, é possível a obtenção de dados para um espectro inteiro em segundos, devido ao fato de todos os elementos atingirem simultaneamente o detector. Existe ainda a vantagem de *Fellgett* ou *multiplex* em que todos os elementos de resolução para um espectro são medidos simultaneamente, reduzindo enormemente o tempo necessário para se obter um espectro com qualquer razão sinal/ruído selecionada (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

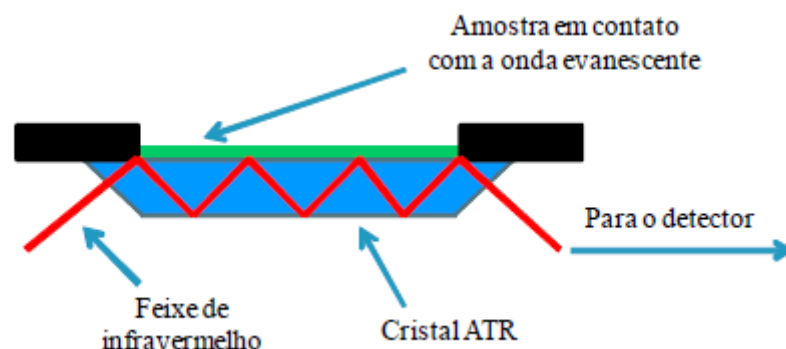
Espectrometria no Infravermelho Médio

O amplo uso da espectroscopia de infravermelho médio por químicos para identificar compostos orgânicos começou no final de 1950 com o aparecimento de espectrofotômetros de feixe duplo com registradores, baratos e de operação simples, que produziam espectros na região de 5000 a 670 cm^{-1} . O aparecimento deste tipo de instrumento e dos espectrômetros de ressonância magnética nuclear e massas revolucionou a forma dos químicos identificarem espécies orgânicas, inorgânicas e biológicas. Repentinamente, o tempo necessário para realizar uma análise qualitativa ou uma determinação estrutural foi substancialmente reduzido (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A espectrometria de reflexão no MIR apresenta várias aplicações na análise de substâncias sólidas. Os espectros fornecem as mesmas informações que os espectros de absorção, podendo ser utilizado em análises qualitativas e quantitativas. A reflexão da radiação pode ser de quatro tipos: reflexão especular; reflexão interna; reflexão difusa e reflexão total atenuada (ATR). Os dois últimos são mais amplamente utilizados e serão descritos a seguir. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009)

A espectrometria de reflexão (ou reflectância) difusa no FTIR é uma técnica utilizada para a obtenção de espectros diretamente de amostras pulverizadas, sem pré-tratamento. O seu uso foi intensificado após a década de 1970, com a disponibilização de equipamentos com transformada de Fourier, pois a radiação reflexiva possui baixa intensidade para ser medida em equipamentos dispersivos. A reflexão difusa acontece quando a radiação incide sobre a superfície finamente dividida de um pó e ocorre a reflexão especular em cada superfície plana. Entretanto, as partículas estão organizadas de forma aleatórias e a radiação é refletida em todas as direções (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A ATR é a técnica de reflexão amplamente usada no MIR, apresentando grande versatilidade na análise de amostras sólidas e líquidas, podendo ser empregada em amostras de difícil manipulação, como as de solubilidade limitada e pós. Este tipo de reflexão baseia-se na passagem de um feixe de radiação de um meio mais denso para outro meio menos denso, ocorrendo, então, a reflexão. A fração refletida do feixe incidente aumenta com o aumento do ângulo de incidência; além de um ângulo crítico específico, a reflexão é completa (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). A Figura 2.4 apresenta um esquema típico de uma célula de ATR.



Fonte: PERKIN ELMER (2005)

Figura 2.4. Esquema de um sistema de reflectância total atenuada (ATR) de reflexão múltipla.

O meio mais denso é o cristal de ATR, que faz parte do acessório, e o meio menos denso é a amostra analisada. Um acessório de ATR opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe de infravermelho que sofre reflexão interna total, ao entrar em contato com a amostra. Essa reflectância interna cria uma onda evanescente que se estende para além da superfície do cristal no interior da amostra mantida em contato com o cristal. Tal onda evanescente sobressai apenas poucos microns (0,5 a 5 μm) além da superfície cristalina e no interior da amostra. Em regiões do espectro de infravermelho onde a amostra absorve energia, a onda evanescente será atenuada ou alterada. A energia atenuada de cada onda evanescente retorna para o feixe de infravermelho, que então sai pela extremidade oposta do cristal e atinge o detector do espectrômetro, gerando o espectro de infravermelho (PERKINELMER, 2005).

Aplicação de FTIR em microalgas

Neste tópico se buscou contextualizar a utilização do FTIR aplicado às microalgas. Os espectros obtidos a partir dos padrões, conforme apresentado na Figura 2.5, Figura 2.6 e Figura 2.7, possibilitam vincular os picos principais com as ligações químicas majoritárias constituintes de cada molécula, permitindo a identificação das principais bandas características de absorção das ligações químicas de interesse (em destaque nas figuras pelas barras). Os lipídeos possuem banda de absorção entre 3000-2800 cm^{-1} representando o estiramento assimétrico C-H da vibração da cadeia acila (derivado de um ácido carboxílico), (DIFUSA; MOHANTY; GOUD, 2016). A banda de 1730-1740 cm^{-1} também é característica de lipídeos, representando a vibração do

estiramento do grupo de funções éster C=O (GIORDANO *et al.*, 2001; SOCRATES, 2004), ambas as regiões destacadas na Figura 2.5. Segundo Socrates (2004) os lipídeos ainda apresentam sinal forte em 1085 cm^{-1} (estiramento simétrico PO_2^-), 1070 cm^{-1} (estiramento simétrico CO-O-C), 1045 cm^{-1} (estiramento C-O-P); além disso, o sinal de forte a médio em 3030-3020 cm^{-1} (estiramento assimétrico CH_3), 3010 cm^{-1} (estiramento =C-H), 2955 cm^{-1} (estiramento assimétrico CH_3), 2930 cm^{-1} (estiramento assimétrico CH_2), 2880 cm^{-1} (estiramento simétrico CH_3), 2850 cm^{-1} (estiramento simétrico CH_2).

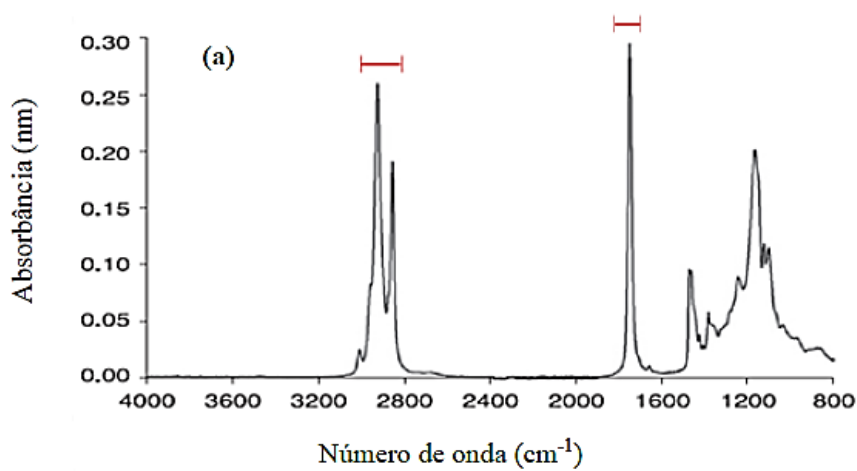


Figura 2.5. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de lipídeos, sendo utilizado óleo de oliva.

Giordano *et al.* (2001) avaliaram espectros de amido, que exibem bandas intensas em aproximadamente 1024 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} , e 1050 cm^{-1} , que são características das vibrações de alongamento de C-O a partir de carboidratos. Para Feng *et al.* (2013) picos de vibração em 1200-1000 cm^{-1} se devem a alongamentos de C-OH e C-O-C. Socrates (2004) indica fortes absorções nas regiões de 1160-1000 cm^{-1} , relativo ao estiramento de carboidratos C-O; 1200-1030 cm^{-1} referente estiramento de C-O em piranose (monossacarídeos cíclico) e vibrações simétricas (alfa-piranose) em 985-955 cm^{-1} . Já com média intensidade do sinal, ocorre a deformação C-H de carboidratos em 960-730 cm^{-1} ; deformação CH_2 (alfa-piranose) e de vibrações de estiramento (beta-piranose) em 975-960 cm^{-1} . A Figura 2.6 destaca a região que compreende as bandas características de absorção citadas.

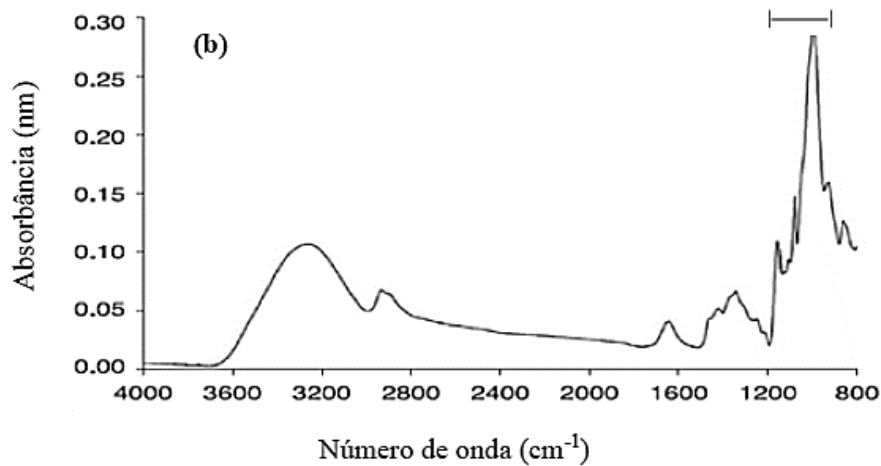


Figura 2.6. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de carboidratos, sendo utilizado amido de trigo.

Em geral, as proteínas e os peptídeos têm bandas largas e fortes que, devido a uma sobreposição considerável, são difíceis de diferenciar. A razão para isto é o grande número de aminoácidos diferentes que formam uma proteína complexa. As bandas mais fortes nos espectros infravermelhos das proteínas são as bandas de amida I e II em aproximadamente 1655 e 1565 cm^{-1} , respectivamente (SOCRATES, 2004), destacadas na Figura 2.7. A banda de amida I é devido principalmente às vibrações de estiramento da carbonila ligada à amida, e a amida II é relacionada principalmente às vibrações de N-H (GIORDANO *et al.*, 2001) Aminoácidos, proteínas e peptídeos apresentam sinal forte na faixa de $1595\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ devido às alfa-amino carboxilases ($\text{R}_2\text{N-CH}_2\text{-COO}^-$) (SOCRATES, 2004).

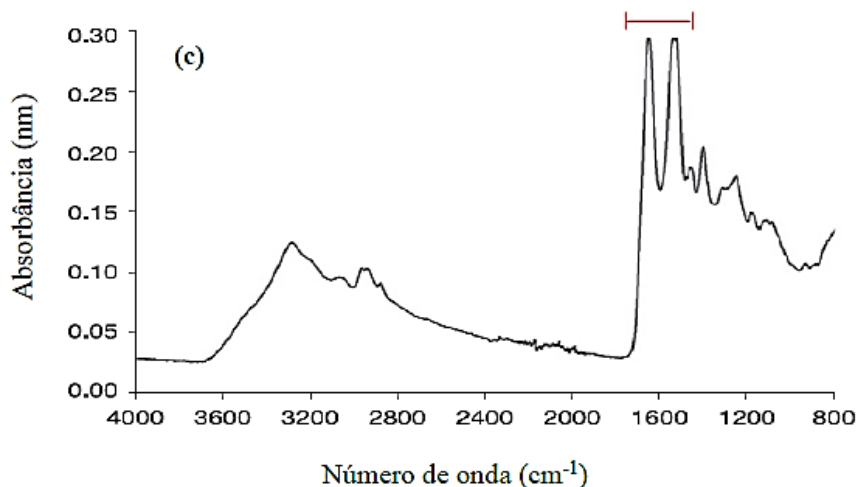


Figura 2.7. Espectro obtido por Wellner (2013) para padrão de proteínas, sendo utilizado albumina do soro bovino.

Alguns dos estudos relacionados à espectroscopia infravermelho e microalgas são descritos a seguir. Meng *et al.* (2014) utilizaram a técnica de ATR na região do MIR para caracterizar a biomassa das microalgas (*Porphyridium cruentum*, *Tetraselmis subcordiformis*, *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis sp.*, espécie desconhecida denominada H16, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*) quanto ao teor de lipídeos, carboidratos e proteínas. O pico característico da proteína amida I (1728–1578 cm^{-1}) foi escolhido como padrão interno para posterior quantificação dos resultados. Assim, a área obtida para os picos de lipídeos (3000-2800 cm^{-1}) e carboidratos (1200-950 cm^{-1}) foi dividida pela área de amida I e relacionada com o percentual avaliado nas análises tradicionais. Com esta relação, os autores obtiveram correlações boas tanto para a avaliação de lipídios por FTIR quanto para carboidratos, sendo o coeficiente de correlação (R^2) de 0,951 e 0,962 respectivamente.

Feng *et al.* (2013) também utilizaram FTIR para avaliar o teor de lipídeos, proteínas e carboidratos em *Chlorella pyrenoidosa*, *Nannochloropsis sp.* e *Chlorella vulgaris* a partir das bandas de absorção, 3000-2800 cm^{-1} , 1700-1500 cm^{-1} e 1200-1000 cm^{-1} , respectivamente. Este estudo não apresentou modelos para a correlação dos métodos utilizados para medição e, ainda, possui diferença significativa entre a quantificação pelo FTIR e os métodos utilizados para comparação. Porém, ambos os estudos citados até agora, consideram bandas características muito próximas para quantificação das moléculas analisadas.

Difusa, Mohanty e Goud (2016) avaliaram os extratos dos lipídeos da biomassa de *Chloromonas sp.* no FTIR para determinar por meio de técnicas quimiométricas as bandas de absorção características para os lipídeos no MIR. O espectro FTIR acoplado com análise multivariada demonstrou a aplicabilidade das regiões espectrais selecionadas (3000–2800 cm^{-1} e 1800–1000 cm^{-1}).

Sundaramoorthy *et al.* (2016) avaliaram descontaminação do efluente de curtume, quanto à adsorção de cromo, avaliando a biomassa das microalgas antes e após o cultivo em contato com o efluente. Assim, foi possível detectar a interação de íons de metais pesados com os grupos funcionais da biomassa das microalgas por FTIR.

Dean, Nicholson e Sigee (2008) utilizaram a técnica de FTIR para avaliar a alocação de carbono durante o cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*. Todos os autores abordam que a espectroscopia FTIR possui potencial aplicação para a caracterização da biomassa de microalgas.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Manutenção da Microalga

A microalga utilizada foi a *Scenedesmus sp.*, da coleção do Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esta foi mantida a temperatura de 25°C, fotoperíodo 12 h claro/escuro e com aeração proveniente do ar atmosférico. O meio de cultivo utilizado foi o *Guillard* Modificado (GM), proposto por Ramirez (2013), cuja composição está disposta na Tabela 3.1

Tabela 3.1. Composição do meio de cultivo *Guillard* Modificado.

Macronutrientes	mg.L ⁻¹	Micronutrientes	mg.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	367,6	Na ₂ EDTA	43,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	369,7	FeCl ₃ *6H ₂ O	31,5
NaHCO ₃	126	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,1
K ₂ HPO ₄	87,1	ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,22
NaNO ₃	850,1	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,1
Na ₂ SiO ₃ .9 H ₂ O	284,2	MnCl ₂ *4H ₂ O	1,8
		Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,06

3.2 Cultivo de *Scenedesmus sp.*

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores fechados de 4,5 L de volume útil, com agitação contínua através da injeção de ar atmosférico na vazão de 0,5 L.min⁻¹. A condição inicial foi definida por uma mistura de 10 % (em volume) do inóculo e 90 %

de meio de cultivo GM, totalizando 4,5 L (100 %). Os cultivos foram mantidos a 20°C (XIN; HONG-YING; YU-PING, 2011) durante 10 dias e a iluminância média foi de 8470 lux com fotoperíodo de 24 h claro. O inóculo foi adaptado durante 10 dias na condição central do planejamento experimental descrito a seguir.

Os cultivos foram realizados variando a concentração de carbono (C), nitrogênio na forma de nitrato (NO₃) e fósforo como fosfato (PO₄), de acordo com o planejamento experimental fatorial 2³ com duplicata no ponto central, cujas condições estão dispostas na Tabela 3.2. Este planejamento de experimentos foi realizado visando alterar os teores de proteínas, carboidratos e lipídeos, através da variação dos nutrientes durante o cultivo. A partir destas variações, será obtido um modelo matemático descrito no item 3.4, que permitirá o monitoramento do cultivo de microalgas. As variações dos teores dos metabólitos de interesse obtidas nos diferentes experimentos do planejamento definirão os limites de validade dos modelos obtidos.

Tabela 3.2. Matriz dos ensaios gerada pelo delineamento fatorial 2³, com seus níveis codificados e reais.

Experimentos	Codificados			Reais		
	C	NO ₃	PO ₄	NaHCO ₃	NO ₃	PO ₄
				[g/L ⁻¹]	[mg/L ⁻¹]	[mg/L ⁻¹]
1	-1	-1	-1	6,48	141,44	10,73
2	1	-1	-1	173,17	141,44	10,73
3	-1	1	-1	6,48	498,63	10,73
4	1	1	-1	173,17	498,63	10,73
5	-1	-1	1	6,48	141,44	38,17
6	1	-1	1	173,17	141,44	38,17
7	-1	1	1	6,48	498,63	38,17
8	1	1	1	173,17	498,63	38,17
9	0	0	0	11,90	320,04	24,45
10	0	0	0	11,90	320,04	24,45

Os valores para carbono foram baseados no estudo de Chiranjeevi e Mohan (2016), em que cultivou microalgas não isoladas, utilizadas como uma mistura. Obteve a máxima concentração de lipídeo com 30 g.L⁻¹ de glicose o que corresponde a 1000 mg.L⁻¹

de C. No presente estudo foi extrapolada esta condição para avaliar a influência de maiores concentrações de carbono.

Quanto aos valores estipulados de NO_3 e PO_4 , estes foram baseados em Hakalin *et al.* (2014) que cultivaram de *Scenedesmus sp.* visando a produção de lipídeos. Os autores utilizaram o meio de cultivo ASM-1 com modificações nos teores de nitrogênio, fósforo e vitamina, obtendo as melhores condições para o aumento dos teores de lipídeos com redução de nitrogênio e fósforo frente ao meio original (ASM-1), sendo com 37,6 % e 37,5 % respectivamente. Levando em conta que o meio de cultivo utilizado nesta dissertação (GM) possui concentrações superiores de NaNO_3 e K_2HPO_4 do que o meio citado ASM-1, foi realizada uma redução percentual nestes nutrientes frente as concentrações originais do meio GM, variando de 19,5 a 77,2 % para NO_3 e 15,0 a 59,3 % para PO_4 . Estes valores foram determinados para abranger, em redução percentual, os melhores resultados relatados por Hakalin *et al.* (2014).

Seguindo o planejamento de experimentos, foram realizados 10 experimentos, dos quais diariamente foram amostrados para realizar análise no infravermelho, leitura de pH, avaliação da concentração celular, de carboidratos, e de proteínas. Já para os lipídeos, devido à quantidade de amostra necessária para a análise, os mesmos foram extraídos e quantificados apenas no primeiro e último dia de cada experimento. O fluxograma apresentado na Figura 3.1 sintetiza as análises realizadas.

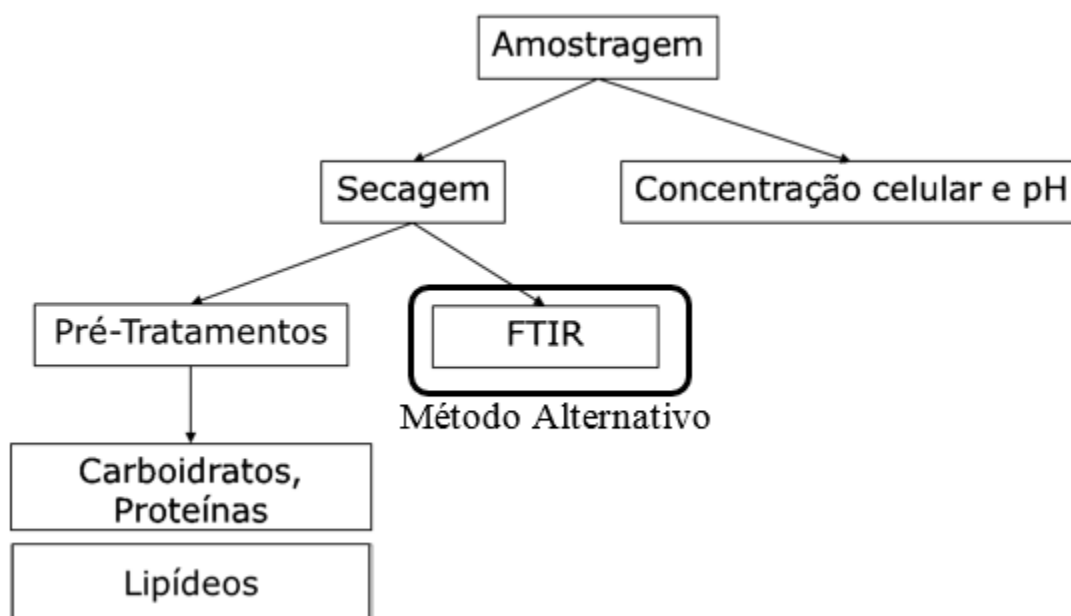


Figura 3.1. Fluxograma geral do procedimento realizado no laboratório.

3.3 Métodos Tradicionais

3.3.1 Crescimento Celular

O crescimento da biomassa foi monitorado diariamente, durante os 10 dias, através da amostragem de cada experimento. A concentração celular foi determinada pela leitura da densidade ótica das culturas em espectrofotômetro (T80+ UV/Vis, *PG instruments*) no comprimento de onda de 570 nm, e relacionados através da curva padrão de *Scenedesmus sp.*, conforme sugerido por Lourenço (2006).

Para execução da curva padrão, o cultivo foi realizado nas condições do ponto central do planejamento de experimentos. Diferentes diluições deste cultivo foram avaliadas quanto à densidade ótica e massa seca. Para tanto, 100 mL de cada diluição foi filtrada através do microfiltro de fibra de vidro (GF-3 da *Macherey-nagel*). Posteriormente, o filtro contendo as células foi lavado com água destilada com objetivo de arrastar os sais que possam ter ficado retido juntamente com a biomassa e submetidos à secagem em estufa a 50°C, até atingir peso constante.

Para o procedimento de filtração, foram numerados e previamente tarado os microfiltros de fibra de vidro GF-3 da *Macherey-nagel* em estufa a temperatura de 100°C por 2 h, e posteriormente levados para o dessecador para pesagem à temperatura ambiente. Além disso, foi necessário o aparato de filtração com vácuo (constituído por um copo, um funil com saída para a bomba, um frasco reservatório, todos em vidro, e uma pinça) e uma bomba de vácuo.

3.3.2 Determinação do pH

Diariamente o pH foi determinado potenciométricamente com o pHmetro, calibrado com soluções tampões.

3.3.3 Pré-tratamento da Biomassa

Os metabólitos como proteínas, carboidratos e lipídeos são sintetizados pela microalga de forma intracelular. Isto faz com que seja necessário uma etapa de pré-tratamento para que ocorra o rompimento celular e os compostos de interesse possam ser quantificados.

Antes da execução dos experimentos foram realizados testes para determinar um pré-tratamento ideal para cada análise. A biomassa utilizada para os pré-tratamentos estava na forma de pó. O cultivo foi centrifugado por 15 min a 2949 xg, e seco a 50°C

por 24 h, após a biomassa foi macerada em gral e pistilo e exposta as diferentes condições dos pré-tratamento.

Para a determinação dos carboidratos, os pré-tratamentos avaliados foram:

- (1) 20 h em ácido sulfúrico (H_2SO_4) 80 % (v.v⁻¹) (MYKLESTAD; HAUG, 1972);
- (2) 20 h em H_2SO_4 70 % (v.v⁻¹);
- (3) 20 h em H_2SO_4 P.A;
- (4) 30 min em autoclave com H_2SO_4 4 % (v.v⁻¹) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2015);
- (5) 30 min em banho-maria a 100°C com H_2SO_4 4 % (v.v⁻¹);
- (6) 30 min em autoclave com H_2SO_4 P.A;
- (7) 30 min em banho-maria a 100°C com H_2SO_4 P.A.;
- (8) 30 min com H_2SO_4 4 % (v.v⁻¹);
- (9) 30 min em com H_2SO_4 P.A.

Para a determinação de proteínas, os testes de rompimento celular foram realizados com 10 mg de biomassa adicionado de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, e posteriormente aplicou-se três diferentes pré-tratamentos:

- (1) Agitação com vortex por 1 h (SRIRANGAN *et al.*, 2015);
- (2) Banho ultrassônico (40 Hz) por 30 min;
- (3) Banho ultrassônico (40 Hz) por 30 min seguido de banho-maria a 100°C por 5 min.

Assim, após estes procedimentos, originou-se o extrato contendo os metabólitos de interesse (carboidratos ou proteínas), os quais foram submetidos aos procedimentos descritos por Dubois *et al.* (1956) e Lowry *et al.* (1951) para determinar suas concentrações. Os métodos são detalhados nas seções 3.3.4 e 3.3.5 respectivamente.

Já para extração de lipídeos, adicionou-se à biomassa 5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2 M e foi incubado em banho-maria a 80°C por 1 h. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 15 min a 2949 xg, e as células submetidas a extração e quantificação conforme descrito no item 3.3.6, seguindo a metodologia de Bligh e Dyer (1959).

Os resultados foram avaliados através do *software Statistica 7* pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. As diferenças foram testadas a um intervalo de confiança de 95 %.

3.3.4 Determinação de Carboidratos

O procedimento utilizado para determinar a concentração de carboidratos foi o descrito por Dubois *et al.* (1956), onde açúcares simples ou complexos quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado produzem um composto com coloração amarelo-laranja com absorção máxima no comprimento de onda de 485 nm.

Diariamente foi quantificado o teor de carboidratos. Após a amostragem de cada reator, as alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 2949 xg, e secas a 50°C por 24 h, após as biomassas foram maceradas em gral e pistilo e expostas ao pré-tratamento, resultando nos extratos contendo os carboidratos. Para a realização da análise, foram adicionados aos tubos de ensaio 1 mL do extrato, 0,5 mL de fenol 3 % (p.v⁻¹) juntamente com 2,5 mL de ácido sulfúrico P.A, sendo que no branco da reação foi adicionado 1 mL de água destilada no lugar do extrato. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 min, para posterior leitura em espectrofotômetro (T80+ UV/Vis, *PG instruments*) no comprimento de onda de 485 nm. Posteriormente os dados foram convertidos a concentrações de glicose através da relação obtida na curva padrão de glicose.

3.3.5 Determinação de Proteínas

Para determinação das proteínas solúveis totais, utilizou-se o método adaptado de Lowry *et al.* (1951). Diariamente foi quantificado o percentual de proteínas contido na biomassa. Após a amostragem dos reatores, as alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 2949 xg, e secas a 50°C por 24 h, após as biomassas foram maceradas em gral e pistilo e expostas ao pré-tratamento, resultando nos extratos contendo as proteínas. A reação foi realizada com 1 mL do extrato, 0,5 mL NaOH (1 M), 4 mL de solução alcalina deixando reagir por 10 min, e posteriormente, 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteau 2 M (diluído 1:2 com água destilada). Após 30 min, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (T80+ UV/Vis, *PG instruments*) a 660 nm. Previamente a reação foi realizada com o padrão de Albumina 98 % em diferentes concentrações (0-380 µg.mL⁻¹) para gerar a curva padrão, permitindo a quantificação das proteínas nas amostras.

3.3.6 Determinação de Lipídeos

Para extração e quantificação dos lipídeos foi utilizado o método de Bligh; Dyer (1959). Esta análise foi realizada no primeiro e no último dia do experimento, devido a

necessidade de grande quantidade de amostra. Parte do cultivo foi centrifugado por 15 min a 2949 xg, e seco a 50°C por 24 h, após a biomassa foi macerada em gral e pistilo. Após submetida ao pré-tratamento, às células foi adicionado 4 mL de metanol sucedido de agitação (agitador do tipo vortex); adicionou-se 2 mL de clorofórmio e novamente agitou-se em vortex, desta vez por 2 min. Na sequência mais 2 mL foram adicionados e agitado outra vez. Por fim, adicionou-se 3,6 mL de água destilada, submeteu-se a agitação e foi centrifugado por 15 min a 2949 xg. A fase inferior contendo os lipídeos foi retirada com auxílio de uma seringa e disposta em uma placa de petri previamente tarada. Realizou-se uma segunda extração com 4 mL de solução contendo 10 % (v.v⁻¹) de metanol em clorofórmio, agitou-se e centrifugou-se nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término, recuperou-se a fase lipídica com a seringa e juntou ao primeiro extrato. As placas contendo a fase de clorofórmio juntamente com os lipídeos ficaram na capela de exaustão até a evaporação do clorofórmio. Posteriormente foram levadas para secar em estufa a 80°C até atingir peso constante. As placas foram resfriadas dentro do dessecador e pesadas em balança analítica à temperatura ambiente.

3.4 Método Alternativo

3.4.1 Análise de Infravermelho

Foi utilizado o espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo *Frontier FTIR/NIR Spectrometer* (PerkinElmer) com o acessório de reflexão total atenuada universal (UATR). Foi analisada a região do infravermelho médio na faixa de 4000-800 cm⁻¹, a uma resolução 2 cm⁻¹, com 32 varreduras. Diariamente, a biomassa foi analisada no espectrofotômetro FTIR em triplicata, na forma de pó. Para isto, após a amostragem do reator a alíquota foi centrifugada por 15 min a 2949 xg, e seca a 50°C por 24 h e macerada em gral e pistilo de ágata.

Posteriormente, com auxílio do *software Matlab*[®] (R2011a), os espectros gerados foram normalizados pelo método *Standard Normal Variate* (SNV) e calcularam-se as áreas dos picos utilizando integração numérica através do método dos trapézios considerando as bandas características de absorção para cada metabólito (lipídeos 3000-2800 cm⁻¹; proteínas 1728-1578 cm⁻¹ e carboidratos: 1200-950 cm⁻¹). De posse dos dados obtidos pelos métodos tradicionais versus as áreas dos picos característicos, foram gerados modelos matemáticos lineares através da técnica dos mínimos quadrados. Com

isto, foi relacionado os teores dos metabólitos de interesse, possibilitando a utilização do FTIR para quantificação destes.

A Figura 3.2 ilustra o espectro completo da *Scenedesmus sp.* Em destaque observam-se as bandas características de cada composto de interesse. Em (a) apresenta-se a área referente aos lipídeos; em (b) as proteínas e em (c) aos carboidratos.

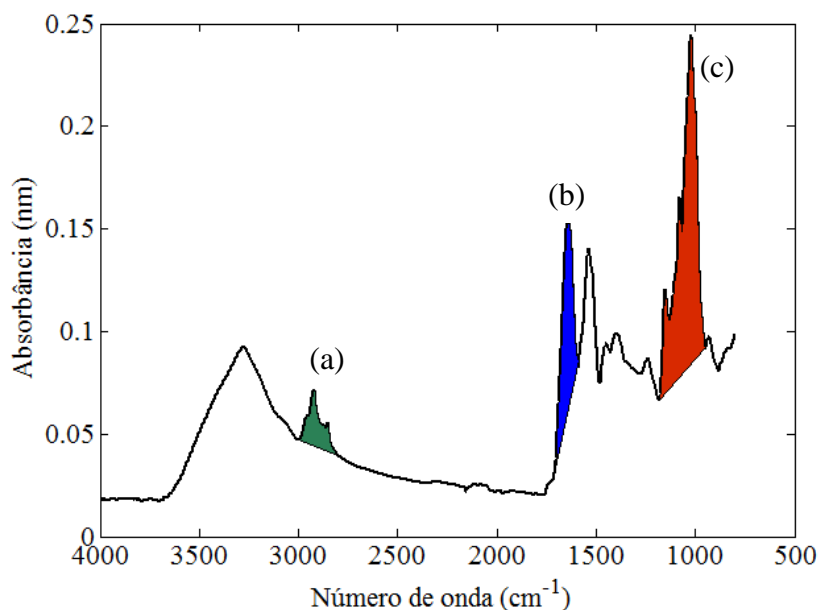


Figura 3.2. Ilustração do espectro FTIR de *Scenedesmus sp.* e realce nas bandas características de cada composto. (a) Lipídeos; (b) Proteínas e (c) Carboidratos.

3.5 Validação dos Modelos

Após a obtenção dos modelos, foram realizados novos experimentos para validá-los. A condição foi a do ponto central do planejamento de experimentos fatorial 2^3 . A partir do terceiro dia do cultivo, realizaram-se diariamente as análises: FTIR, concentração celular e de carboidratos. No último dia, foram extraídos e quantificados os lipídeos. Todas as análises foram realizadas conforme descritas anteriormente.

Posteriormente ao tratamento dos dados, foram avaliados comparativamente ao modelo com um intervalo de confiança de 95 %.

Neste trabalho será calculado o percentual de lipídeos predito pelo modelo, bem como avaliada o erro absoluto através da diferença entre o percentual de lipídeos predito pelo modelo e o real.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1 Curvas Padrões

A Figura 4.1 apresenta a curva padrão da concentração celular da microalga *Scenedesmus sp.* versus absorvância cultivada nas condições do ponto central do planejamento de experimentos. A mesma foi gerada a partir dos resultados de massa celular seca, relacionados com o volume inicial da solução, sendo determinada a concentração celular para cada diluição (conforme descrito no item 3.3.1). Com estes dados, foi realizada a regressão linear obtendo a curva padrão para cálculo da concentração celular (mg.mL^{-1}), apresentada na Figura 4.1 e representada pela equação (4.1).

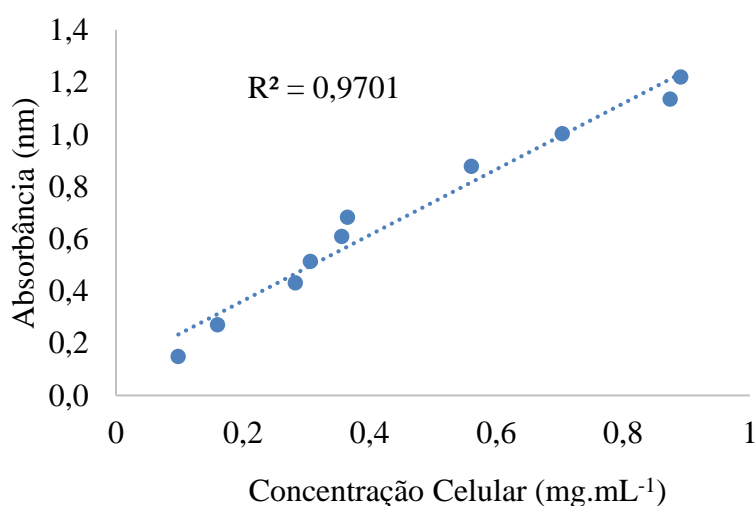


Figura 4.1. Curva padrão de *Scenedesmus sp.* a 570 nm.

$$\text{Absorbância} = 1,2603 \times \text{Conc.Celular} + 0,1102 \quad (4.1)$$

A seguir, na Figura 4.2, apresenta-se a curva padrão de albumina, utilizada como padrão de proteína e a respectiva equação (4.2).

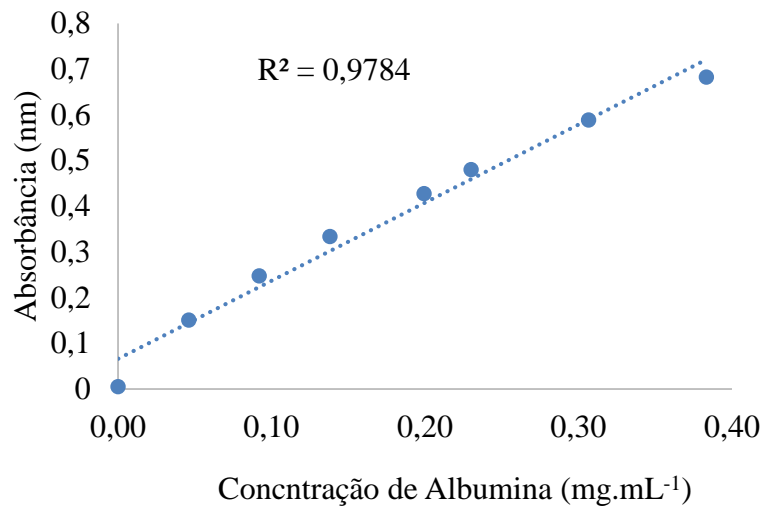


Figura 4.2. Curva padrão de albumina.

$$\text{Absorbância} = 1,7088 \times \text{Conc. Albumina} + 0,066 \quad (4.2)$$

A Figura 4.3 e a equação (4.3) apresentam a relação entre a absorbância e diferentes concentrações de glicose. Lourenço (2006) relata que a linearidade perfeita da equação da reta é encontrada com baixas concentrações, até 50 µg/L de glicose.

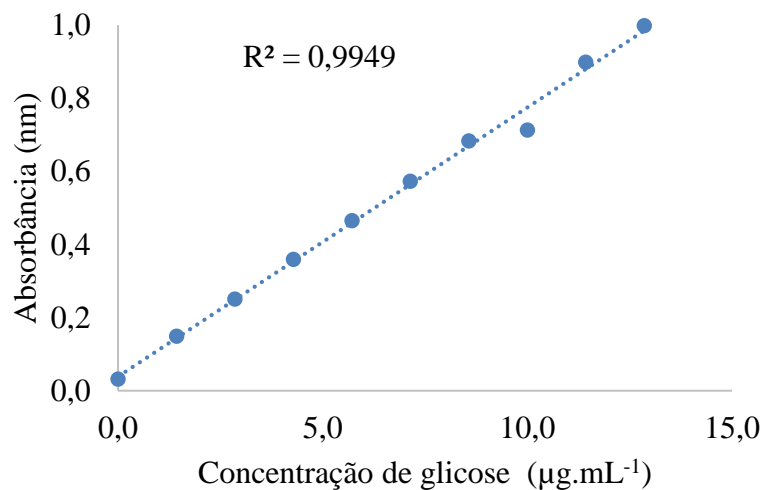


Figura 4.3. Curva padrão de glicose.

$$\text{Absorbância} = 0,0735 \times \text{Conc. de Glicose} + 0,0389 \quad (4.3)$$

As equações apresentadas (4.1, 4.2 e 4.3), apresentam R^2 satisfatórios, superiores a 0,97. Sendo assim, estas foram utilizadas para quantificar a concentração celular de *Scenedesmus sp.*, concentração de proteínas e carboidrato nas análises realizadas por métodos tradicionais apresentadas a seguir.

4.2 Pré-Tratamentos

Os diferentes pré-tratamentos avaliados para quantificação da concentração de proteínas, exibidos na Tabela 4.1, não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Sendo assim, o pré-tratamento utilizado para as análises dos experimentos foi 30 min em banho ultrassônico com NaOH 0,1 M resultando em $9,71 \% \pm 0,84$ ($p.p^{-1}$) de proteínas, levando em conta a praticidade deste pré-tratamento.

As concentrações de proteínas variam expressivamente de acordo com as condições do cultivo. Segundo Pancha *et al.* (2014), a limitação de nitrogênio diminui significativamente a atividade fotossintética de *Scenedesmus sp.*, assim como o teor de proteína bruta na célula, o que explica o baixo percentual encontrado mesmo após o pré-tratamento.

Tabela 4.1. Média percentual da concentração de proteínas na biomassa de *Scenedesmus sp.* Todos os pré-tratamentos realizados na presença de NaOH 1M.

Pré-Tratamento	Média Percentual de Proteínas	Média Absoluta Proteína [mg]
(1) Agitação com vortex por 1 h	$8,79 \pm 1,29^a$	$0,89 \pm 0,16$
(2) Banho ultrassônico (40 Hz) por 30 min	$9,71 \pm 0,84^a$	$1,03 \pm 0,84$
(3) Banho ultrassônico (40 Hz) por 30 min seguido de banho-maria a 100°C	$8,60 \pm 2,08^a$	$0,90 \pm 0,25$

Média \pm desvio padrão. Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente ($p < 0,05$).

Já para a extração dos carboidratos, houve diferença significativa entre os pré-tratamentos testados, apresentados na Tabela 4.2. Os melhores resultados são obtidos com H_2SO_4 P.A nas condições de: 20 h em temperatura ambiente (pré-tratamento número 3); 30 min em autoclave (pré-tratamento número 6) e 30 min em temperatura ambiente (pré-

tratamento número 9), os quais não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Visando a praticidade da análise e a redução de tempo, utilizou-se o pré-tratamento número 9, H₂SO₄ P.A, durante 30 min à temperatura ambiente.

Hernández *et al.* (2015) testaram vários métodos para a extração dos carboidratos das microalgas *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis gaditana* e *Scenedesmus almeriensis*, tais como: hidrólise ácida, básica, com autoclave, com micro-ondas e com enzimas. Os autores relatam que a hidrólise ácida combinada com autoclave, resulta em maior liberação de açúcar para *Scenedesmus almeriensis*. Além disso, os melhores resultados para *Chlorella sorokiniana* e *Nannochloropsis gaditana* foram obtidos a partir da hidrólise ácida juntamente com a enzimática. O autor conclui que a hidrólise ácida com H₂SO₄ resulta em consideráveis liberações de açúcares, em todas as microalgas testadas, frente aos outros métodos testados (micro-ondas, autoclave em água e hidrólise alcalina).

Tabela 4.2. Média percentual da concentração de carboidratos na biomassa de *Scenedesmus sp.* em função dos diferentes pré-tratamentos.

Pré-Tratamento	Média Percentual de Carboidrato	Média Absoluta Carboidrato [mg]
(1) 20 h em H ₂ SO ₄ 80 %	13,62 ± 0,76 ^c	0,38 ± 0,04
(2) 20 h em H ₂ SO ₄ 70 %	9,95 ± 0,96 ^{c,d}	0,26 ± 0,04
(3) 20 h em H ₂ SO ₄ P.A	39,19 ± 3,39 ^a	1,04 ± 0,21
(4) 30 min em autoclave com H ₂ SO ₄ 4 %	9,84 ± 0,93 ^{c,d}	0,31 ± 0,05
(5) 30 min em banho-maria a 100°C com H ₂ SO ₄ 4 %	9,46 ± 1,05 ^{c,d}	0,27 ± 0,03
(6) 30 min em autoclave com H ₂ SO ₄ P.A	31,64 ± 6,67 ^{a,b}	0,90 ± 0,13
(7) 30 min em banho-maria a 100°C com H ₂ SO ₄ P.A.	24,60 ± 2,68 ^b	0,80 ± 0,21
(8) 30 min com H ₂ SO ₄ 4 % (v.v ⁻¹)	2,14 ± 0,18 ^d	0,07 ± 0,01
(9) 30 min com H ₂ SO ₄ P.A.	29,74 ± 5,95 ^{a,b}	0,95 ± 0,11

Média ± desvio padrão. Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente ($p < 0,05$).

4.3 Avaliação do Crescimento Celular

A avaliação do crescimento celular, concentração de proteínas, carboidratos e lipídeos foi realizada a fim de obter uma correlação com as análises do FTIR. Cada composto tem um espectro IR característico, a absorção em cada comprimento de onda é determinada pela geometria da molécula, pelas massas e posições relativas de todos os átomos e a força das ligações entre eles. Isto permite uma identificação dos compostos (permitindo a análise qualitativa), e o sinal observado depende do número de moléculas presente (análises quantitativas). As características espectrais gerais dos principais componentes dos alimentos (proteína, óleo/gordura e carboidratos) são bem conhecidos e cada um tem uma ou mais faixas de assinaturas fortes (WELLNER, 2013).

A seguir apresentam-se espectros ilustrativos de FTIR. A Figura 4.4 mostra o espectro de glicose utilizada neste trabalho como padrão de carboidratos. As barras indicam as regiões que foram consideradas como característica para a quantificação dos carboidratos ($1200-950\text{ cm}^{-1}$ e $1180-1133\text{ cm}^{-1}$).

Na Figura 4.5 apresenta-se o padrão de proteína utilizado, a albumina de soro bovino. Os picos das proteínas amida I e II encontram-se em destaque pela barra. Foram avaliadas as proteínas juntas ($1728-1476\text{ cm}^{-1}$) e separadas, amida I entre $1728-1578\text{ cm}^{-1}$ e amida II entre $1590-1476\text{ cm}^{-1}$.

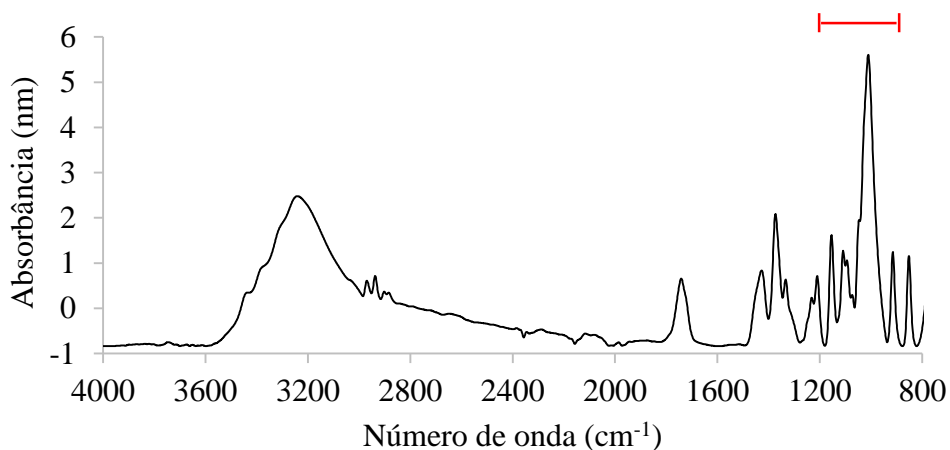


Figura 4.4. Espectro obtido no FTIR para glicose, utilizada como padrão de carboidrato.

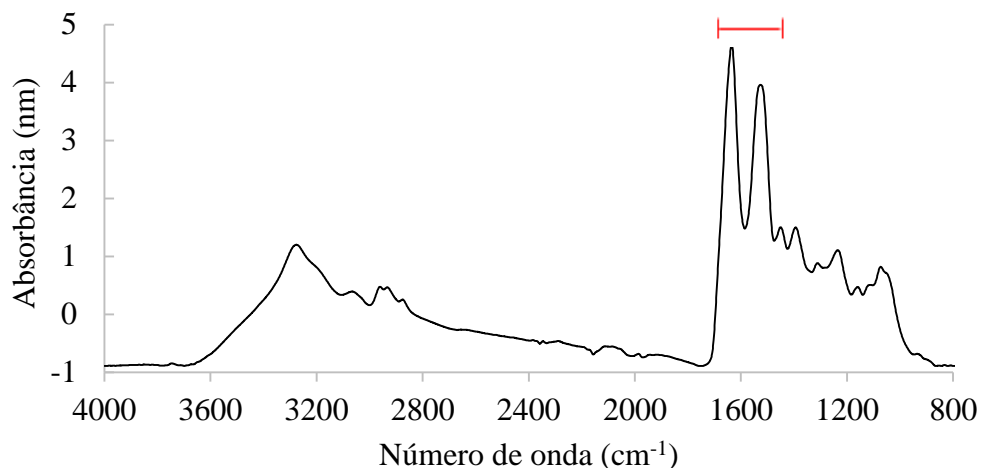


Figura 4.5. Espectro obtido no FTIR para o padrão de proteína albumina do soro bovino.

O espectro da microalga seca, apresentado na Figura 4.6, se assemelha com a composição dos alimentos, uma vez que ambas são biomassas ricas principalmente em lipídeos, proteínas e carboidratos, sendo as bandas características de cada composto destacadas em (a), (b) e (c), respectivamente. As regiões supramencionadas se mostram características por meio da análise individual dos padrões de carboidratos e proteínas, como mostrado nas Figuras 4.4 e 4.5, e pelo padrão de lipídeo apresentado na Figura 2.5 analisado por Wellner (2013).

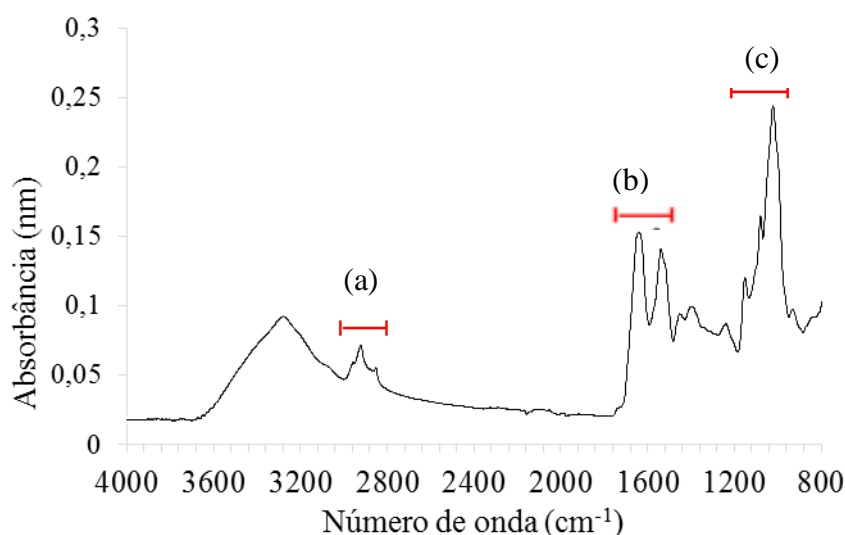


Figura 4.6. Espectro FTIR da biomassa seca de *Scenedesmus sp.* Em destaque as regiões características (a) Lipídeos, (b) Proteínas e (c) Carboidratos.

No entanto, geralmente não é possível separar proteínas individuais em uma matriz alimentar com muitos compostos diferentes, visto que seus espectros são semelhantes. Da mesma forma, as bandas de carboidratos estão fortemente sobrepostas, embora os seus padrões específicos na região de sua impressão digital permitam a distinção entre tipos diferentes a um certo grau (WELLNER, 2013).

A determinação quantitativa de um composto presente na amostra faz uso da relação linear entre absorvância e concentração. Assim, pode ser possível determinar, proteínas, carboidratos, gorduras e outros compostos de interesse. No entanto, em muitos casos, as amostras contêm muitas proteínas e carboidratos diferentes, além de outros compostos (água, gordura, ácidos nucleicos, etc.) em quantidades variadas. Isso dificulta atribuir as bandas individuais a proteínas ou carboidratos (WELLNER, 2013).

De acordo com Meng *et al.* (2014) e Wellner (2013) e com os espectros obtidos com os padrões, as áreas das bandas de absorção características na região do MIR foram calculadas. Posteriormente as respostas obtidas nas análises laboratoriais foram relacionadas com a respectiva área calculada de cada metabólito de interesse, gerando um modelo linear correlacionando as duas técnicas. Tais resultados serão apresentados e discutidos a seguir. Os dados referentes ao crescimento celular, percentuais de proteínas, carboidratos e lipídeos quantificados pelos métodos tradicionais, bem como todos os dados utilizado para geração dos modelos estão apresentados no Apêndice I.

4.3.1 Lipídeos

O pico em torno de 1740-1730 cm^{-1} característico de lipídeos citado pelos autores Giordano *et al.* (2001), Socrates (2004) e evidenciado no espectro do óleo de oliva (Figura 2.5) analisado por Wellner (2013), não é claro na biomassa de *Scenedesmus sp.* (Figura 4.6). Dessa forma esta região não foi testada no presente estudo. Já entre 1800-1000 cm^{-1} , intervalo avaliado por Difusa, Mohanty e Goud (2016), resultaram na Figura 4.7. Foi gerado o modelo, representado pela equação (4.4), utilizando os dados obtidos neste trabalho, apresentando um $R^2=0,5762$ com $p= 0,0006$.

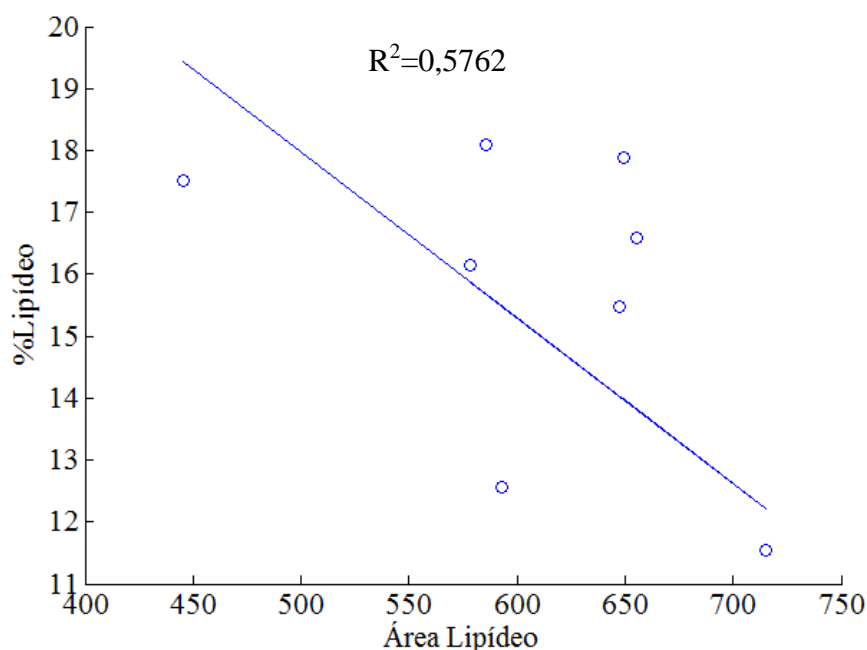


Figura 4.7. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR (1800-1000 cm^{-1}) e método tradicional (BLIGH; DYER, 1959) quanto ao percentual de lipídeos.

$$\%Lipídeo = -0,01393 \times \text{Área} + 22,4 \quad (4.4)$$

Este modelo apresenta uma relação inversa, onde o aumento do %Lipídeos reduz a área calculada (característica dos lipídeos). Isto pode ser explicado pelo fato de que a região escolhida para o cálculo da área contém vibrações moleculares referentes aos carboidratos e proteínas. Difusa, Mohanty e Goud (2016) utilizaram esta região para quantificar o extrato de lipídeos de microalgas, não havendo outros metabólitos para gerar interferência. Nesta dissertação, por não ser visível o pico em torno de 1740 cm^{-1} , na região de $1800\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$, quantificou-se apenas proteínas e carboidratos, sendo coerente a relação inversa entre a área calculada e o %Lipídeos.

As bandas de absorção com maior relevância para quantificação dos lipídeos estão entre $3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$. Ao correlacionar a quantificação dos lipídeos, em percentual, com esta faixa, houve uma correlação linear com R^2 de 0,8265 com $p=1,08 \times 10^{-6}$, como pode ser observado na Figura 4.8. O modelo gerado é apresentado na equação (4.5).

O intervalo entre $3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ é o mais utilizado na literatura para análises qualitativas e quantitativas desse metabólito (DIFUSA; MOHANTY; GOUD, 2016; FENG *et al.*, 2013; MENG *et al.*, 2014).

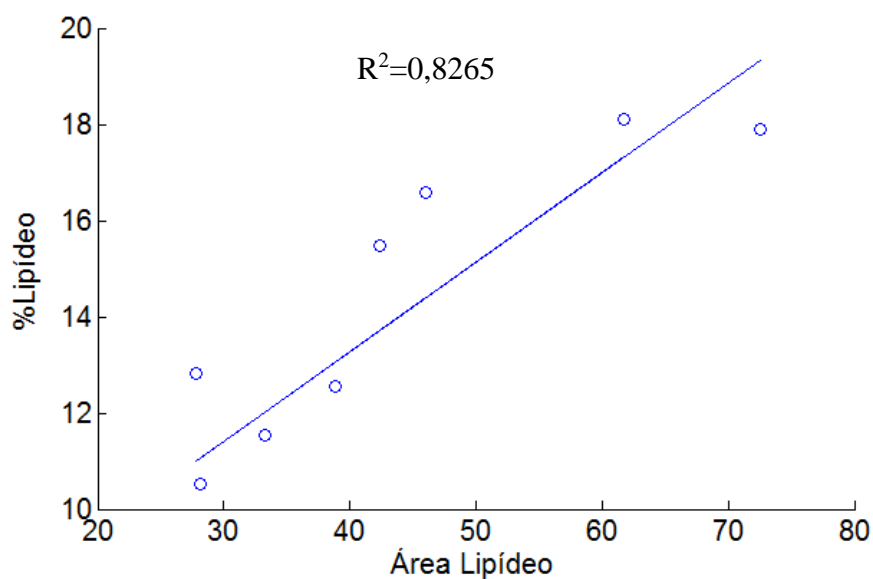


Figura 4.8. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR (3000-2800 cm^{-1}) e método tradicional (BLIGH; DYER, 1959) quanto ao percentual de lipídeos.

$$\% \text{Lipídeo} = 0,1862 \times \text{Área} + 5,8174 \quad (4.5)$$

Meng *et al.* (2014) observaram entre cinco cepas de microalgas (*Tetraselmis subcordiformis*, *Isochrysis sp.*, espécie desconhecida denominada *H16*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella pyrenoidosa*) uma correlação linear entre o percentual de lipídeos relacionado com a razão entre a área dos lipídeos e a área da amida I (proteína), resultando em um R^2 de 0,951.

O referido trabalho utiliza como variável advinda do FTIR a razão entre a área dos lipídeos e a área da proteína amida I, sendo que o R^2 obtido com os dados desta dissertação é igual a 0,8156 ($p= 2,88 \times 10^{-7}$). Meng *et al.* (2014) relata que a banda de amida I foi utilizada para normalizar os dados de lipídeos e carboidratos, por acreditarem que esta não apresenta uma grande variação. Entretanto, avaliando os dados apresentados pelos autores, há uma variação expressiva no teor de proteínas, variando de 18 a 27,6 % para as cepas utilizadas para a correlação. Não foi explicado o motivo pelo qual se utilizou a relação entre as áreas de lipídeos e proteínas, acarretando em uma relação indireta entre o FTIR e as análises tradicionais. Os autores ainda afirmam que a relação encontrada só é válida quando a composição de proteínas se mantém inalterada. Vários estudos já

discutidos aqui mostram que a alteração no meio de cultivo, principalmente em relação ao macronutriente nitrogênio, afetam significativamente os metabolismos de síntese proteica (CHU *et al.*, 2014; PANCHA *et al.*, 2014; SCHULZE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013). Por estes motivos, neste trabalho se optou por não utilizar a razão entre as áreas de lipídeos e proteínas (amida I).

Além disso, a fim de comparar a composição de diferentes micro-organismos, Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009) primeiramente também relacionaram a banda de proteína, neste caso amida II, com os teores de lipídeos e carboidratos. Porém os autores optaram por correlacionar diretamente a área do pico característico com a composição de lipídeos. Posteriormente os autores analisaram estatisticamente os coeficientes de regressão e estes não apresentaram diferença a $p < 0,05$. Outro relato que embasa a decisão tomada, de não utilizar nesta dissertação a razão entre a área de produto de interesse pela área de proteína. Para a quantificação dos lipídeos Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009) utilizaram como padrão lecitina de ovo. Previamente, realizam a curva padrão deste composto para calcular os teores de lipídeos das biomassas estudadas.

Os percentuais de lipídeos preditos pelo modelo, calculados a partir da equação (4.5), apresentam erros quando relacionados com a análise gravimétrica de mais ou menos 2,2 %, confirmando então a margem de desvio encontrada por Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009) de ± 2 % em média, uma vez que a região escolhida pelos autores para analisar o teor de lipídeos ($2984-2780 \text{ cm}^{-1}$) possui pequenas bandas interferentes de proteínas. Estas interferências são possíveis de observar tanto no espectro das proteínas, quanto no dos carboidratos (Figura 4.4 e Figura 4.5), sendo um desvio de 2 % em média aceitável frente todas as vantagens da técnica, como praticidade no preparo das amostras, obtenção os resultados em questão de minutos, robustez do método e possibilidade de análise de todos os compostos de interesse simultaneamente.

Dean *et al.* (2010) determinam uma correlação entre a técnica de medição de lipídeos por fluorescência do corante Vermelho-Nilo e FTIR, obtendo um R^2 para *S. subspicatus* de 0,9002, utilizando como banda característica o pico em 1740 cm^{-1} relacionado com o pico de amida I ($\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$). Os autores acreditam que estas correlações validam a técnica de FTIR como um método de determinação de lipídeos nesta alga. A Tabela 4.3 sumariza os resultados obtidos neste trabalho e por outros autores.

Tabela 4.3. Resumo dos resultados encontrados por diversos autores para quantificação de lipídeos por FTIR.

Bandas de Absorção (cm⁻¹)	R²	Acompanhamento diário	Referência
1740	0,9002	Sim	(DEAN <i>et al.</i> , 2010a)
1800-1000	0,5762	Sim	Este trabalho
1800-1000	N.I.	Não	(DIFUSA; MOHANTY; GOUD, 2016)
2984-2780	N.I.	Não	(PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009)
3000-2800	0,8265	Sim	Este trabalho
3000-2800	0,951	Não	(MENG <i>et al.</i> , 2014)
3000-2800	N.I.	Não	(DIFUSA; MOHANTY; GOUD, 2016)
3000-2800	N.I.	Não	(FENG <i>et al.</i> , 2013)

*N.I. = Não informado

4.3.2 Carboidratos

Quando se trata de carboidratos, os trabalhos da literatura abordam picos característicos de absorção no IR muito próximos. Feng *et al.* (2013) cita valores entre 1200-1000 cm⁻¹, porém, avaliando o espectro da *Scenedesmus sp.*, esta faixa não compreende o pico de interesse por inteiro. Já Dean *et al.*, (2010) e Meng *et al.* (2014) sugerem valores entre 1200-950 cm⁻¹, os quais se adaptam melhor ao espectro da biomassa em questão. Relacionando a área do pico característico de absorção para os carboidratos (1200-950 cm⁻¹) com percentuais calculados a partir da quantificação pelo método de Dubois *et al.* (1956), conforme mostrado na Figura 4.9, foi possível se obter os parâmetros do modelo apresentado pela equação (4.6). O R² encontrado foi de 0,8023 com p=1,26x10⁻³⁶, estes coeficientes apontam a confiabilidade e representatividade do modelo para estimar os teores de carboidratos a partir do FTIR.

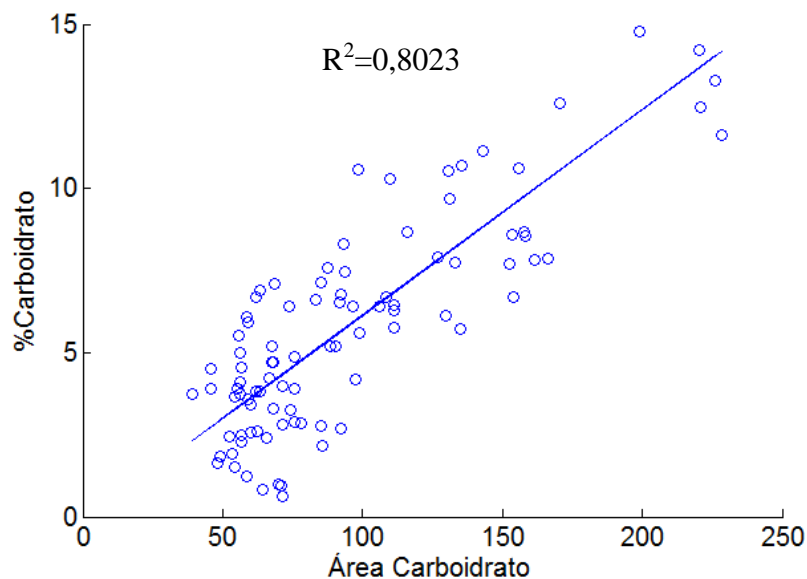


Figura 4.9. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1200-950 cm^{-1}) e método tradicional (DUBOIS *et al.*, 1956) quanto ao percentual de carboidratos.

$$\% \text{Carboidrato} = 0,0627 \times \text{Área} - 0,1318 \quad (4.6)$$

Dentro da faixa estudada, Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009), estudaram o pico específico no entorno de 1152 cm^{-1} , indicando o alongamento da ligação C-O e a vibração da O-H. Levando em conta este relato, nesta dissertação, foi avaliado este pico considerando a região entre $1180\text{-}1133 \text{ cm}^{-1}$. A Figura 4.10 apresenta o comportamento encontrado, e a equação (4.7) descreve o modelo obtido com $R^2=0,5730$ e $p=1,66 \times 10^{-18}$. Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009) relacionaram análises tradicionais com FTIR para avaliar os teores de carboidratos de diversos micro-organismos. A técnica adotada por estes autores é de gerar uma curva padrão prévia, utilizando hidrolisado de amido como padrão, o que possibilita a identificação de picos bem definidos, sem interferentes dos outros metabólitos, o que difere da proposta que está sendo apresentada neste trabalho. A complexidade da composição da biomassa de *Scenedesmus sp.* e as correlações apresentadas, mostram que quando avaliado o pico individual o mesmo apresentou menor R^2 do que a quando utilizou-se uma região que abrange várias ligações características dos carboidratos.

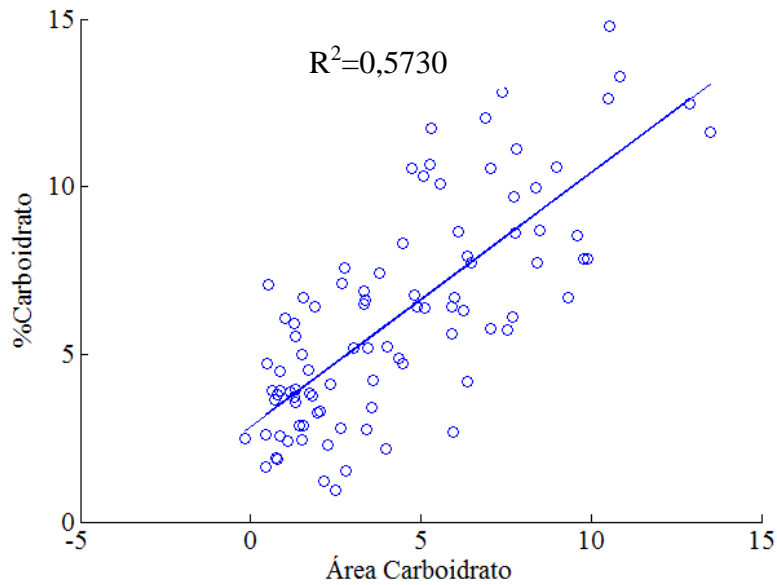


Figura 4.10. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1180-1133 cm^{-1}) e método tradicional (DUBOIS *et al.*, 1956) quanto ao percentual de carboidratos.

$$\% \text{Carboidrato} = 0,7557 \times \text{Área} + 2,855 \quad (4.7)$$

Já Meng *et al.* (2014) observaram uma correlação linear com $R^2=0,962$ quando avaliaram a interação do FTIR na região do MIR com as metodologias tradicionais para quantificação de carboidratos. Utilizaram cinco cepas de microalgas, sendo analisada uma única amostra de cada, resultando em cinco pontos para gerar o modelo. Como citado anteriormente, estes autores utilizaram uma razão entre a área característica para os carboidratos e a da proteína (amida I) versus o percentual de carboidratos. Aplicando esta metodologia para este trabalho, resulta em $R^2=0,5758$ com $p=1,48 \times 10^{-16}$. A relação proposta (razão entre a área dos carboidratos pela área das proteínas) apresenta dois dados variáveis, trazendo para o modelo mais uma variável, sendo desnecessária. Ainda, pelas discussões anteriores acredita-se que carboidratos e proteínas sejam acumulados de maneira inversamente proporcional. Com isso, se opta por tratar de maneira direta as correlações (área do produto de interesse versus produto), conforme Figura 4.9. Assim há menos interferentes, já que a biomassa das microalgas possui metabolismos complexos e altera sua composição por inúmeros fatores (disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, entre outros).

Dean *et al.* (2010) ao acompanhar diariamente o cultivo de *S. subspicatus* com análises de fluorescência utilizando o corante Safranina e análises no FTIR, obtêm R² entre as diferentes técnicas de 0,9296. Os autores utilizam a banda característica da amida I para corrigir a linha de base nos espectros gerados. A Tabela 4.4 apresenta de forma sintetizada a comparação dos resultados discutidos para carboidratos.

Tabela 4.4. Resumo dos resultados encontrados por diversos autores para quantificação de carboidratos por FTIR.

Bandas de Absorção (cm⁻¹)	R²	Acompanhamento diário	Referência
1152	N.I.	Não	(PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009)
1180-1133	0,5730	Sim	Este trabalho
1200-1000	N.I.	Não	(FENG <i>et al.</i> , 2013)
1200-950	0,8023	Sim	Este trabalho
1200-950	0,9296	Sim	(DEAN <i>et al.</i> , 2010a)
1200-950	0,962	Não	(MENG <i>et al.</i> , 2014)

*N.I.= Não informado

4.3.3 Proteínas

A relação entre área da proteína amida I e percentual de proteína obteve uma correlação baixa, apresentando R²=0,4468 com p=1,22x10⁻¹⁴. A Figura 4.11 ilustra a dispersão dos dados.

Além desta, foram testadas duas outras alternativas. A primeira foi da área da proteína amida II versus percentual de proteínas, apresentada na Figura 4.12, resultando em R²=0,2213 e p= 3,48x10⁻⁵.

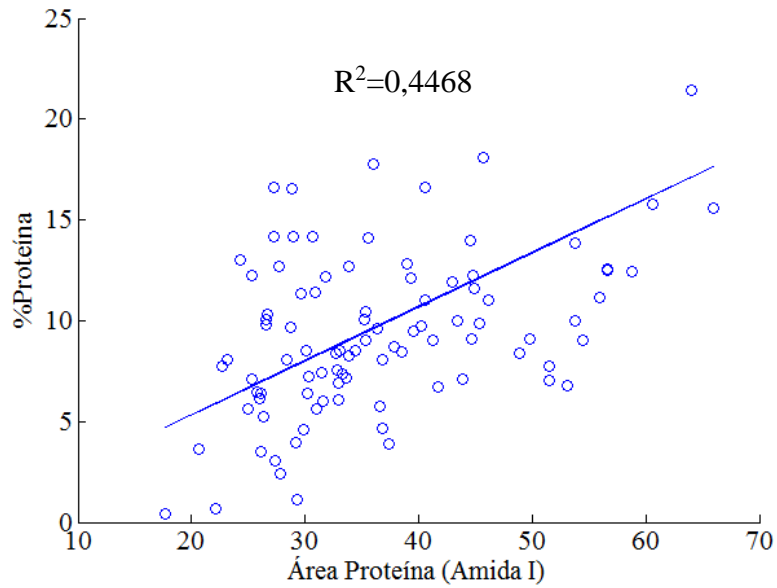


Figura 4.11. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1728-1578 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY *et al.*, 1951) quanto ao percentual de proteínas.

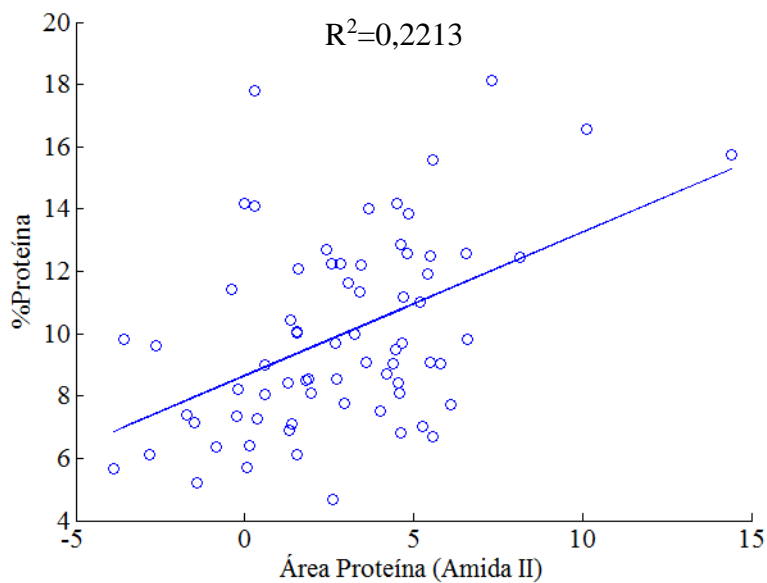


Figura 4.12. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1590-1476 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY *et al.*, 1951) quanto ao percentual de proteínas.

E, por fim, a soma das áreas das amidas (I e II) relacionada com o percentual de proteínas, ilustrado na Figura 4.13, obtendo como resposta o $R^2=0,1054$ e $p=0,0042$. Com estes R^2 não é sugerido o uso destes modelos para estimar os teores de proteínas por FTIR.

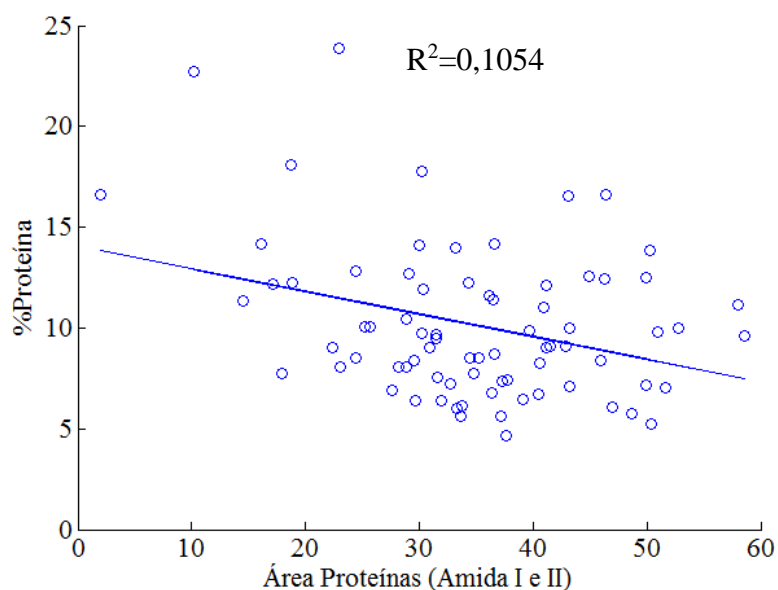


Figura 4.13. Correlação entre as médias das análises realizadas pelo FTIR (1728-1476 cm^{-1}) e método tradicional (LOWRY *et al.*, 1951) quanto ao percentual de proteínas.

Como citado, na revisão bibliográfica, por Socrates (2004) as bandas de proteínas são difíceis de diferenciar, além do fato que foi utilizado o método tradicional de Lowry *et al.* (1951), para quantificar proteínas, o qual é uma reação colorimétrica. Ensaio colorimétricos baseiam-se no cromóforo como consequência da ligação de um corante à proteína ou a proteína envolvida em uma reação redox. Estes ensaios são sensíveis a interferências (PETERSON, 1979) e um dos maiores problemas das análises das microalgas está na extração das proteínas, pelas diferenças na composição da parede celular e nos procedimentos de extração das proteínas, os quais influenciam os resultados obtidos (FLEURENCE, 1999). Além disso, o método de Lowry *et al.* (1951) dosa apenas as proteínas hidrossolúveis. Outras proteínas que ocorrem em formas não livres não são quantificadas por este método, as quais só serão quantificadas se forem extraídas adequadamente, fato que muitos pesquisadores desconhecem e acabam abordando os resultados de forma errônea (LOURENÇO, 2006). Por isso pode haver a diferença entre os resultados do FTIR e dos percentuais encontrados no laboratório, visto que o FTIR identifica proteínas totais, já o método de Lowry *et al.* (1951) proteínas hidrossolúveis, gerando assim uma correlação baixa para os dados avaliados.

4.3.4 Concentração Celular

Atualmente a análise de densidade ótica utilizada para verificar a concentração celular é uma técnica fácil e rápida. Porém, é interessante obter o máximo de informações em uma única análise. Tendo em vista que o FTIR pode ser utilizado para estimar os teores de carboidratos e lipídeos, buscou correlacionar esta técnica para quantificar também a concentração celular, trazendo mais uma informação importante do cultivo em resposta de uma única análise. Representando a biomassa de microalgas como um todo, foi realizada a soma das áreas características de lipídeos, proteínas (amida I) e carboidrato obtidos no FTIR, sendo denominada de área total. Estes três compostos representam a maior parte da biomassa das microalgas (superior a 80 %) (SINGH; GU, 2010; SPOLAORE *et al.*, 2006). A concentração celular, realizada no laboratório através da relação peso seco versus absorvâncias oriundas das leituras em espectrofotômetro ultravioleta (UV) visível, foi relacionada com a área total obtida pelo FTIR.

Figura 4.14 apresenta a distribuição dos dados e a relação linear obtida. O modelo gerado é apresentado na equação (4.8), o R^2 encontrado foi de 0,7900 e $p=3,19 \times 10^{-31}$.

Ainda foi verificada a relação entre as áreas das proteínas (amida I, amida II e ambas) e a concentração celular. Os resultados são apresentados na Tabela 4.5.

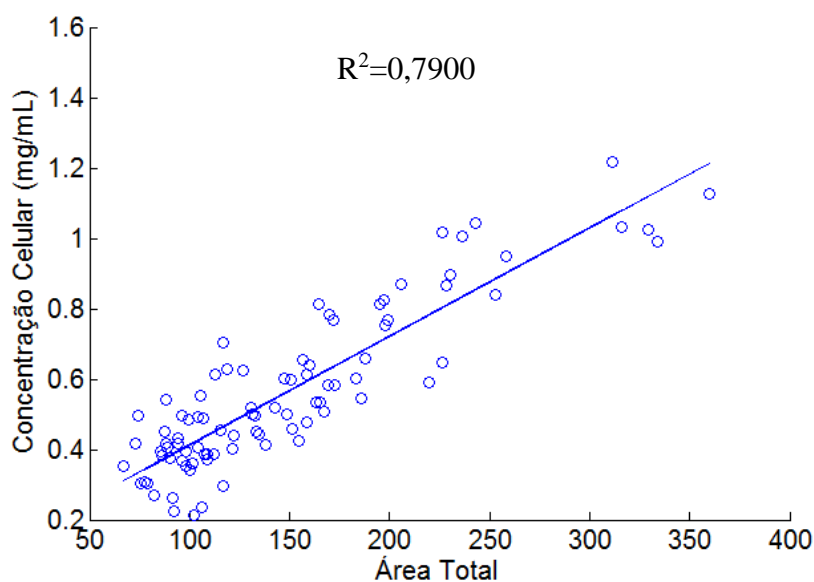


Figura 4.14. Correlação entre as análises realizadas pelo FTIR e métodos tradicionais quanto à concentração celular.

$$\text{Concentração Celular (mg.mL}^{-1}\text{)} = 0,0031 \times \text{Área} + 0,1048 \quad (4.8)$$

Tabela 4.5. Síntese dos resultados obtidos para as correlações das diferentes áreas de proteínas versus concentração celular.

Área da proteína	R ²	P	Modelo
Amida I	0,3624	3,47. 10 ⁻¹¹	Conc. Cel = 0,01368. Área + 0,09608
Amida II	0,4962	9,02. 10 ⁻¹⁸	Conc. Cel = 0,04633. Área + 0,5068
Amida I e Amida II	0,0431	0,0382	Conc. Cel = 0,00389. Área + 0,4485

Verifica-se que houve uma melhor correlação quando foi utilizada a banda de absorção característica da proteína amida II. Pistorius, Degrip e Egorova-Zachernyuk (2009) relatam que a banda de amida II é utilizada com resultados satisfatórios para a estimativa quantitativa do teor de proteínas, apresentando melhor resposta linear especialmente para proteínas com elevado teor de segmentos helicoidais.

Concentração celular é uma medida que faz parte do cotidiano no cultivo de microalgas, por isto se tentou calcular a partir da espectroscopia FTIR. Os modelos encontrados poderão ser úteis para futuras medições rápidas e práticas do cotidiano de um laboratório de pesquisa com microalgas.

4.3.5 Fator de Conversão

Com o acompanhamento diário do teor dos lipídeos e carboidratos por meio do FTIR será possível calcular diversos parâmetros que trazem informações importantes do cultivo, como por exemplo o fator de conversão de células em produto ($Y_{p/x}$). Este fator é um parâmetro interessante a ser avaliado, uma vez que tem sido discutido que cepas com crescimento rápido são fundamentais para o sucesso para culturas que visam produtos com baixo valor agregado, como o caso dos biocombustíveis. A alta produtividade de biomassa aumenta o rendimento por volume de lipídeos ou carboidratos e diminui o custo de produção, além de reduzir a contaminação devido à concorrência externa com micro-organismos mais lentos (GRIFFITHS; HARRISON, 2009). Sem a ferramenta do infravermelho não seria possível neste estudo avaliar estes fatores, uma vez que para a quantificação dos lipídeos pelos métodos tradicionais é necessária uma quantidade expressiva de biomassa (cerca de 1 g por dia de cada reator) o que inviabiliza algumas análises pela retirada excessiva de amostra, para um reator de bancada.

Como exemplo destes cálculos, a Tabela 4.6 apresenta os fatores de conversão de células em percentual de lipídeos (dados obtidos a partir do percentual de lipídeo predito pelo modelo (equação 4.5) e concentração celular predita pela equação 4.8). O experimento 5 com as condições: redução de 77,2 % de NO₃ frente ao meio original, sendo o nível de NO₃ mais baixo testado neste trabalho e maiores concentrações de PO₃ propostas apresentou o maior fator de conversão. Este no valor de 54,10 %Lipídeo.(mg.mL⁻¹)⁻¹, foi atingido no quarto dia do cultivo. Com isso, nota-se que a redução do nitrogênio acarretou em uma maior produção de lipídeos no interior das células aliado ao suprimento de fósforo, o qual se mostrou necessário para não reduzir o metabolismo de energia no interior das células. Este relato, da necessidade do suprimento mínimo de fósforo é interessante para a produção de lipídeos também foi apresentado por Chu *et al.* (2014) no cultivo de *S. obliquus* apresentando maior produtividade de lipídeos no oitavo dia, com condições de ausência de nitrogênio e concentrações de 45 mg.L⁻¹ de PO₄³⁻.

Tabela 4.6. Fatores de conversão de células em percentual de lipídeos.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
2	27,53	16,22	33,33	18,80	-3,45	25,44	6,26	-32,09	15,28	28,00
3	-	26,91	13,35	21,60	53,12	-2,48	12,48	16,58	9,98	13,63
4	15,82	15,69	49,41	0,75	54,10	26,50	33,95	-88,21	11,42	14,29
5	2,65	5,31	24,99	-11,33	-11,04	15,13	7,54	-372,01	11,42	0,71
6	8,99	8,78	6,85	-37,39	6,41	12,90	18,51	8,69	11,29	6,87
7	15,45	20,22	10,36	14,07	12,63	41,00	8,54	-7,18	14,27	-2,42
8	-4,97	9,32	6,76	20,95	2,35	-181,02	0,24	0,70	3,72	21,67
9	-3,18	-0,13	13,54	-0,47	7,14	-73,69	-1,63	3,63	6,32	11,63
10	15,85	20,30	13,74	9,38	10,55	-0,26	12,07	15,62	12,35	12,57

A Tabela 4.7 mostra os fatores de conversão de células em carboidrato (produto) ($Y_{p/x}$), obtendo o maior resultado no nono dia de cultivo 140,45 %Carboidrato (mg.mL⁻¹)⁻¹. As condições do experimento em questão foram: 2470 mg.L⁻¹ de C; 141,44 mg.L⁻¹ NO₃ e 38,17 mg.L⁻¹ PO₃, sendo os maiores níveis de carbono e fósforo testados e o inferior de nitrogênio.

Para Pancha *et al.* (2014) a ausência total de nitrogênio por três dias foi a melhor condição para otimizar a produtividade volumétrica dos carboidratos, conseguindo atingir concentrações de biomassa relativamente altas em *Scenedesmus sp.* CCNM 1077 associadas à síntese de carboidratos. Os autores relatam que a biossíntese dos carboidratos é dominante em relação a dos lipídeos. Os dados apresentados, no estudo atual para os $Y_{p/x}$ apontam a maior produção de carboidratos do que lipídeos no interior das células, indo ao encontro das informações descritas por Pancha *et al.* (2014).

Tabela 4.7. Fatores de conversão de células em percentual de carboidratos.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
2	2,97	12,22	30,24	24,92	-19,16	21,72	15,82	5,11	27,13	5,52
3	-2,08	12,47	13,25	11,52	7,52	7,45	8,92	11,30	13,18	22,64
4	12,16	13,15	63,70	19,55	12,37	11,24	-5,11	17,97	16,83	14,50
5	13,15	14,44	32,80	21,65	17,88	12,48	23,27	-	14,47	18,25
6	15,92	16,35	11,08	63,02	15,54	15,60	20,04	17,14	15,88	16,92
7	13,36	11,24	13,33	11,40	15,07	-0,53	14,69	21,99	13,41	16,42
8	-3,08	74,76	22,10	36,29	-197,63	-	25,80	-1,39	32,06	-16,53
9	-3,15	4,36	17,76	-1,18	9,11	140,45	29,54	-12,53	-39,01	0,30
10	12,56	11,75	13,31	14,66	13,79	9,25	13,25	8,85	10,71	12,38

4.4 Validação dos Modelos

A fim de verificar a robustez do método proposto e validar os modelos, foi realizado um novo conjunto de experimentos. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

A Figura 4.15 apresenta os modelos, referentes às equações (4.6) e (4.7), calculados para quantificação dos carboidratos, representado pela linha contínua, além de uma margem de 95 % de confiança (linha tracejada) a qual foi estipulada para este trabalho. Os pontos dispersos representam os resultados do experimento de validação, no qual amostras foram analisadas tanto no FTIR, como no laboratório pelo método tradicional (DUBOIS *et al.*, 1956). Em (a) referente ao FTIR calculado a partir das bandas de absorção entre 1200-950 cm^{-1} e em (b) entre 1180-1133 cm^{-1} . Por meio da Figura 4.15 (b) é possível verificar que picos isolados não são adequados para quantificação dos

carboidratos, pois se observa que a maior parte dos pontos referentes ao experimento de validação está fora da região de confiança do modelo. Já em (a), onde se utiliza uma região maior para o cálculo da área, abrangendo várias ligações características dos carboidratos, tem-se a maior parte dos pontos do experimento dentro da margem de confiança do modelo, o que torna confiável a estimativa dos teores de carboidratos por meio da região estudada de $1200-950\text{ cm}^{-1}$.

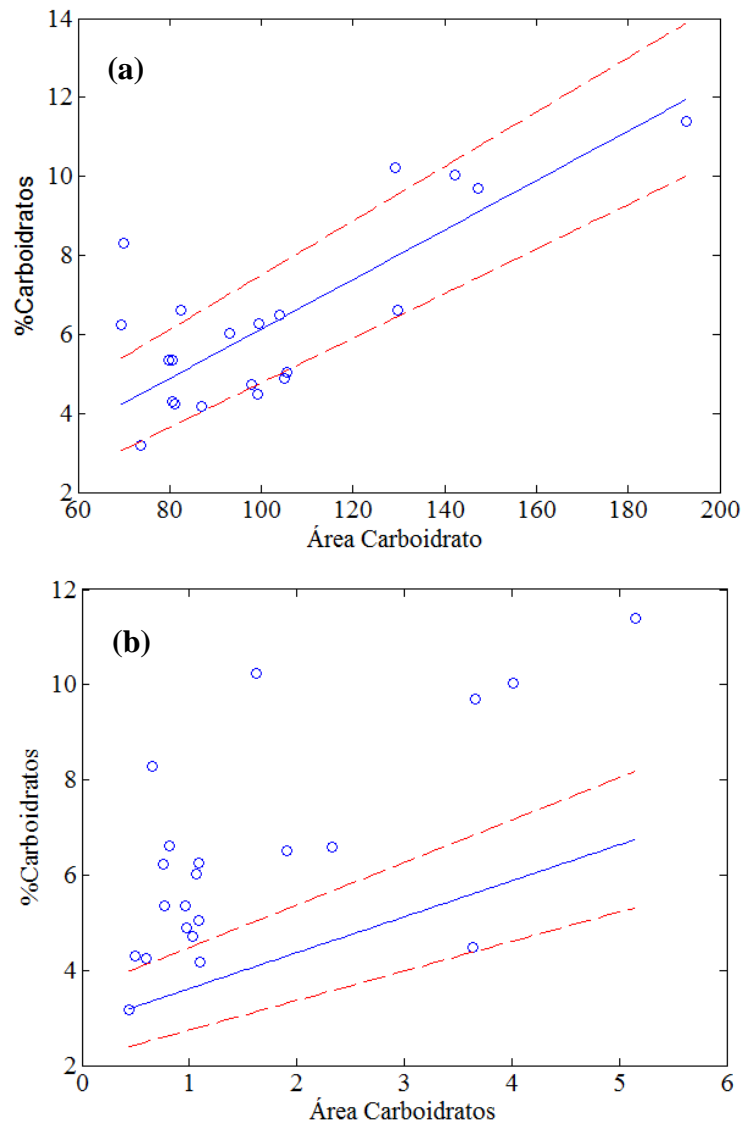


Figura 4.15. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo do conteúdo de carboidratos pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. (a) $1200-950\text{ cm}^{-1}$ e em (b) entre $1180-1133\text{ cm}^{-1}$.

A Figura 4.16 e a Figura 4.17 apresentam os dados dos lipídeos e da concentração celular respectivamente. Da mesma forma que a Figura 4.15, estas mostram a dispersão

dos dados do experimento de validação comparativamente com os modelos gerados em um intervalo de confiança de 95 %.

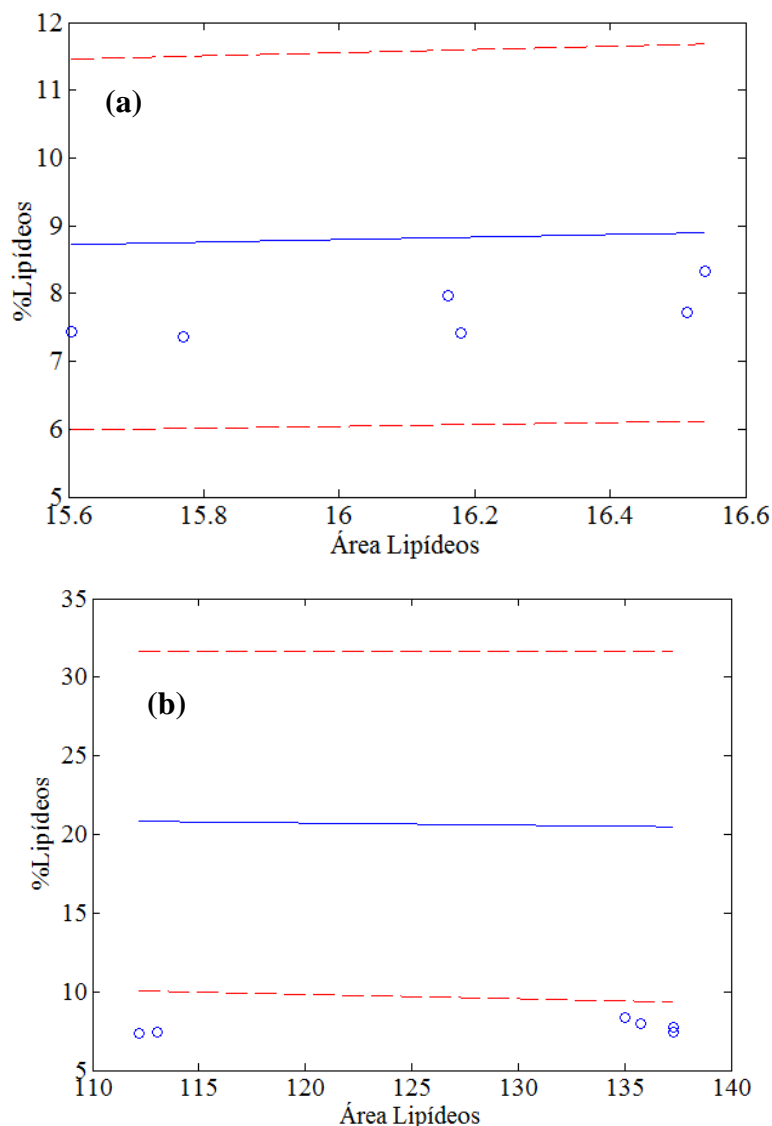


Figura 4.16. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo do conteúdo lipídico pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. Em (a) 3000-2800 cm⁻¹, em (b) 1800-1000 cm⁻¹.

Na Figura 4.16 (b) se tem o intervalo referente a 1800-1000 cm⁻¹, o qual foi mencionado anteriormente por conter vibrações características de carboidratos e proteínas na biomassa de *Scenedesmus sp.* estudada nesta dissertação. Como a quantificação dos lipídeos nesta faixa é realizada de forma inversa, os pontos de lipídeos da batelada de experimentos para validação dos modelos se encontram fora da região de

confiança do modelo, justamente pelo modelo não estar quantificando lipídeos e sim carboidratos e proteínas.

Já para a estimação da concentração celular, a validação do modelo não foi satisfatória, já que a maioria dos pontos se localiza fora da região de confiança do modelo (Figura 4.17). O cultivo de validação apresentou valor máximo de concentração celular superior (até 2 mg.mL^{-1}) ao intervalo em que o modelo foi desenvolvido (aproximadamente $1,3 \text{ mg.mL}^{-1}$). Além disso, a concentração celular foi avaliada por meio de valores absolutos, contendo interferências do meio de cultivo, sendo estas eliminadas das análises dos teores de carboidratos e lipídeos, onde foram realizados para valores relativos à quantidade de biomassa seca que passou pelos processos de extração. Não foram encontrados estudos com este tipo de validação para microalgas, não havendo discussão para estes resultados.

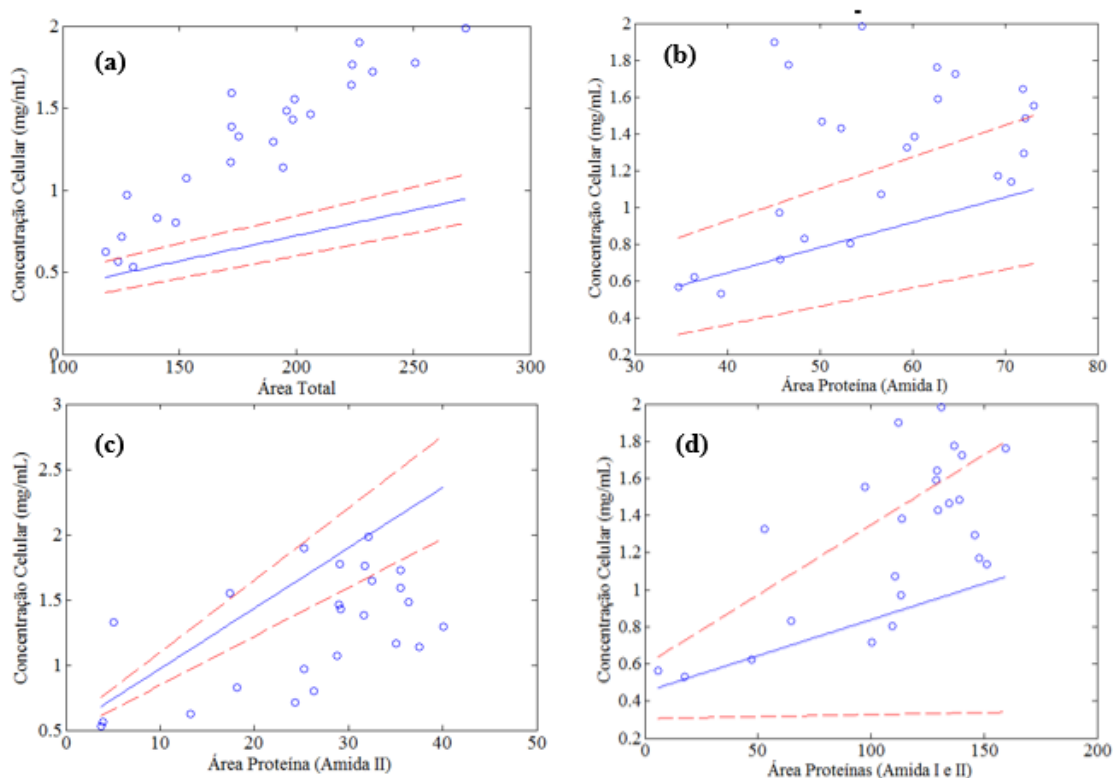


Figura 4.17. Dados experimentais para validação do modelo desenvolvido para o cálculo da concentração celular pelo FTIR. Modelo representado por linha contínua e intervalo de confiança de 95 % por linha tracejada. (a) Área total, (b) Área Amida I, (c) Área Amida II; (d) Área Amida I e II.

Para lipídeos e carboidratos, observa-se que há um número significativo de pontos dentro do intervalo de confiança, quando são avaliadas as regiões entre 3000-2800 cm^{-1} (Figura 4.16 a) e 1200-950 cm^{-1} (Figura 4.15 a), respectivamente. Sendo assim, para estas bandas características de absorção os modelos propostos foram validados. Sabendo que os métodos de laboratório são demorados, trabalhosos e envolvem a utilização de muitos reagentes químicos, acarretando até mesmo em custo no tratamento dos resíduos gerados, os erros inerentes a estimação dos teores de carboidratos e lipídeos por FTIR são satisfatórios, justificando a validade de tal técnica. Somando a isto, o FTIR é uma análise rápida e com potencial para ser desenvolvida *in situ* para acompanhamento em tempo real das concentrações destes metabólitos.

Por fim, será apresentado de forma ilustrativa o comportamento das análises tradicionais e da espectroscopia FTIR. A Figura 4.18 apresenta os dez experimentos realizados sendo a reta inferior (●) representando a área de lipídeos entre 3000-2800 cm^{-1} a qual foi a região validada para quantificação de lipídeos por FTIR e o percentual de lipídeos calculado pelo método tradicional de Bligh e Dyer (1959) – reta superior (■). Nota-se que o comportamento de ambas as curvas é similar.

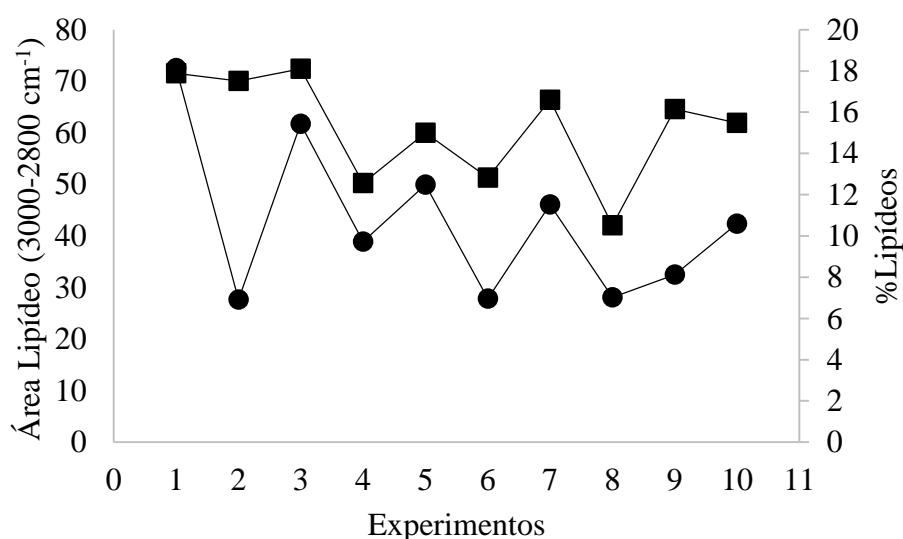


Figura 4.18. Comportamento da quantificação de lipídeos pelo método de Bligh e Dyer (1959) (■) e a área calculada para lipídeos na região de 3000-2800 cm^{-1} (●).

Já na Figura 4.19 apresenta-se os dados referentes ao experimento 1 para ilustrar que o comportamento das análises FTIR (representado pelo símbolo ●) e Dubois *et al.* (1956) (representado por ■) possuem a mesma tendência.

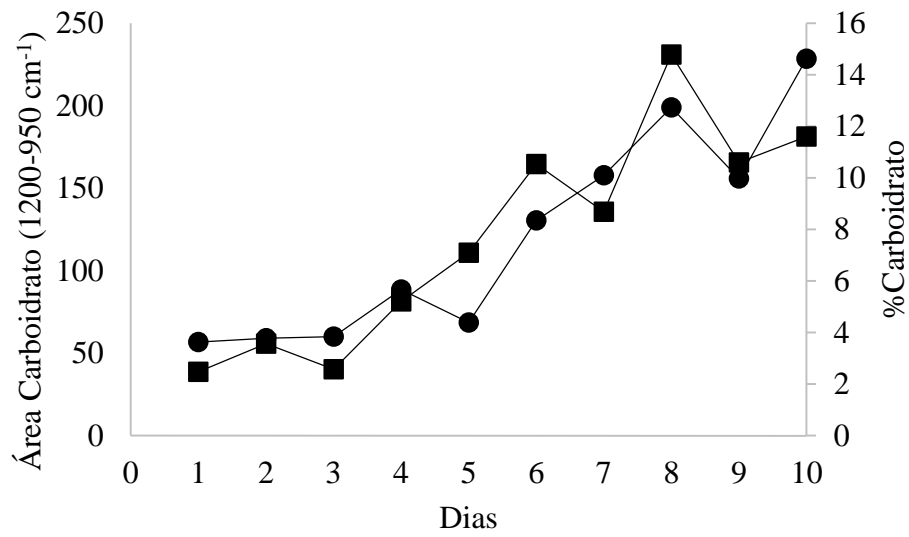


Figura 4.19. Comportamento da quantificação de carboidratos pelo método de Dubois *et al.* (1956) (■) e a área calculada para carboidratos na região de 1200-950 cm⁻¹ (●), referente ao experimento 1.

Capítulo 5- Conclusões e Trabalhos Futuros

Nas condições avaliadas, o melhor pré-tratamento para quantificação dos carboidratos foi com H₂SO₄ P.A. por 30 min à temperatura ambiente. Já para a extração das proteínas não houve diferença significativa entre os pré-tratamentos testados. Desta forma, definiu-se como pré-tratamento a utilização de NaOH 1M adicionado de banho ultrassônico (40Hz) por 30 min, levando em conta a praticidade do procedimento.

A espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) na região do infravermelho médio (MIR) se mostrou uma ferramenta eficaz no monitoramento diário do cultivo de *Scenedesmus sp.* para determinar os teores de lipídeos e carboidratos. É uma análise robusta, rápida e que permite a avaliação de vários parâmetros em um mesmo espectro.

Foram avaliadas as bandas de absorção entre 3000-2800 e 1800-1000 cm⁻¹ para lipídeos. Para carboidratos foram estudadas as regiões entre 1200-950 e 1180-1133 cm⁻¹. Assim, foram desenvolvidos e validados os modelos matemáticos para estimar os teores de lipídeos e carboidratos. O melhor modelo encontrado para lipídeos foi quando analisada a banda de absorção entre 3000-2800 cm⁻¹ resultando no modelo com R²=0,8265. Para os carboidratos, entre 1200-950 cm⁻¹ resultou uma melhor correlação com R²=0,8023. Já para relacionar proteínas por FTIR e métodos tradicionais, a metodologia de Lowry *et al.* (1951) não foi uma boa escolha, uma vez que o FTIR quantifica proteínas totais e Lowry *et al.* (1951) proteínas hidrossolúveis. Para avaliação da concentração celular foram encontradas equações com R² superiores a 0,7, porém ao executar uma nova batelada de experimentos o comportamento não se manteve. Não foi possível validar os modelos para prever as concentrações celulares.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que *Scenedesmus sp.* pode ter seu metabolismo monitorado por meio do FTIR com boas estimativas para lipídeos e carboidratos.

Como sugestão para trabalhos futuros:

- Avaliar outros métodos de quantificação de proteínas para vincular ao FTIR;
- Utilizar outras cepas de microalgas para avaliar carboidratos e lipídeos;
- Desenvolver metodologias para avaliar por meio da espectroscopia FTIR a biomassa em suspensão;
- Desenvolver sensores customizados nos comprimentos de onda específicos dos compostos de interesse que possam quantificar lipídeos e/ou carboidratos.

Referências Bibliográficas

AKKERMAN, I.; JANSSEN, M.; ROCHA, J.; WIJFFELS, R. H. Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 27, n. 11–12, p. 1195–1208, 2002.

ALISKE, M. A. **Medidas de Espectroscopia no Infravermelho Médio para a Determinação do Teor de Biodiesel em Óleo Diesel**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2010.

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

ANDRADE, R. B.; OLIVEIRA, T. C.; KICH, J. N. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. 2013

ANSARI, F. A.; GUPTA, S. K.; RAWAT, I.; GULDHE, A.; BUX, F. Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: A step closer to the biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 559–564, 2015.

ARAUJO, G. S. **Utilização de microalgas na biotecnologia, com ênfase para biodiesel e análise de imunoparâmetros em camarões marinhos**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2011.

ARRIADA, A. D. E. A. **Cultivo da Microalga Marinha Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) em Água de Produção de Petróleo: Viabilidade de Crescimento, Produção de Lipídeo e Açúcares**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande, 2014.

BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 5, p. 447–460, 2005.

BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single - cell proteins . A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 20, n. 3, p. 1–8, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BURNS, D.; CIURCZAK, E. W. **Near-Infrared Analysis**. 30. ed. New York: CRC Press, 2007.

- CANTRELL, K. B.; DUCEY, T.; RO, K. S.; HUNT, P. G. Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7941–7953, 2008.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora UNICAMP, 2003.
- CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 593–604, 1993.
- CHEN, C.; ZHAO, X.; YEN, H.; HO, S.; CHENG, C. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.
- CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. V. Optimizing the Critical Factors for Lipid Productivity during Stress Phased Heterotrophic Microalgae Cultivation. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, n. August, p. 1–10, 2016.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.
- CHU, F. F.; CHU, P. N.; SHEN, X. F.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 241–246, 2014.
- COMAS, A. Las Chlorococcales dulciacuículas de Cuba. **Biblioteca Phycologica**, v. 99, p. 1–265, 1996.
- DEAN, A. P.; SIGEE, D. C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J. K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4499–4507, 2010.
- DEAN, A. P.; NICHOLSON, J. M.; SIGEE, D. C. Impact of phosphorus quota and growth phase on carbon allocation in *Chlamydomonas reinhardtii*: an FTIR microspectroscopy study. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 345–3354, 2008.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.
- DIFUSA, A.; MOHANTY, K.; GOUD, V. V. The chemometric approach applied to FTIR spectral data for the analysis of lipid content in microalgae cultivated in different nitrogen sources. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 427–433, 2016.
- DISMUKES, G. C.; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G. M.; POSEWITZ, M. C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 235–240, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMITTON, J. K.; REDERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.

FENG, G.; ZHANG, F.; CHENG, L.; XU, X.; ZHANG, L.; CHEN, H. Bioresource Technology Evaluation of FT-IR and Nile Red methods for microalgal lipid characterization and biomass composition determination. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 107–112, 2013.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 1, p. 25–28, 1999.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. **A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues** *J Biol Chem*, 1957. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/226/1/497.short>>

FONTOURA, J. T.; ROTERMUND, S. V.; RAMIREZ, N. N. V.; RUBLESKE, M. B.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. **REMOVAL OF NITROGEN IN TANNERY WASTEWATER USING *Scenedesmus sp.*** Florianópolis IV SOLABIAA, , 2015a.

FONTOURA, T. J.; ROTERMUND, S.; ARAUJO, A. L.; RAMIREZ, N.; RUBLESKE, M.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. **Tannery Wastewater Treatment with *Scenedesmus sp.*** Novo Hamburgo XXXIII IULTCS Congress, , 2015b.

FREITAS, B. C. B. **Cultivo de Microalgas Utilizando Pentoses como Fonte de Carbono**. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande, 2012.

GERLOFF-ELIAS, A.; SPIJKERMAN, E.; PROSCHOLD, T. Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 1218–1229, 2005.

GIORDANO, M.; KANSIZ, M.; HERAUD, P.; BEARDALL, J.; WOOD, B.; MCNAUGHTON, D. Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Novel Tool to Investigate Changes in Intracellular Macromolecular Pools in the Marine Microalga *Chaetoceros Muellerii* (Bacillariophyceae). v. 37, p. 271–279, 2001.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, 2009.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures take into account incidente and avareged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59–69, 1996.

HAKALIN, N. L. S.; PAZ, A. P.; ARANDA, D. A. G.; MORAES, L. M. P. Enhancement of Cell Growth and Lipid Content of a Freshwater Microalga *Scenedesmus sp.* by Optimizing Nitrogen, Phosphorus and Vitamin Concentrations for Biodiesel Production. **Natural Science**, v. 6, n. 12, p. 1044–1054, 2014.

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

HEGEWALD, E. Taxonomy and phylogeny of Scenedesmus. **The Korean Journal of Phycology**, v. 12, p. 235–246, 1997.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 939–945, 2015.

HIRANO, A.; UEDA, R.; HIRAYAMA, S.; OGUSHI, Y. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. **Pergamon**, v. 22, n. 2, p. 137–142, 1997.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. 1^o ed. New York: George Thieme Verlag, 1995.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumentaç**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

IHNKEN, S.; BEARDALL, J.; KROMKAMP, J. C.; SERRANO, C. G.; TORRES, M. A.; MALPARTIDA, I.; ABDALA, R.; JEREZ, C. G.; MALAPASCUA, J. R.; NAVARRO, E.; RICO, R. M.; PERALTA, E.; EZEQUIL, J. P. F.; FIGUEROA, F. L. Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 95–110, 2014.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, p. 295–326, 2012.

LANE, A. E.; BURRIS, J. E. Effects of Environmental pH on the Internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*. **Plant Physiology**, v. 68, p. 439–442, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LI, Y.; HAN, D.; HU, G.; DAUVILLEE, D.; SOMMERFELD, M.; BALL, S.; HU, Q. *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyperaccumulates triacylglycerol. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 4, p. 387–391, 2010.

LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. **Seaweed Ecology and Physiology**. New York: Cambridge University Press, 1994.

LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. C. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587–7591, 2010.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São

Carlos: Rima, 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**, p. 265–275, 1951.

MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under various amounts of limited phosphorus. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 533–535, 2012.

MENG, Y.; YAO, C.; XUE, S.; YANG, H. Application of fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 347–354, 2014.

METTING-JR, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 477–489, 1996.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MIRÓN, A. S.; GARCÍA, M. C. C.; GÓMEZ, A. C.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 287–297, 2003.

MOLLER, A. P.; BIARD, C.; BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; NINNI, P.; SAINO, N. Carotenoid-dependent Signals: Indicators of Foraging Efficiency, Immunocompetence or Detoxification Ability? **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 137–159, 2000.

MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 57–70, 2011.

MYKLESTAD, S.; HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willwi* (gram) Hustedt. I. effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 9, n. 1969, p. 125–136, 1972.

NETO, C. A.; STILLING, C.; WENDORFF, J. H.; COSTA, J. A. V.; RUDISILE, M. M.; MORAIS, M. G.; PRANKE, P. H. L.; DERSCH, R. **Matrizes de micro-e/ou nanofibras biodegradáveis para desenvolvimento de suporte para células-tronco ou diferenciadas oriundas de biopolímeros extraídos de microalga(s) e/ou cianobactéria(s)** Brasil, 2011. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/62490/000864063.pdf?sequence=1>>

OQUIST, G. Effects of low temperature on photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v. 6, p. 281–300, 1983.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the

microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.

PERKINELMER. **FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)** PerkinElmer Life and Analytical Sciences. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.utsc.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf>.

PETERSON, G. L. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 201–220, 1979.

PISTORIUS, A. M. A.; DEGRIP, W. J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T. A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 123–129, 2009.

PLEISSNER, D.; LAM, W. C.; SUN, Z.; LIN, C. S. K. Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 139–146, 2013.

QIN, J. **Bio - Hydrocarbons from Algae Rural Industries Research**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://en.scientificcommons.org/58196998>>.

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo do Crescimento da Microalga *Scenedesmus sp.* em Vinhaça**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; MOURA, C. W. N. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. v. 42, n. 3, p. 549–566, 2015.

RAS, M.; STEYER, J.; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p. 153–164, 2013.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G. TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100–112, 2009.

RODRIGUES, J. A. G.; NETO, É. M.; SANTOS, G. R. C.; PAULA, R. C. M.; MOURÃO, P. A. S.; BENEVIDES, N. B. Structural analysis of a sulfated polysaccharidic fraction obtained from the coenocytic green seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 36, n. 2, p. 203, 2014.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, n. 1, p. 61–65, 2014.

SALVUCCI, M. E.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 179–186, 2004.

SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A.; AZEVEDO, M. T. P.; MELCHER, S. S.; WERNER, V. R.; MALONE, C. F. S.; ROSSINI, E. F.; JACINAVICIUS, F. R.; HENTSCHKE, G.

S.; OSTI, J. A. S.; SANTOS, K. R. S. S.; GAMA-JUNIOR, W. A.; ROSAL, C.; ADAME, G. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras** Instituto de Botânica, , 2012. (Nota técnica).

SANTOS, F. R. **Método de Lowry : Validação e Estimativa do Cálculo da Incerteza**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2012.

SCHREDER. Iluminância. Disponívem em: <<http://www.schreder.com/pt-pt/learningcenter/conceitosbasicosdeiluminacao/illuminance>>. Acesso: 25 de Abril de 2017.

SCHULZE, C.; REINHARDT, J.; WURSTER, M.; ORTIZ-TENA, J. G.; SIEBER, V.; MUNDT, S. A one-stage cultivation process for lipid- and carbohydrate-rich biomass of *Scenedesmus obtusiusculus* based on artificial and natural water sources. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 498–504, 2016.

SERVAITES, J. C.; FAETH, J. L.; SIDHU, S. S. A dye binding method for measurement of total protein in microalgae. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 75–80, 2012.

SETTLE, F. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. New Jersey: Prentice Hall, 1997.

SHEKH, A. Y.; SHRIVASTAVA, P.; KRISHNAMURTHI, K.; MUDLIAR, S. N.; DEVI, S. S.; KANADE, G. S.; CHAKRABARTI, T. Stress enhances poly-unsaturation rich lipid accumulation in *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. **Biomass and Bioenergy**, v. 84, p. 59–66, 2016.

SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. Phytoplankton lipids: inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. **Journal of Phycology**, v. 17, p. 374–384, 1981.

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 337–341, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compunds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 9, p. 2596–2610, 2010.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies**. 3. ed. London: John Wiley & Sons, 2004.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Organic Chemistry**. New York: Wiley, 2013.

SOUZA, R. B.; QUEIROZ, I. N. L.; NETO, A. A. S.; CARNEIRO, J. G.; RODRIGUES, J. A. G.; BENEVIDES, N. M. B. Analysis of two precipitation methods on the yield, structural features and activity of sulfated polysaccharides from *Gracilaria cornea* (Rhodophyta). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 1, p. 31, 2015.

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

SRIRANGAN, S.; SAUER, M. L.; HOWARD, B.; DVORA, M.; DUMS, J.; BACKMAN, P.; SEDEROFF, H. Interaction of temperature and photoperiod increases growth and oil content in the marine microalgae *Dunaliella viridis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–32, 2015.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2004. v. 8

SUN, D. **Infrared Spectroscopy: For Food Quality Analysis and Control**. [s.l.] Academic Press, 2009.

SUNDARAMOORTHY, B.; THIAGARAJAN, K.; MOHAN, S.; MOHAN, S.; RAO, P. R.; RAMAMOORTHY, S.; CHANDRASEKARAN, R. Biomass characterisation and phylogenetic analysis of microalgae isolated from estuaries : Role in phycoremediation of tannery effluent. **Algal Research**, v. 14, p. 92–99, 2016.

TOYOSHIMA, M.; SATO, N. High-level accumulation of triacylglycerol and starch in photoautotrophically grown *Chlamydomonas debaryana* NIES-2212. **Plant and Cell Physiology Advance**, p. 1–34, 2015.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUELIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014.

VOGEL, A. I. **Quantitative Chemical Analysis**. 5. ed. London: Longman Scientific & Technical, 1989.

WANG, L.; LI, Y.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 289–295, 2013.

WELLNER, N. **Fourier transform infrared (FTIR) and Raman microscopy: principles and applications to food microstructures**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2013.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp . under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3098–3102, 2011.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic , mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87–102, 2000.

Apêndice I

As tabelas a seguir apresentam os resultados obtidos para o crescimento celular, tores de proteínas e carboidratos para os experimentos por meio dos métodos tradicionais.

Tabela I.1. Dados obtidos de concentração celular (mg.mL^{-1}) para *Scenedesmus sp.* durante os cultivos utilizando o método tradicional.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
0	0,13	0,20	0,14	0,17	0,15	0,21	0,15	0,18	0,17	0,20
1	0,22	0,30	0,21	0,27	0,24	0,34	0,24	0,31	0,26	0,29
2	0,37	0,41	0,38	0,35	0,39	0,39	0,42	0,38	0,31	0,39
3	0,48	0,45	0,50	0,37	0,49	0,41	0,52	0,35	0,40	0,42
4	0,60	0,52	0,60	0,39	0,61	0,45	0,63	0,43	0,45	0,50
5	0,70	0,50	0,66	0,40	0,68	0,50	0,71	0,42	0,54	0,55
6	0,81	0,54	0,62	0,36	0,77	0,48	0,78	0,41	0,61	0,60
7	1,01	0,65	0,90	0,42	1,02	0,51	1,04	0,44	0,75	0,78
8	1,03	0,59	0,89	0,44	0,87	0,53	1,07	0,46	0,77	0,83
9	1,04	0,66	0,95	0,49	1,14	0,58	1,18	0,50	0,81	0,83
10	1,12	0,64	0,99	0,50	1,02	0,58	1,22	0,53	0,87	0,84

Tabela I.2. Dados obtidos de percentual de proteínas para *Scenedesmus sp.* durante os cultivos utilizando o método tradicional.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
0	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43	21,43
1	54,52	31,60	7,11	12,35	12,70	0,69	4,61	0,42	3,66	21,99
2	11,03	3,96	3,89	3,04	8,44	1,11	13,04	14,15	2,39	10,34
3	12,10	7,26	14,00	23,89	16,62	7,41	12,23	11,43	14,08	7,36
4	18,11	10,05	12,85	11,35	17,80	5,98	22,71	5,65	10,46	9,00
5	9,63	6,39	8,41	8,08	7,53	3,49	8,72	6,11	5,65	8,53
6	9,03	8,50	7,76	8,05	11,63	14,20	14,20	5,21	6,89	8,09
7	9,08	8,54	9,71	8,24	11,02	6,42	6,69	6,45	4,67	12,69
8	15,76	13,86	7,04	12,49	15,60	9,07	11,18	12,57	9,97	12,58
9	9,83	16,56	11,91	10,05	12,26	12,19	9,47	16,62	6,10	9,69
10	12,45	9,82	7,74	9,99	6,80	7,14	9,03	5,72	7,09	8,41

Tabela I.3. Dados obtidos de percentual de carboidratos para *Scenedesmus sp.* durante os cultivos utilizando o método tradicional.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
0	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22	14,22
1	2,48	1,85	1,01	1,22	0,96	0,63	1,23	1,53	0,83	2,86
2	3,57	4,24	2,44	3,74	2,40	5,53	3,91	4,54	1,64	2,88
3	2,57	4,98	5,19	3,75	2,61	2,28	3,96	3,82	3,89	3,65
4	5,21	6,75	6,40	5,18	3,31	2,79	3,27	3,42	2,18	2,76
5	7,09	5,93	6,42	4,10	6,08	4,50	4,72	3,92	1,91	3,81
6	10,53	9,69	10,54	4,72	7,73	6,29	6,51	2,70	6,68	7,92
7	8,69	6,69	8,55	4,19	8,60	6,44	7,72	4,88	5,74	8,67
8	14,78	12,05	10,59	6,71	10,68	6,60	7,56	6,42	7,44	8,30
9	10,60	12,81	12,61	6,88	12,40	10,31	11,14	7,13	10,08	11,72
10	11,61	9,95	12,49	7,85	13,30	5,77	6,57	5,61	6,11	7,83

Tabela I.4. Dados obtidos de percentual de lipídeos para *Scenedesmus sp.* durante os cultivos utilizando o método tradicional.

Dia	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
0	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55	11,55
10	17,88	17,51	18,10	12,56	15,00	12,82	16,59	10,52	16,15	15,48

As Tabelas a seguir apresentam os dados utilizados para obtenção dos modelos apresentados para prever os teores de carboidratos, proteínas, células e lipídeos.

Tabela I.5. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação dos lipídeos.

Área (1800-1000 cm^{-1})	%Lipídeos	Área (3000-2800 cm^{-1})	%Lipídeos
714,83	11,55	33,23	11,55
649,69	17,88	72,56	17,88
445,51	17,51	61,74	18,10
585,53	18,10	38,85	12,56
592,68	12,56	27,82	12,82
655,23	16,59	46,07	16,59
578,53	16,15	28,08	10,52
647,09	15,48	42,37	15,48

Tabela I.6. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação dos carboidratos.

Área (1180-1133 cm^{-1})	% Carboidratos	Área (1200-950 cm^{-1})	% Carboidratos
-0,16	2,48	220,49	14,22
1,31	3,57	56,68	2,48
0,85	2,57	59,05	3,57
4,03	5,21	59,96	2,57
0,51	7,09	88,62	5,21
7,04	10,53	68,62	7,09
8,51	8,69	130,51	10,53
10,52	14,78	157,75	8,69
8,98	10,60	198,96	14,78

13,51	11,61	155,84	10,60
0,81	1,85	228,39	11,61
3,60	4,24	220,49	14,22
1,52	4,98	49,33	1,85
4,82	6,75	66,60	4,24
1,28	5,93	56,27	4,98
7,74	9,69	92,10	6,75
9,34	6,69	59,14	5,93
6,90	12,05	131,22	9,69
7,39	12,81	153,84	6,69
8,38	9,95	220,49	14,22
1,51	2,44	69,74	1,01
3,44	5,19	52,53	2,44
5,10	6,40	90,56	5,19
4,90	6,42	96,35	6,40
4,73	10,54	106,15	6,42
9,60	8,55	158,30	8,55
10,50	12,61	98,25	10,59
12,91	12,49	170,76	12,61
2,14	1,22	220,73	12,49
1,27	3,74	220,49	14,22
1,81	3,75	58,51	1,22
3,02	5,18	39,04	3,74
2,33	4,10	55,98	3,75
4,45	4,72	67,73	5,18
6,36	4,19	56,43	4,10
1,55	6,71	67,52	4,72
3,33	6,88	97,55	4,19
9,80	7,85	61,83	6,71
2,50	0,96	63,49	6,88
1,08	2,40	166,48	7,85
0,43	2,61	220,49	14,22
2,03	3,31	70,70	0,96

1,03	6,08	65,55	2,40
6,49	7,73	62,58	2,61
7,79	8,60	68,09	3,31
5,26	10,68	58,70	6,08
10,83	13,30	132,95	7,73
1,32	5,53	153,61	8,60
2,28	2,28	135,55	10,68
2,67	2,79	225,97	13,30
0,86	4,50	220,49	14,22
6,25	6,29	71,20	0,63
5,91	6,44	55,59	5,53
3,38	6,60	56,76	2,28
5,09	10,31	71,61	2,79
7,05	5,77	45,87	4,50
0,64	3,91	111,33	6,29
1,33	3,96	111,10	6,44
1,95	3,27	83,13	6,60
0,50	4,72	109,60	10,31
3,32	6,51	111,12	5,77
8,41	7,72	220,49	14,22
2,74	7,56	45,67	3,91
7,82	11,14	71,33	3,96
2,79	1,53	74,44	3,27
1,70	4,54	68,16	4,72
1,73	3,82	91,80	6,51
3,58	3,42	152,69	7,72
0,86	3,92	87,60	7,56
5,94	2,70	142,91	11,14
4,34	4,88	220,49	14,22
1,88	6,42	54,40	1,53
2,69	7,13	56,61	4,54
5,93	5,61	63,49	3,82
0,46	1,64	60,11	3,42

1,16	3,89	55,36	3,92
3,98	2,18	92,44	2,70
0,75	1,91	75,57	4,88
5,98	6,68	73,56	6,42
7,53	5,74	85,24	7,13
3,78	7,44	98,80	5,61
5,59	10,08	220,49	14,22
7,68	6,11	64,41	0,83
1,44	2,86	48,25	1,64
1,54	2,88	75,90	3,89
0,71	3,65	85,82	2,18
3,41	2,76	53,29	1,91
0,80	3,81	108,57	6,68
6,36	7,92	134,80	5,74
6,09	8,67	93,49	7,44
4,48	8,30	129,63	6,11
5,29	11,72	220,49	14,22
9,90	7,83	78,24	2,86
		75,66	2,88
		54,18	3,65
		85,30	2,76
		61,93	3,81
		126,73	7,92
		115,94	8,67
		93,33	8,30
		161,58	7,83

Tabela I.7. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação das proteínas.

Área Amida Ie II	%proteínas	Área Amida II	%proteínas	Área Amida I	%proteínas
41,17	12,10	1,59	12,10	63,98	21,43
18,70	18,11	7,30	18,11	40,62	11,03
58,62	9,63	-2,64	9,63	39,29	12,10

30,88	9,03	4,41	9,03	45,74	18,11
42,82	9,08	5,48	9,08	36,34	9,63
39,72	9,83	14,43	15,76	41,29	9,03
46,26	12,45	6,59	9,83	44,68	9,08
32,75	7,26	8,14	12,45	60,63	15,76
25,22	10,05	0,36	7,26	45,33	9,83
31,91	6,39	1,54	10,05	58,78	12,45
24,47	8,50	-0,86	6,39	63,98	21,43
35,24	8,54	1,83	8,50	29,24	3,96
50,29	13,86	2,70	8,54	30,32	7,26
43,07	16,56	4,84	13,86	35,19	10,05
50,98	9,82	10,14	16,56	26,06	6,39
33,21	14,00	-3,56	9,82	30,11	8,50
24,43	12,85	3,67	14,00	34,47	8,54
29,54	8,41	4,63	12,85	53,80	13,86
17,88	7,76	4,54	8,41	28,84	16,56
30,21	9,71	2,93	7,76	26,59	9,82
51,63	7,04	4,64	9,71	63,98	21,43
30,39	11,91	5,25	7,04	25,30	7,11
34,80	7,74	5,42	11,91	37,39	3,89
22,90	23,89	6,10	7,74	44,50	14,00
14,49	11,35	3,41	11,35	39,03	12,85
23,04	8,08	4,57	8,08	32,76	8,41
28,81	8,05	0,61	8,05	22,68	7,76
40,54	8,24	-0,18	8,24	40,19	9,71
49,93	12,49	5,50	12,49	51,47	7,04
25,66	10,05	1,55	10,05	42,94	11,91
43,25	9,99	0,30	17,80	51,54	7,74
46,38	16,62	4,01	7,53	63,98	21,43
30,22	17,80	3,07	11,63	27,31	3,04
31,60	7,53	5,20	11,02	29,68	11,35
36,16	11,63	5,56	15,60	28,43	8,08
40,88	11,02	2,58	12,26	23,12	8,05

18,81	12,26	4,62	6,80	33,89	8,24
36,35	6,80	-1,70	7,41	56,64	12,49
37,72	7,41	0,00	14,20	26,56	10,05
33,32	5,98	0,16	6,42	43,44	9,99
36,62	14,20	3,58	9,07	63,98	21,43
29,68	6,42	3,46	12,19	27,68	12,70
41,54	9,07	-1,50	7,14	38,56	8,44
17,12	12,19	2,82	12,23	40,61	16,62
49,90	7,14	4,19	8,72	36,00	17,80
34,37	12,23	4,51	14,20	32,82	7,53
10,18	22,71	5,56	6,69	44,90	11,63
36,64	8,72	4,70	11,18	46,14	11,02
16,16	14,20	4,46	9,47	65,98	15,60
40,47	6,69	5,79	9,03	25,27	12,26
57,99	11,18	-0,38	11,43	53,07	6,80
31,49	9,47	-3,88	5,65	63,98	21,43
41,17	9,03	1,55	6,11	22,09	0,69
36,46	11,43	-1,42	5,21	29,32	1,11
33,62	5,65	4,80	12,57	31,46	7,41
33,78	6,11	0,05	5,72	31,55	5,98
50,43	5,21	0,30	14,08	26,08	3,49
39,12	6,45	1,37	10,46	27,26	14,20
44,88	12,57	1,33	6,89	30,26	6,42
1,97	16,62	2,59	4,67	49,80	9,07
48,72	5,72	3,24	9,97	31,82	12,19
30,05	14,08	-2,83	6,10	33,64	7,14
28,87	10,46	1,40	7,09	63,98	21,43
37,17	5,65	-0,23	7,36	29,83	4,61
27,62	6,89	0,60	9,00	24,33	13,04
37,61	4,67	1,90	8,53	44,78	12,23
52,78	9,97	1,98	8,09	37,83	8,72
46,97	6,10	2,43	12,69	30,69	14,20
43,21	7,09	6,56	12,58	41,71	6,69

37,32	7,36	2,68	9,69	55,97	11,18
22,42	9,00	1,27	8,41	39,56	9,47
34,46	8,53			54,48	9,03
28,14	8,09			63,98	21,43
29,04	12,69			17,74	0,42
31,50	9,69			28,91	14,15
45,92	8,41			30,95	11,43
				24,93	5,65
				25,97	6,11
				26,30	5,21
				25,80	6,45
				56,60	12,57
				27,21	16,62
				36,58	5,72
				63,98	21,43
				20,67	3,66
				27,85	2,39
				35,57	14,08
				35,30	10,46
				31,01	5,65
				32,91	6,89
				36,86	4,67
				53,72	9,97
				32,90	6,10
				43,88	7,09
				63,98	21,43
				26,67	10,34
				33,31	7,36
				35,28	9,00
				33,06	8,53
				36,84	8,09
				33,80	12,69
				28,73	9,69

48,87

8,41

Tabela I.8. Dados experimentais utilizados para obtenção dos modelos para estimação da concentração celular.

Área Amida Ie II	conc. celular	Área Amida II	conc. celular	Área Amida I	conc. celular	Área Total	conc. celular
40,83	0,22	-2,83	0,13	34,23	0,22	92,38	0,22
35,28	0,37	0,16	0,22	40,62	0,37	108,58	0,37
41,17	0,48	3,32	0,37	39,29	0,48	99,75	0,48
18,70	0,60	1,59	0,48	45,74	0,60	147,41	0,60
58,62	0,70	7,30	0,60	36,34	0,70	116,65	0,70
30,88	0,81	-2,64	0,70	41,29	0,81	195,26	0,81
42,82	1,01	4,41	0,81	44,68	1,01	236,49	1,01
81,88	1,03	5,48	1,01	60,63	1,03	316,01	1,03
39,72	1,04	14,43	1,03	45,33	1,04	242,91	1,04
46,26	1,12	6,59	1,04	58,78	1,12	359,74	1,12
30,15	0,30	8,14	1,12	25,64	0,30	75,73	0,30
37,30	0,41	-2,83	0,20	29,24	0,41	104,30	0,41
32,75	0,45	-1,30	0,30	30,32	0,45	87,55	0,45
25,22	0,52	-1,95	0,41	35,19	0,52	142,63	0,52
31,91	0,50	0,36	0,45	26,06	0,50	96,46	0,50
24,47	0,54	1,54	0,52	30,11	0,54	185,63	0,54
35,24	0,65	-0,86	0,50	34,47	0,65	226,31	0,65
50,29	0,59	1,83	0,54	53,80	0,59	219,53	0,59
43,07	0,66	2,70	0,65	28,84	0,66	187,80	0,66
50,98	0,64	4,84	0,59	26,59	0,64	160,02	0,64
43,95	0,21	10,14	0,66	25,30	0,21	101,92	0,21
44,09	0,38	-3,56	0,64	37,39	0,38	90,40	0,38
33,21	0,50	-2,83	0,14	44,50	0,50	148,44	0,50
24,43	0,60	-3,79	0,21	39,03	0,60	150,28	0,60
29,54	0,66	-0,01	0,38	32,76	0,66	156,33	0,66
17,88	0,62	3,67	0,50	22,68	0,62	126,50	0,62
30,21	0,90	4,63	0,60	40,19	0,90	230,42	0,90

51,63	0,89	4,54	0,66	51,47	0,89	258,07	0,95
30,39	0,95	2,93	0,62	42,94	0,95	334,00	0,99
34,80	0,99	4,64	0,90	51,54	0,99	82,43	0,27
29,39	0,27	5,25	0,89	18,70	0,27	66,63	0,35
37,02	0,35	5,42	0,95	27,31	0,35	96,38	0,37
22,90	0,37	6,10	0,99	29,42	0,37	108,53	0,39
14,49	0,39	-2,83	0,17	29,68	0,39	97,98	0,40
23,04	0,40	-6,58	0,27	28,43	0,40	101,54	0,36
28,81	0,36	-0,69	0,35	23,12	0,36	154,81	0,42
40,54	0,42	2,16	0,37	33,89	0,42	134,91	0,44
49,93	0,44	3,41	0,39	56,64	0,44	106,71	0,49
25,66	0,49	4,57	0,40	26,56	0,49	106,39	0,24
43,25	0,50	0,61	0,36	43,44	0,50	111,82	0,39
44,21	0,24	-0,18	0,42	27,68	0,24	103,82	0,49
47,34	0,39	5,50	0,44	38,56	0,39	112,82	0,61
46,38	0,49	1,55	0,49	40,61	0,49	198,87	0,77
30,22	0,61	0,28	0,50	36,00	0,61	226,60	1,02
31,60	0,68	-2,83	0,15	32,82	0,68	228,44	0,87
36,16	0,77	-10,01	0,24	44,90	0,77	328,97	1,02
40,88	1,02	-2,16	0,39	46,14	1,02	100,29	0,34
77,71	0,87	-1,16	0,49	65,98	0,87	85,75	0,39
18,81	1,14	0,30	0,61	25,27	1,14	88,93	0,41
36,35	1,02	4,01	0,68	53,07	1,02	115,64	0,45
47,81	0,34	3,07	0,77	22,09	0,34	73,93	0,50
44,25	0,39	5,20	1,02	29,32	0,39	158,81	0,48
37,72	0,41	5,56	0,87	31,46	0,41	167,54	0,51
33,32	0,45	2,58	1,14	31,55	0,45	165,44	0,53
28,45	0,50	4,62	1,02	26,08	0,50	169,25	0,58
36,62	0,48	-2,83	0,21	27,26	0,48	172,59	0,58
29,68	0,51	-8,60	0,34	30,26	0,51	72,73	0,42
41,54	0,53	-1,29	0,39	49,80	0,53	130,92	0,52
17,12	0,58	-1,70	0,41	31,82	0,58	118,62	0,63
49,90	0,58	-2,21	0,45	33,64	0,58	311,48	1,22

45,17	0,24	1,29	0,50	29,83	0,24	77,25	0,31
31,45	0,42	0,00	0,48	24,33	0,42	85,96	0,38
34,37	0,52	0,16	0,51	44,78	0,52	98,30	0,35
10,18	0,63	3,58	0,53	36,32	0,63	94,49	0,43
36,64	0,71	3,46	0,58	37,83	0,71	93,97	0,42
16,16	0,78	-1,50	0,58	30,69	0,78	137,71	0,41
40,47	1,04	-2,83	0,15	41,71	1,04	122,20	0,44
57,99	1,07	-4,71	0,24	55,97	1,07	151,33	0,46
31,49	1,18	-0,89	0,42	39,56	1,18	132,48	0,50
41,17	1,22	2,82	0,52	54,48	1,22	163,47	0,53
35,55	0,31	2,92	0,63	17,74	0,31	91,23	0,26
36,93	0,38	4,19	0,71	28,91	0,38	79,18	0,31
36,46	0,35	4,51	0,78	30,95	0,35	121,60	0,40
33,62	0,43	5,56	1,04	24,93	0,43	133,53	0,45
33,78	0,42	4,70	1,07	25,97	0,42	88,05	0,54
50,43	0,41	4,46	1,18	26,30	0,41	158,47	0,61
39,12	0,44	5,79	1,22	25,80	0,44	198,04	0,75
44,88	0,46	-2,83	0,18	56,60	0,46	171,98	0,77
1,97	0,50	-4,08	0,31	27,21	0,50	164,60	0,81
48,72	0,53	-0,56	0,38	36,58	0,53	206,02	0,87
38,67	0,26	-0,38	0,35	20,67	0,26	116,57	0,29
36,63	0,31	-3,88	0,43	27,85	0,31	107,14	0,39
30,05	0,40	1,55	0,42	35,57	0,40	87,94	0,42
28,87	0,45	-1,42	0,41	35,30	0,45	131,36	0,50
37,17	0,54	-1,62	0,44	31,01	0,54	105,46	0,55
27,62	0,61	4,80	0,46	32,91	0,61	182,91	0,60
37,61	0,75	3,88	0,50	36,86	0,75	169,61	0,78
52,78	0,77	0,05	0,53	53,72	0,77	197,28	0,83
46,97	0,81	-2,83	0,17	32,90	0,81	252,82	0,84
43,21	0,87	-8,31	0,26	43,88	0,87		
25,70	0,29	-2,50	0,31	29,13	0,29		
24,56	0,39	0,30	0,40	26,67	0,39		
37,32	0,42	1,37	0,45	33,31	0,42		

22,42	0,50	1,58	0,54	35,28	0,50
34,46	0,55	1,33	0,61	33,06	0,55
28,14	0,60	2,59	0,75	36,84	0,60
29,04	0,78	3,24	0,77	33,80	0,78
91,99	0,83	-2,83	0,81	74,10	0,83
31,50	0,83	1,40	0,87	28,73	0,83
45,92	0,84	-2,83	0,20	48,87	0,84
		-8,22	0,29		
		-7,65	0,39		
		-0,23	0,42		
		0,60	0,50		
		1,90	0,55		
		1,98	0,60		
		2,43	0,78		
		6,56	0,83		
		2,68	0,83		
		1,27	0,84		
