



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Estudo da Quantificação de Lipídios Microalgais Através de Fluorescência 2D

Autor: Larissa Bresolin

Orientador: Jorge O. Trierweiler

Co-orientadores: Cassiano Ranzan

Luciane F. Trierweiler

Porto Alegre, julho de 2013.

Sumário

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Microalgas	3
2.1.1	Composição Química das Microalgas	3
2.1.2	Tratamento de Efluentes com Microalgas	4
2.1.3	Biodiesel a Partir das Microalgas	5
2.1.4	Scenedesmus sp.	6
2.2	Métodos de Quantificação de Lipídios	7
2.2.1	Definição de Lipídios	7
2.2.2	Métodos de Quantificação Gravimétricos	7
2.2.3	Métodos Baseados em Fluorescência	9
2.2.4	Metodologia Quimiométrica de Análises de Dados de Fluorescência	13
2.2.5	Comparação dos Métodos de Quantificação Lipídica Encontrados na Literatura	13
3	Materiais e Métodos	15
3.1	Estudo de Metodologia para Quantificação de Lipídios Microalgais	15
3.2	Cultivo de Microalgas	15
3.2.1	Meio de cultivo	15
3.2.2	Fotobiorreatores	16
3.2.3	Cultivo de Microalgas para Análise	16
3.2.4	Medidas de Biomassa	17
3.2.5	Medidas de Espectroscopia de Fluorescência	17
3.3	Análise de Dados de Espectroscopia de Fluorescência	17
3.3.1	Modelos Baseados em Componentes Espectrais (Pure Spectra Chemometric Modeling - PSCM)	17
4	Resultados e Discussão	19
4.1	Análise Qualitativa Utilizando-se a Metodologia ACO	19
4.2	Análise Quantitativa de Azeite em Acetona Utilizando EF2D	21
4.2.1	Validação da Metodologia de Análise Quantitativa	23
4.3	Cultivo das Microalgas	25
4.3.1	Análise de Fluorescência dos Cultivos de Microalgas	28
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	31
6	Referências	33

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer os meus pais, Moacir J. Bresolin e Lair T. K. Bresolin, pelo apoio incondicional que me deram durante toda a vida, pela educação e valores que me foram ensinados e pelas oportunidades que me forneceram. Se hoje estou apta a escrever este trabalho de conclusão de curso é devido ao esforço e empenho de meus pais. Tenho muito orgulho de dizer que sou filha destas duas pessoas que são modelos para mim. Também agradeço ao meu irmão, Marcelo Bresolin, que com o passar dos anos tem se tornado cada vez mais amigo e companheiro.

Gostaria de agradecer aos meus amigos, por sempre estarem do meu lado e entenderem minhas ausências e estresse por causa das provas e aulas no decorrer de todo esse período e por o tornarem muito mais agradável. A amizade de todos vocês sempre foi, é e será muito importante pra mim, seja para compartilhar bons ou maus momentos.

Ao San Diego Rugby Club por ter se tornado um meio de alívio de todo estresse gerado nesta última etapa e por ser um ambiente onde encontrei muito carinho e amizade.

Ao meu orientador, Jorge, pelas oportunidades propiciadas, não só neste trabalho, como também no meio acadêmico, o que certamente refletirá positivamente no meu futuro. Gostaria de agradecer meus co-orientadores, Luciane e Cassiano, por toda paciência, ajuda e dedicação que me foi dado e à doutoranda Nelzy, que desde o início acompanhou este trabalho e foi de grande ajuda no decorrer do mesmo.

Agradeço finalmente a todos que estiveram envolvidos na minha vida nestes últimos anos, à minha família que mesmo de longe sempre torceu por mim e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado.

Resumo

A crescente necessidade por combustíveis alternativos, frente ao crescimento constante da demanda energética, faz com que sejam necessárias pesquisas sobre novas fontes energéticas eficientes e não agressivas ao meio ambiente. Cada vez mais as microalgas tem se apresentado como uma alternativa para a produção de biodiesel, visto as vantagens que seu cultivo apresenta, como crescimento em terras não cultiváveis, biorremediação e grande acúmulo de lipídios. Em virtude disso, torna-se imprescindível a utilização de um método para quantificação de lipídios presentes em microalgas que seja rápido e confiável. Visando essa necessidade, estudou-se o desenvolvimento de uma metodologia de quantificação lipídica através de medidas de espectrofluorescência. Para a proposta e calibração de modelos, utilizaram-se soluções de azeite em acetona devido às similaridades deste com os lipídios produzidos pelas microalgas. A primeira etapa valeu-se da análise qualitativa proveniente das medidas espectrofluorométricas, utilizando-se a metodologia ACO. Após definidas essas regiões, aplicou-se então a metodologia PSCM, obtendo-se modelos de predição de concentração de azeite com diferentes estruturas e, após análise desses modelos, foi definido que modelos com mais de oito pares de fluorescência são indicados para proceder predições de concentração com erros relativos aceitáveis. Para avaliar a robustez dos modelos obtidos, realizam-se testes com outra marca de azeite comercial, apresentando resultados positivos na caracterização de duas das quatro amostras avaliadas, sendo que o resultado ineficaz foi atribuído a erros experimentais, não correlacionados aos modelos propostos. A segunda etapa deste trabalho é composta pelo cultivo das microalgas em diferentes porcentagens de vinhaça (0%, 8,1%, 20% e 31,9%), os quais apresentaram crescimento da biomassa, embora nos cultivos com 20% e 31,9% de vinhaça houve a necessidade de um tempo de cultivo maior que o esperado em virtude das condições do meio. Durante todo o cultivo foram realizadas medidas de espectrofluorescência, posteriormente avaliadas pelos modelos quimiométricos previamente ajustados. A aplicação direta desses modelos na quantificação lipídica das microalgas não apresentou resultados satisfatórios, no entanto, os resultados indicam que a metodologia apresenta viabilidade técnica e pode ser melhorada através de calibrações dos modelos quimiométricos utilizando dados reais de processo e não soluções padronizadas de laboratório, viabilizando o acompanhamento da concentração de lipídios nos fotobiorreatores através de medidas de espectroscopia fluorescente.

Palavras-Chave: microalga, lipídio, fluorescência, quimiometria.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Principais espécies de <i>Scenedesmus</i> : (a) <i>S. quadricauda</i> (b) <i>S. obliquus</i> (c) <i>S. acutus</i> (d) <i>S. dimorphus</i>	6
Figura 2.2: Estrutura química do Vermelho do Nilo.....	9
Figura 2.3: Estrutura química do corante BODIPY 505/515.	12
Figura 4.1: Espectro de fluorescência para amostra contendo azeite em acetona (0,1 mL/10 mL).	19
Figura 4.2: Concentração de feromônios obtida na caracterização de azeite de oliva em acetona utilizando a metodologia ACO aplicada a dados de espectroscopia fluorescente 2D.	20
Figura 4.3: Erro relativo percentual obtido entre a variável predita e a variável medida, na qual o tamanho refere-se ao número de entradas (variáveis independentes) de cada modelo.	21
Figura 4.4: Erro relativo percentual obtido entre a variável predita e a variável medida nos modelos que apresentam erros considerados aceitáveis.	22
Figura 4.5: Espectros de brancos (0% de azeite em acetona) utilizados na calibração do modelo e no teste de validação, respectivamente.	24
Figura 4.6: Diferença entre os espectros dos brancos utilizados na calibração do modelo e no teste de validação.	25
Figura 4.7: Curva de crescimento microalgal cultivada com 0% de vinhaça.....	25
Figura 4.8: Curva de crescimento microalgal cultivada com 8,1% de vinhaça.	26
Figura 4.9: Curva de crescimento microalgal cultivada com 20% de vinhaça.	26
Figura 4.10: Curva de crescimento microalgal cultivada com 31,9% de vinhaça.	26
Figura 4.11: Fotobiorreatores com 20% e 31,9% de vinhaça com o conteúdo de sólidos suspensos floculados.	27
Figura 4.12: Acompanhamento visual do crescimento da microalga. a) quinto dia de cultivo; b) décimo dia de cultivo; c) décimo oitavo dia de cultivo.	28
Figura 4.13: Crescimento da biomassa microalgal (coordenada da esquerda) e acompanhamento lipídico do cultivo (coordenada da direita) realizado com 8,1% de vinhaça no fotobiorreator B.	29
Figura 4.14: Média de concentração lipídica predita normalizada dos cultivos de microalgas, obtidas com dados de espectroscopia fluorescente e modelos quimiométricos ajustados com soluções de azeite de oliva em acetona.	30
Figura 4.15: Comparação de coloração da amostra antes e depois da medida de espectroscopia fluorescente. a) amostra antes da análise – tom arroxeadado; b) amostra após análise – incolor (aproximadamente dez minutos).....	30

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Teores de carboidrato e proteína em diferentes espécies de microalgas.	4
Tabela 2.2: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.	4
Tabela 2.3: Comparativo entre os métodos de quantificação de lipídios.	14
Tabela 3.1: Perfil de ácidos graxos presentes na microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> e no azeite de oliva comercial.....	16
Tabela 4.1: Pares de Excitação / Emissão referentes aos modelos selecionados.	22
Tabela 4.2: Resultados dos testes realizados para a validação da metodologia proposta.	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACO – *Ant Colony Optimization*

AG – *Ácido Graxo*

CP – *Componente Principal*

DBO – *Demanda Bioquímica de Oxigênio*

Ex/Em – *Par de comprimento de Onda de Excitação/Emissão*

EF2D – *Espectrofluorescência 2D*

PCA – *Principal Component Analysis*

PCR – *Principal Component Regression*

PLS – *Partial Least Squares*

PSCM – *Modelos Baseados em Componentes Espectrais (Pure Spectra Chemometric Modeling)*

VN – *Vermelho do Nilo*

1 Introdução

A cada ano o consumo de derivados do petróleo, como gasolina e diesel, e do álcool, proveniente da cana de açúcar, tende a subir, visto o aumento da frota de veículos e da expansão econômica que impulsiona a produtividade do setor industrial. Portanto, torna-se imprescindível a necessidade de fontes energéticas renováveis que sejam menos agressivas ao meio ambiente e que, juntamente, apresentem uma boa produtividade.

O etanol é um combustível de fonte renovável com menor impacto ambiental do que os provenientes do petróleo, mas é importante ressaltar que além de seu cultivo concorrer com o cultivo de alimentos, a produção de etanol gera grande quantidade de resíduo, conhecido como vinhaça. Para cada litro de álcool são produzidos de dez a dezoito litros de vinhaça (Da Silva, Griebeler e Borges, 2007) o que gera uma preocupação com a destinação deste subproduto.

Um combustível que se apresenta como alternativa aos combustíveis derivados do petróleo é o biodiesel, que pode ser usado em qualquer motor a diesel, proveniente de fontes renováveis como soja, girassol ou outras oleaginosas. No entanto, utilizar essas sementes para a produção de biodiesel acarreta em uma perda para o setor alimentício, uma vez que a produção não é mais destinada à alimentação e o espaço físico de plantio também fica comprometido.

Biodiesel a partir de sementes oleaginosas e bioetanol proveniente da cana-de-açúcar vem sendo produzido em quantidades crescentes como biocombustíveis de fontes renováveis, mas sua produção em grandes quantidades não é sustentável. Uma alternativa que tem ganhado destaque é a produção de biodiesel a partir das microalgas (Chisti, 2008).

As microalgas têm sido reconhecidas como uma produtora de matéria-prima para a produção de biodiesel por causa de sua elevada eficiência fotossintética, rápida taxa de crescimento e habilidade de acumular significantes quantidades de lipídios (Govender *et al.*, 2012). O uso de microalgas envolve vários aspectos vantajosos para o aproveitamento energético de sua biomassa, tais como: apresentam um curto ciclo de vida e uma alta taxa de crescimento; permitem diversas condições de cultivo, além de possibilitarem produção o ano inteiro; não há necessidade do uso de agrotóxicos; requerem uma área reduzida para o cultivo e, conseqüentemente, utilizam um reduzido volume de água potável.

As microalgas podem ser cultivadas em terras não agricultáveis, causando um menor, ou inexistente, impacto no fornecimento global de alimentos. Diferentemente de outros tipos de matérias-primas produzidas em grandes extensões de terras agricultáveis, as microalgas não competem com a produção de produtos alimentícios (Neto *et al.*, 2013). De fato, o rendimento médio de produção de biodiesel a partir de microalgas pode ser de dez a vinte vezes maior do que o rendimento obtido a partir de sementes oleaginosas e/ou óleos vegetais (Chisti, 2007). Mesmo que estas estimativas sejam demasiadamente otimistas, apontam para um grande potencial.

Quanto maior a quantidade de lipídios provenientes da produção de microalgas, maior a capacidade de produção de biodiesel, por isso, além de diversos estudos analisarem diferentes espécies de microalgas, também é de grande preocupação a quantificação desses lipídios. Esta é usualmente realizada por meios gravimétricos após

extração com solvente, o que requer um tempo considerável e grande quantidade de biomassa seca (Govender *et al.*, 2012).

Outra técnica promissora é a extração supercrítica por dióxido de carbono (SCCO₂), considerada uma tecnologia verde que possui a potencialidade de tomar o lugar do uso das tradicionais extrações de lipídios com solventes orgânicos, porém essa técnica apresenta como desvantagem o alto custo do processo associado com a infraestrutura e operação requeridas (Halim *et al.*, 2011).

Um método de detecção de lipídios de microalgas que tem se mostrado promissor e acessível é através de técnicas de marcação empregando espectrofluorescência (Govender *et al.*, 2012). Essa técnica consiste basicamente em colocar a solução de corante na amostra retirada do cultivo de microalga, onde a mistura fica em contato durante o tempo adequado para que o corante atravesse a parede celular da microalga, conseguindo assim marcar os lipídios que, então, poderão ser analisados através da fluorescência resultante desta interação corante/lipídio. Os corantes comercialmente disponíveis que possuem essa característica são o Vermelho do Nilo e o BODIPY 505/515.

A análise de dados de espectroscopia fluorescente 2D é feita através de métodos quimiométricos, como PCA (*Principal Component Analysis*), PCR (*Principal Component Regression*), PLS (*Partial Least Squares*), PSCM (*Pure Spectral Component Modeling*), entre outros, que consistem em metodologias capazes de extrair informações relacionadas às variáveis de estado, nesse caso concentração lipídica, contidas em grandes matrizes de dados (Clementschesch *et al.*, 2005).

Este trabalho tem como objetivo investigar a viabilidade de uma metodologia de quantificação dos lipídios presentes na microalga *Scenedesmus sp.*, através do método baseado na medida de fluorescência utilizando o corante Vermelho do Nilo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Microalgas

As microalgas, um dos mais antigos organismos vivos, são microrganismos unicelulares que vivem individualmente, em cadeias ou em grupos e que formam a base da cadeia alimentar nos oceanos e rios e são conhecidas como “plâncton” (Satyanarayana, Mariano e Vargas, 2011).

As microalgas são caracterizadas como microrganismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia que resultam em biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (Schmitz, Dal Magro e Colla, 2012). Além do dióxido de carbono, as microalgas precisam de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e outros nutrientes em menor quantidade, como os metais, que são essenciais para o seu metabolismo (Ramirez, 2013). Dentre todos os organismos fotossintéticos e autotróficos capazes de remover dióxido de carbono (CO₂) de correntes gasosas, as microalgas são o grupo que suportam até 50% de CO₂, bem como a presença de outros compostos como óxido nítrico (NO) e dióxido de enxofre (SO₂) (Radmann *et al.*, 2011). De acordo com Chisti (2007), 1 kg de biomassa algal seca utiliza em torno de 1,83 kg de CO₂, assim, a produção de biomassa a partir de microalgas pode ajudar na biofixação de resíduos de CO₂ no que diz respeito à melhora e manutenção da qualidade do ar (Singh e Gu, 2010).

Estudos realizados por Hu *et al.* (2008) afirmam que além de serem excepcionalmente diversificadas, as microalgas representam um grupo altamente especializado de organismos que podem adaptar-se a diferentes hábitos ecológicos.

As microalgas podem crescer de maneira autotrófica (sintetizando as substâncias essenciais para seu metabolismo a partir de substâncias inorgânicas) ou heterotrófica (alimentando-se de substâncias orgânicas sintetizadas) ou mixotrófica (se nutre a partir de substâncias inorgânicas transformando-as em substâncias orgânicas por fotossíntese e, diretamente, de substâncias orgânicas) (Ramirez, 2013).

2.1.1 Composição Química das Microalgas

Os principais componentes de uma típica microalga são as proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes, como pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos e vitaminas. Os teores de proteínas e carboidratos em várias espécies de microalgas são elevados, atingindo até 50% de seu peso seco (Singh e Gu, 2010). A Tabela 2.1 lista os teores de proteína e carboidratos de algumas espécies de microalgas.

Os carboidratos nas microalgas podem ser encontrados nas formas de amido, glicose, açúcar e outros polissacarídeos, sua digestibilidade total é elevada, e é por isso que não há limitação para a utilização de microalgas em pó em alimentos ou rações (Spolaore *et al.*, 2006).

O conteúdo lipídico das células algais pode variar entre 1% e 70%, podendo inclusive alcançar 90% em peso seco em certas condições (Metting Jr, 1996). Lipídios algais são compostos por glicerol ou bases esterificadas de ácidos graxos saturados ou insaturados. Entre todos os ácidos graxos encontrados nas microalgas, alguns das famílias ω 3 e ω 6 são de particular interesse (Spolaore *et al.*, 2006). A Tabela 2.2 apresenta o conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.

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

Espécie	Proteína [% peso seco]	Carboidrato [% peso seco]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 – 56	10 – 17
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 – 18	21 – 52
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	12 – 17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26
<i>Spirogyra sp.</i>	6 – 20	33 – 64
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4
<i>Dunaliella salina</i>	57	32
<i>Euglena gracilis</i>	39 – 61	14 – 18
<i>Prymnesium parvum</i>	28 – 45	25 – 33
<i>Tetraselmis maculate</i>	52	15
<i>Porphyridium cruentum</i>	28 – 45	40 – 57
<i>Spirulina platensis</i>	52	8 – 14
<i>Spirulina maxima</i>	28 – 39	13 – 16
<i>Synechococcus sp.</i>	46 – 63	15
<i>Anabaena cylindrical</i>	43 – 56	25 – 30

Adaptado de Singh e Gu (2010).

Tabela 2.2: Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.

Espécie	Habitat	Conteúdo lipídico [% biomassa]
<i>Chlorococcum sp.</i>	Água doce	19,3
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Água doce	18,4
<i>Scenedesmus sp.</i>	Água doce	21,1
<i>Tetraselmis sp.</i>	Marinha	14,7
<i>Ellipsoidion sp.</i>	Marinha	27,4
<i>Monodus subterraneus</i>	Água doce	16,1
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Marinha	29,2

Adaptado de Singh e Gu (2010).

Estudos realizados e analisados por Makulla (2000) afirmam que o perfil de ácidos graxos em algas é altamente variável. Primeiramente, a matriz depende do grupo sistemático do qual a alga pertence. Segundo, o perfil de ácidos graxos varia de acordo com fatores internos e externos que influem nas células algais, como temperatura, irradiância e limitação de nutrientes.

2.1.2 Tratamento de Efluentes com Microalgas

Existe um duplo potencial ao se tratar efluentes orgânicos provenientes da indústria agro-alimentícia através do cultivo de microalgas. As águas residuais, além de fornecerem um meio de cultivo, também podem fornecer nutrientes, como nitrogênio e fósforo (Singh e Gu, 2010).

Estudos realizados por Ramirez (2013) mostram que é possível utilizar a microalga *Scenedesmus sp.* no tratamento da vinhaça, resíduo da produção de etanol, uma vez que as microalgas utilizam os macronutrientes presentes neste efluente para a produção de biomassa. Foi comprovado que a *Scenedesmus sp.* consegue sobreviver em cultivos contendo até 32% de vinhaça e, além disso, é capaz de reduzir a DBO (demanda química de oxigênio), o nitrogênio e fósforo presentes no meio, sendo que a remoção destes dois últimos é praticamente total. O cultivo foi realizado em um fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro, indicando a possibilidade de um crescimento mixotrófico dessa microalga.

2.1.3 Biodiesel a Partir das Microalgas

Os lipídios produzidos pelas microalgas são geralmente lipídios neutros com um elevado grau de saturação, fazendo com que elas sejam uma fonte de matéria-prima apropriada para a produção de biodiesel (Rawat *et al.*, 2011).

A habilidade das microalgas em sobreviverem ou se proliferarem em uma grande variedade de condições ambientais reflete-se em uma enorme diversidade, bem como a capacidade de modificar o metabolismo para a produção de lipídios eficientemente em resposta a alterações das condições ambientais (Hu *et al.*, 2008).

Os lipídios que são úteis para a produção de biodiesel são a fração de todos os saponificáveis (lipídios neutros) e estão situados usualmente no citoplasma da célula na forma de gotículas de 30 nm ou menores. Em contrapartida, lipídios polares saponificáveis, como fosfolipídios, glicolipídios, etc., que são constituintes da célula e da parede da organela, juntamente com a fração de insaponificáveis, que consiste de pequenas quantidades de carotenóides, esteróis, tocoferóis e retinóides não são viáveis para a produção de biodiesel, devido ao fato das propriedades emulsificantes e efeito negativo nos tempos de *Cold Soak Filtration* (teste para a determinação das propriedades do biodiesel em clima frio) e conseqüentemente, na performance do combustível em clima frio (Ríos *et al.*, 2013).

Estudos realizados por Singh e Gu (2010) e Rawat *et al.* (2011) citam as seguintes vantagens potenciais das microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis:

- Sintetizam e acumulam grandes quantidades de lipídios neutros;
- Crescem a elevadas taxas;
- Prosperam em águas salinas, salobras e costeiras para as quais existem poucas alternativas concorrentes;
- Toleram terras marginais (ex. deserto, terras áridas e semi-áridas) que não são próprias para a agricultura convencional;
- Utilizam nutrientes para seu crescimento, como nitrogênio e fósforo, a partir de uma variedade de fontes de águas residuais (ex. escoamento agrícola, efluentes industriais e municipais), oferecendo o benefício adicional biorremediação de águas residuais;
- Sequestram dióxido de carbono emitido a partir da queima de combustíveis e outras fontes de energia, reduzindo o impacto das emissões de um dos principais gases de efeito estufa;

- Produzem valiosos co-produtos ou subprodutos (ex. biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos, alimento animal, fertilizantes e H₂);
- Crescem em vasos adequados para a cultura (fotobiorreatores) durante todo o ano, com uma produtividade de biomassa anual que supera a de plantas terrestres em cerca de dez vezes (com base na superfície);
- Não há necessidade do uso de químicos, como herbicidas ou pesticidas, reduzindo assim custos e impacto ambiental.

2.1.4 *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. é um microrganismo comum e, frequentemente, é uma microalga dominante em lagos de água doce e rios (Kim *et al.*, 2007). Existem diferentes espécies de *Scenedesmus*, sendo as mais conhecidas: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus acutus* e *Scenedesmus dimorphus* (Ramirez, 2013). A Figura 2.1 apresenta as diferentes espécies da *Scenedesmus*.

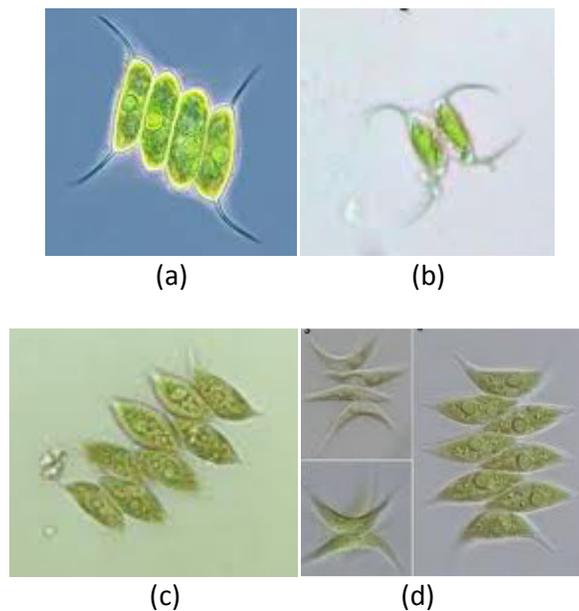


Figura 2.1: Principais espécies de *Scenedesmus*: (a) *S. quadricauda* (b) *S. obliquus* (c) *S. acutus* (d) *S. dimorphus*

O gênero *Scenedesmus* pertence ao filo *Chlorophyta*, classe *Euchlorophyceae* e ordem *Chlorococcales*. É uma alga verde, cenobial, imóvel. Suas células são elipsoidais, sendo que as das extremidades possuem dois prolongamentos, denominados espinhos, que são diferenciações da parede celular. Estas microalgas liberam odor e sabor à água, são comumente encontradas em lagoas, mas também em ambientes poluídos. (Ramos, Silva e Camara, 2007). As espécies possuem cenóbios planos, compostos de 2-4-8-16 células que se encontram de forma alinhada ou alternada, apresentando cloroplasto único, parietal e com um pirenóide. Recentemente, com base em estudos morfológicos e

genéticos, as espécies de *Scenedesmus* que apresentam espinhos, tanto nas células extremas como nas intermediárias, foram transferidas para o gênero *Desmodesmus* (Moresco e Bueno, 2007).

Estudos realizados por Takeda (1996) afirmam que na *Scenedesmus* os principais açúcares que compõem sua parede celular rígida são glicose, manose e galactose, sem a presença de glucosamina e, também, que as características da parede celular são uniformes. Conjuntamente, afirmam que anisotropia foi observada nas paredes celulares de todas as espécies do gênero. Chen, Sommerfeld e Hu (2011) afirmam que a *Scenedesmus sp.* faz parte do grupo de algas verdes que possuem parede celular rígida e espessa.

A *Scenedesmus* suporta uma vasta gama de temperaturas para o seu crescimento (10 - 30 °C), sendo que a temperatura ótima para produção de biomassa e lipídio é de 20°C (Xin, Hong-Ying e Yu-Ping, 2011), isso faz com que essa espécie seja atrativa para cultivos ao ar livre sob condições naturais de temperaturas variadas. Também apresenta propensão de precipitação, o que pode ser benéfico para colheita de grandes quantidades de células em sistemas de culturas de microalgas, como as grandes lagoas abertas (Chen *et al.*, 2012).

2.2 Métodos de Quantificação de Lipídios

2.2.1 Definição de Lipídios

Os lipídios definem um conjunto de substâncias químicas que são caracterizadas pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos (como éster, hexano, clorofórmio, etc.) e insolubilidade em água. Encontram-se distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura (Jorge, 2009). Este grupo de substâncias inclui lipídios neutros como triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, e lipídios polares, como os fosfolipídios, entre outros (Ríos *et al.*, 2013).

2.2.2 Métodos de Quantificação Gravimétricos

A extração de óleo com solvente é um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) para um solvente com o qual a matriz faz contato. Os processos que ocorrem são meramente físicos, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química (Brum, Arruda e Regitano-D'Arce, 2009).

Os métodos mais comuns de extração de lipídios totais são descritos por: Soxhlet (1879), Folch *et al.* (1957) e Bligh e Dyer (1959), sendo que estes dois últimos utilizam os solventes clorofórmio e metanol; no entanto os volumes de solventes utilizados no método de Folch *et al.* são muito elevados em relação aos utilizados no Bligh e Dyer. A principal vantagem do método de Bligh e Dyer é a redução da fração de solvente/amostra (uma parte de amostra para três partes de 1:2 clorofórmio/metanol seguido por uma ou duas partes de clorofórmio). Em contrapartida, o método de Folch emprega uma razão de uma parte de amostra para vinte partes de 2:1 clorofórmio/metanol, seguido por várias lavagens do extrato bruto (Iverson, Lang e Cooper, 2001).

Os solventes usados para extração de lipídios devem solubilizar todos os compostos lipídicos e serem suficientemente polares para promoverem as dissociações das

membranas celulares ou com lipoproteínas sem que ocorra reação química (Tonial *et al.*, 2009). Uma vantagem apresentada pelos métodos baseados na mistura binária clorofórmio e metanol é a capacidade de extraírem tanto os lipídios neutros como os lipídios polares eficientemente (Brum, Arruda e Regitano-D'Arce, 2009).

A extração pelo método de Soxhlet envolve essencialmente a percolação de um solvente através da amostra de biomassa, que se encontra seca e moída em pequenas partículas. Após a percolação, o solvente é retirado do balão e evaporado. Os vapores são resfriados em um condensador situado acima da amostra e o solvente condensado é escorrido pela biomassa, de onde se extrai o óleo. Depois de vários ciclos de extração, o solvente contendo o óleo extraído é evaporado para a recuperação da fração lipídica (Ranjan, Patil e Moholkar, 2010). Neste processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra, em temperatura próxima à do ambiente; mas o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento (Melecchi, 2005). Os procedimentos clássicos idealizados por Soxhlet, com refluxo de solvente por muitas horas, devem ser evitados, já que favorecem as reações de peroxidação e de hidrólise (Brum, Arruda e Regitano-D'Arce, 2009).

Folch *et al.* desenvolveram um método usando uma mistura de clorofórmio e metanol, seguida pela adição de solução de cloreto de potássio, visando uma melhor separação das fases (Brum, Arruda e Regitano-D'Arce, 2009). Uma alternativa apresentada nos estudos realizados por Araujo *et al.* (2013) é a utilização do cloreto de metileno como um substituto adequado para o clorofórmio, uma vez que o clorofórmio apresenta características carcinogênicas.

O método Bligh e Dyer, considerado uma versão simplificada do procedimento proposto por Folch *et al.*, é caracterizado por ser feito à frio, utilizando-se uma mistura de clorofórmio, metanol e água. A amostra é triturada juntamente com metanol e clorofórmio deixando formar apenas uma fase. A seguir, mais clorofórmio é adicionado, juntamente com a água, estabelecendo-se assim duas fases. Os lipídios ficam retidos na fase do clorofórmio, que pode ser removido por evaporação por ser o mais volátil.

A etapa chave na extração e recuperação de lipídios a partir de microalgas é rompimento da membrana celular. A utilização de ultrassom aumenta a eficiência da extração, uma vez que é parcialmente responsável pela desagregação celular. No entanto, a seleção de solventes adequados ainda é essencial para o processo de extração, porque podem enfraquecer a estrutura da parede celular e facilitar o rompimento da mesma, e, por conseguinte, a extração de lipídios (Araujo *et al.*, 2013). Estudos realizados por Ranjan, Patil e Moholkar (2010) afirmam que a quantidade de lipídios extraídos da microalga estudada, *Scenedesmus sp.*, utilizando o método Bligh e Dyer associado com ultrassom é maior do que a quantidade obtida utilizando-se o método de Soxhlet.

As maiores desvantagens dos métodos gravimétricos convencionais (clássicos) são o seu tempo e mão-de-obra envolvidos (sendo dispendioso analisar um grande número de amostras) e a grande quantidade de solvente utilizado no processo (Chen *et al.*, 2009). Erros notáveis são encontrados nos métodos gravimétricos e uma das razões mais plausíveis se dá pelo fato de que estes métodos envolvem várias etapas complicadas, como a extração lipídica, separação e concentração, o que pode resultar na perda de conteúdo.

Os lipídios contidos nas microalgas são mais difíceis de serem extraídos pelos métodos de extração com solventes. O procedimento de extração deve assegurar não só completa extração como também evitar qualquer decomposição de constituintes naturais que podem levar à formação de outros compostos. Um método simples e sensível para a medição da quantidade total de lipídios em algas é desejável porque os métodos gravimétricos tradicionais requerem um tempo considerável de manipulação e a biomassa disponível para a análise é geralmente pequena (Lee, Yoon e Oh, 1998).

Mesmo que o processo de separação de lipídios microalgais para a produção de biodiesel seja inviável, outros processos, como a pirólise rápida, necessitam de um método de quantificação lipídica rápido e confiável. A pirólise rápida envolve essencialmente a queima de biomassa, podendo ser biomassa microalgal, para a produção de bio óleo, sendo que a qualidade do bio óleo depende fortemente da quantidade de lipídios contidos na biomassa (Du *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2013).

2.2.3 Métodos Baseados em Fluorescência

A fluorescência ocorre quando um elétron, após ser excitado a um nível molecular superior pela absorção de energia radiante, retorna rapidamente ao seu estado fundamental com a emissão de um fóton. A espectroscopia de fluorescência, também chamada espectrofluorometria ou simplesmente fluorometria, é um tipo de espectroscopia eletromagnética a qual analisa a fluorescência de uma amostra (Lakowicz, 2006).

Em vários estudos, há relatos em que se utilizam corantes com propriedades fluorescentes que marquem, geralmente tingindo, os compostos de interesse, para então ser efetuada a medida de fluorescência para análise do composto (Genicot *et al.*, 2005; Evans, Ratledge e Gilbert, 1985; Mcginnis, Dempster e Sommerfeld, 1997; Kamisaka *et al.*, 1999; Izard e Limberger, 2003; Kimura, Yamaoka e Kamisaka, 2004; Eltgroth, Watwood e Wolfe, 2005; Elsey *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009).

Vermelho do Nilo

O Vermelho do Nilo (9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazin-5-ona) é um corante benzofenoxazona, sendo referido na literatura e história antiga da química como Azul do Nilo A-oxazona, pois é derivado do corante Azul do Nilo. O VN é pouco solúvel em água, mas é solúvel em vários solventes orgânicos, sendo intensamente fluorescente em todos eles (Greenspan, Mayer e Fowler, 1985). A Figura 2.2 apresenta a estrutura química do corante.

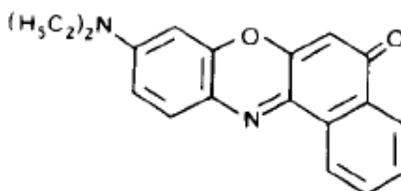


Figura 2.2: Estrutura química do Vermelho do Nilo.

Greenspan, Mayer e Fowler (1985) estudaram a fluorescência do corante VN em diferentes solventes orgânicos, concluindo que as cores de fluorescência variam de um amarelo dourado para um vermelho profundo. Medidos em suas máximas fluorescências, as intensidades de fluorescências relativas do corante foram aproximadamente iguais para todos os solventes testados. Em contraste, a fluorescência é reduzida na água.

O VN é um corante ideal para a detecção de lipídios, uma vez que exhibe alta afinidade, especificidade e sensibilidade em relação ao grau de hidrofobicidade dos lipídios, sendo caracterizado como um corante lipo-solúvel (Diaz *et al.*, 2008). Pode ser aplicado em células contidas em solvente aquoso e irá se dissolver preferencialmente em lipídios. Além disso, possui outras duas propriedades úteis: como sua fluorescência é reduzida em ambiente aquoso, são vistas somente as substâncias que se tem a pretensão de tingir e a sua cor fluorescente muda na presença de lipídios altamente hidrofóbicos (Greenspan, Mayer e Fowler, 1985). No entanto, para medições absolutas do conteúdo lipídico, ocorre a necessidade de desenvolver uma curva de calibração que correlacione fluorescência e conteúdo lipídico, podendo ser determinada por gravimetria, ou por utilização de padrões de lipídios (Elsey *et al.*, 2007).

O VN tem sido frequentemente empregado para avaliar o conteúdo lipídico de células animais e microrganismos, como células de mamíferos (Genicot *et al.*, 2005), bactérias (Izard e Limberger, 2003), leveduras (Evans, Ratledge e Gilbert, 1985; Kimura, Yamaoka e Kamisaka, 2004), zooplâncton (Kamisaka *et al.*, 1999) e microalgas (Mcginnis, Dempster e Sommerfeld, 1997; Eltgroth, Watwood e Wolfe, 2005; Elsey *et al.*, 2007).

Por mais de vinte anos o VN tem sido extensivamente utilizado para medidas fluorométricas de lipídios neutros contidos em células algais. O corante sofre um deslocamento solvatocrômico (mudança na posição de uma banda de absorção UV-Visível em função de mudanças na polaridade do meio) na emissão da fluorescência, emitindo fluorescência na faixa do amarelo após entrar em corpos lipídicos algais e sendo solvatado pelo lipídio apolar presente nessas organelas (Cooper *et al.*, 2010). Os comprimentos de onda de emissão para lipídios polares e neutros utilizando o método do VN são 610 e 580, respectivamente (Alonzo e Mayzaud, 1999).

Membranas citoplasmáticas, que são compostas majoritariamente por fosfolipídios (lipídios polares), são geralmente tingidas em vermelho, enquanto as gotículas de lipídio, compostas por colesteróis esterificados e triglicerídeos (lipídios neutros) são tingidas em amarelo (Diaz *et al.*, 2008).

O método do VN é muito simples e rápido quando comparado com o método gravimétrico que é tradicionalmente usado para determinação de lipídios em microalgas (Lee, Yoon e Oh, 1998). O VN permeia todas as estruturas dentro da célula, mas a fluorescência amarelo-dourada somente se manifesta quando o corante penetra nos glóbulos lipídicos intracelulares (Doan e Obbard, 2011). Cooksey *et al.* (1987) demonstra em seu trabalho uma correlação linear entre a fluorescência do VN e o conteúdo total lipídico das microalgas, afirmando que um aumento do conteúdo lipídico no decorrer do crescimento das células algais é devido principalmente aos lipídios neutros ao invés dos glicos ou fosfolipídios.

Doan e Obbard (2011) testaram o método convencional do VN para avaliar o conteúdo lipídico da microalga *Nannochloropsis sp.*. No entanto, o método mostrou-se ineficiente devido as propriedades desta microalga, como baixa permeabilidade celular e

pequeno tamanho das gotículas de lipídios intracelulares. Em virtude disso, propuseram uma modificação do método, testando o tingimento dos lipídios na presença de glicerol e dimetil sulfóxido (DMSO), concluindo que tanto o glicerol como o DMSO atuam como facilitadores no tingimento dos lipídios neutros intracelulares da microalga.

Para testar a hipótese de que o VN não funcionava muito bem em algas verdes que comumente possuem parede celular rígida e espessa, Chen *et al.* (2009) realizaram testes químicos e físicos na microalga *Chlorella vulgaris*, a fim de verificar melhoria na penetração do corante nesse tipo de microalga. A utilização de DMSO em concentração de 25% na solução de tingimento mostrou ser a modificação mais eficiente. Paredes celulares rígidas e espessas podem impedir a penetração do corante através da parede celular e a membrana citoplasmática e, conseqüentemente, a ligação com os lipídios neutros intracelulares para fornecer a fluorescência desejada.

Os resultados da pesquisa de Chen *et al.* (2009) comprovaram que as amostras que foram tratadas com o método modificado apresentam um grande aumento da intensidade de fluorescência quando comparado ao método convencional, indicando a grande eficiência da modificação ao se trabalhar com algas verdes.

Após publicar o método modificado do VN, Chen, Sommerfeld e Hu (2011) realizaram experimentos adicionais que indicaram que o método modificado ainda era pouco efetivo no tingimento de outras espécies de algas verdes com parede celular rígida, como *Pseudochlorococcum sp.* e *Scenedesmus dimorphus*. Desta forma, um tingimento assistido por micro-ondas foi desenvolvido pelos autores para a obtenção de um método quantitativo confiável para a quantificação de lipídios neutros intracelulares nas espécies selecionadas.

A maior desvantagem da utilização do corante VN é que a exatidão e precisão de coloração diferem dependendo da espécie de alga e os resultados são afetados pela absorção desigual do corante devido à polaridade do solvente utilizado para dissolver o corante (Chen *et al.*, 2009). O corante é incapaz de penetrar de forma eficiente nas paredes das células de microalgas verdes, que possuem paredes celulares rígidas e espessas. Assim, a coloração com o VN requer pré-tratamentos como moagem, micro-ondas e/ou solventes para auxiliar a penetração do corante através da membrana celular e diminuir a hidrofobicidade (Govender *et al.*, 2012).

Outra limitação do VN se dá ao fato que perde rapidamente sua capacidade de fluorescência quando exposto à luz. Govender *et al.* (2012) mostram que após 10 minutos de irradiação, as células de *Dunaliella primolecta* tingidas com o VN e observadas no microscópio começaram a perder coloração. Embora esse corante possa marcar a maioria dos lipídios, sua capacidade fluorescente depende da polaridade e da hidrofobicidade do meio em que está inserido, da saturação, localização e tamanho dos lipídios.

BODIPY

BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) é um fluóforo neutro altamente lipofílico usado para tingir uma grande quantidade de lipídios, como ácidos graxos, fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e ceramidas (Govender *et al.*, 2012). A Figura 2.3 mostra a estrutura química do corante.

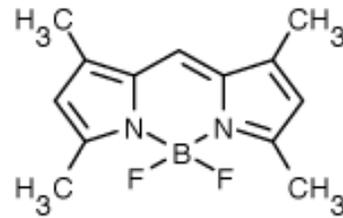


Figura 2.3: Estrutura química do corante BODIPY 505/515.

O BODIPY 505/515 tem sido usado como um corante *in vivo* para monitorar a quantidade de óleo em células algais. O corante tem a capacidade de tingir corpos lipídicos em organismos unicelulares fotossintéticos, permitindo o estabelecimento de culturas de microalgas ricas em lipídios (Xu *et al.*, 2013).

Quando o BODIPY 505/515 é adicionado a culturas de microalgas vivas, o corante tinge os lipídios em minutos, se acumulando nos compartimentos lipídios intracelulares por um mecanismo de difusão-armadilha (Akimoto e Mimuro, 2007). O corante apresenta um elevado coeficiente de partição óleo/água, o que permite facilmente atravessar as membranas e organelas celulares. Quando vistos através de microscopia de epifluorescência de campo amplo ou microscopia confocal, os corpos lipídicos de células de algas vivas corados com BODIPY 505/515 são distintamente marcados e podem ser vistos claramente. Cooper *et al.* (2010) visualizaram gotículas de lipídios contidas nas células microalgais utilizando o BODIPY 505/515 e constataram que o fluoróforo permeia todas as estruturas da célula e sua característica de emissão verde de fluorescência ocorre quando o corante está em ambientes polares e apolares, principalmente tingindo gotículas lipídicas neutras. Notavelmente, o espectro verde de emissão do BODIPY 505/515 é espectralmente separado da autofluorescência dos cloroplastos algais.

Além disso, os mesmos autores afirmam que as células permanecem viáveis após o tingimento com BODIPY 505/515 *in vivo* e podem, com sucesso, servir para repicagem e produção de novos cultivos após terem sido analisadas. Essa seleção/cultura pode ser repetida quantas vezes forem desejadas.

O BODIPY 505/515 tem espectro de emissão mais estreito do que o VN, o que faz com que este corante seja ideal para aplicações técnicas, tais como a microscopia confocal, onde o realce de contraste de fluorescência de corpos lipídicos é crítica (Cooper *et al.*, 2010). Além disso, é mais foto-estável em comparação ao VN (Xu *et al.*, 2013).

Resultados encontrados por Govender *et al.* (2012) mostram que o BODIPY 505/515 tem maior especificidade para corpos de lipídios intracelulares, sem mostrar fluorescência citoplasmática e nuclear. Também mostram que a captação fluorescente do corante não é afetada pela estrutura da parede celular e composição da mesma, uma vez que todas as culturas estudadas apresentam brilhantes corpos lipídicos verdes.

2.2.4 Metodologia Quimiométrica de Análises de Dados de Fluorescência

Para a análise quantitativa de dados extraídos de espectros de fluorescência os métodos mais aplicados na quimiometria são os de PCA (*Principal Component Analysis*), PCR (*Principal Component Regression*) e PLS (*Partial Least Squares*). Essas ferramentas possibilitam a análise de todo o espectro, pois possuem a capacidade de resumir grandes quantidades de informações e sintetizar resultados (Jolliffe, 1986).

PCA é uma ferramenta de redução de dimensionalidade utilizada para a análise de dados, a qual identifica e reescreve as informações contidas nos espectros de maneira a destacar diferenças e semelhanças, baseadas na variância das matrizes. Recorrentemente essa análise é usada em sistemas os quais o número de variáveis de entrada é elevado (Tartakovsky, Lishman e Legge, 1996). Basicamente é um procedimento que utiliza uma transformação ortogonal para converter um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas em um conjunto de variáveis linearmente independentes, chamados componentes principais (CP's).

A metodologia PCR não é aplicada diretamente aos dados de espectroscopia, mas sim nos componentes principais obtidos através da análise PCA. Os CP's são combinados de maneira a prever a matriz de dados de saída, através de regressão linear multivariável (Liu *et al.*, 2003).

A metodologia PLS pode ser vista como um melhoramento do método de PCA. Neste caso, além do uso da matriz de variáveis auxiliares (dados espectrais), o PLS faz uso também da matriz de variáveis a serem modeladas no procedimento (variáveis de interesse) para obtenção das chamadas variáveis latentes, que serão utilizadas no processo de regressão multilinear (Wold, Sjöström e Eriksson, 2001).

2.2.5 Comparação dos Métodos de Quantificação Lipídica Encontrados na Literatura

A Tabela 2.3 apresenta uma comparação entre os métodos encontrados na literatura para a quantificação de lipídios intracelulares.

O custo refere-se aos equipamentos, solventes e corantes envolvidos na metodologia. A qualidade refere-se à reprodutibilidade e acuracidade. Já o tempo envolve o tempo de análise mais o tempo necessário de pré-tratamento da amostra. Necessidade de pré-tratamento diz respeito à necessidade da amostra ser preparada e/ou tratada antes da metodologia em si ser aplicada. Erro do método refere-se aos erros associados a perdas durante o procedimento, reações indesejáveis ou a necessidade de curvas de calibração que podem resultar em imprecisões. E, por fim, a avaliação da disponibilidade foi analisada em relação ao laboratório LACIP (equipamentos, solventes, corantes) onde serão realizados os experimentos.

Tabela 2.3: Comparativo entre os métodos de quantificação de lipídios.

	Soxhlet	Folch	Bligh e Dyer	Vermelho do Nilo	BODIPY 505/515
Custo	bom	bom	bom	ruim	péssimo
Qualidade	ruim	regular	regular	bom	bom
Tempo	regular	regular	regular	bom	bom
Toxicidade Solventes	ruim	ruim	ruim	bom	bom
Necessidade de Pré-tratamento	ruim	ruim	ruim	regular	bom
Publicações na Área	muito bom	muito bom	muito bom	muito bom	bom
Biomassa Requerida	ruim	ruim	ruim	muito bom	muito bom
Erro do Método	ruim	regular	regular	bom	bom
Disponibilidade	muito bom	muito bom	muito bom	muito bom	ruim

3 Materiais e Métodos

3.1 Estudo de Metodologia para Quantificação de Lipídios Microalgais

A metodologia de análise empregada neste trabalho baseia-se na comparação entre variações da matriz espectral em função de variações na variável de interesse (concentração de lipídio). Desta forma, ocorre a necessidade de amostras previamente caracterizadas para a calibração do método analítico proposto para, então, posteriormente caracterizar as amostras de interesse.

Como a caracterização de lipídios em microalgas é uma atividade complexa, foi avaliada a desenvolvimento do método analítico baseado em espectroscopia fluorescente através da utilização de soluções de lipídios similares aos presentes nas microalgas, que foram submetidos a procedimentos similares aos propostos para as amostras de microalgas.

Baseado na Tabela 3.1, o azeite de oliva foi escolhido como sendo um possível representante dos lipídios produzidos pelas microalgas em virtude de sua fácil obtenção e perfil de ácidos graxos próximo ao perfil de ácidos graxos da microalga *Scenedesmus sp.* (os principais ácidos graxos presentes na microalga são também os principais do azeite de oliva). A calibração do método analítico é baseada na caracterização de soluções de azeite em acetona. A acetona foi escolhida como solvente devido ao azeite ser solúvel nesta, além da mesma estar presente na solução do corante Vermelho do Nilo, não adicionando um novo composto à matriz de elementos da solução.

Para a avaliação do método analítico de quantificação de lipídios foram feitas soluções com diferentes concentrações de azeite de oliva, marca Oikos (Grécia), em acetona (0%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em volume). Para a solução de análise foram utilizadas alíquotas de 50 µL das soluções padrão de azeite, 150 µL da solução de Vermelho no Nilo (10 µg/mL em acetona) e 2,8 mL de acetona, totalizando 3 mL. A concentração final de Vermelho do Nilo foi de 0,5 µg/mL, conforme recomendado por Chen *et al.* (2009).

As soluções obtidas foram analisadas em espectrofluorômetro (FluoroMax-4, Horiba), no qual foram realizadas varreduras nas amostras, variando excitação de 220 nm a 600 nm e emissão de 240 nm até 850 nm com um incremento de 10 nm, obtendo-se suas respectivas intensidades de emissão.

3.2 Cultivo de Microalgas

3.2.1 Meio de cultivo

O meio Guillard Modificado foi usado para o crescimento de cultivo puro da *Scenedesmus sp.* Embora o meio Guillard tenha vitaminas na composição original, elas não foram adicionadas no meio modificado. Esta modificação no meio foi realizada, pois experimentos anteriores mostraram que a adição de vitaminas causa inibição no crescimento das microalgas. Maiores informações da preparação e composição do meio Guillard Modificado são encontradas no trabalho de Ramirez (2013).

3.2.2 Fotobiorreatores

Os reatores usados neste experimento são do tipo fotobiorreatores *air-lift*, feitos de acrílico com dimensões de 35 cm de altura, 17 cm de largura e 6 cm de profundidade com placa central de 27cm x 17 cm. O volume de cultivo é de aproximadamente 3 litros.

A planta usada para realizar os experimentos tem capacidade para a instalação de doze fotobiorreatores e permite o controle de vazão de CO₂, intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo (descrições mais detalhadas da planta de fotobiorreatores podem ser obtidas no trabalho de Gris (2011)). O controle da taxa de aeração dos reatores é feito com o uso de rotômetros específicos para ar. O ar é inserido nos reatores através de dispersores do tipo pedras porosas situados na parte inferior de cada reator.

Tabela 3.1: Perfil de ácidos graxos presentes na microalga *Scenedesmus obliquus* e no azeite de oliva comercial

Ácido Graxo [% Σ AG]	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Azeite de Oliva
Mirístico	3,64	-
Palmítico	38,78	12,36
Palmitoléico	0,22	1,33
Esteárico	1,84	1,92
Oléico e Elaídico	28,6	70,67
Linoléico Conjugado	5,14	-
Linoléico	0,31	0,76
α-linolênico	13,21	0,29
Araquídico	0,22	0,29
Eicosapentaenóico	0,19	-
Behênico	0,71	-
Erúico	0,29	-
Lignoserico	-	0,85
Cervônico	-	7,17
Nervônico	-	0,99
18:1ω7	1,36	-
18:3ω6	0,18	-
18:4ω3	2,91	-
20:1ω9	1,25	-
20:2ω6	1,15	-

Adaptado de Makulla (2000) e Cardoso *et al.* (2010).

3.2.3 Cultivo de Microalgas para Análise

Os cultivos da microalga *Scenedesmus sp.* realizados para as análises foram feitos em duplicata em quatro diferentes condições, cultivo com 0% de vinhaça, 8,1% de vinhaça, 20% de vinhaça e 31,9% de vinhaça. Maiores detalhes sobre a metodologia de cultivo e composição da podem ser encontrados no trabalho de Ramirez (2013).

A escolha por realizar os cultivos com diferentes porcentagens de vinhaça foi baseada no trabalho de Ramirez (2013), no qual foi discutida a hipótese de que o resíduo atua como um fator estressante no cultivo das microalgas. Isso ocorre em virtude do aumento

da turbidez do meio, de forma que menos luz penetra no fotobiorreator, o que pode fazer com que a microalga acumule maiores quantidades de lipídios, como afirmado por Hu *et al.* (2008).

3.2.4 Medidas de Biomassa

Para o acompanhamento da biomassa produzida foram realizadas leituras diárias de absorbância dos fotobiorreatores no comprimento de onda de 570 nm. A curva de calibração utilizada para a conversão dos valores de absorbância para concentração de biomassa foi definida no trabalho de Ramirez (2013). As leituras de absorbância foram realizadas em Espectrofotômetro (UV-1600 Pró- Análise).

3.2.5 Medidas de Espectroscopia de Fluorescência

As leituras de fluorescência foram realizadas em espectrofluorômetro FluoroMax-4, Horiba. As amostras para análise foram preparadas conforme Chen, Sommerfeld e Hu (2011), no qual 10 μL de cultivo de algas são adicionado à 50 μL de DMSO (dimetil sulfóxido) e então colocados em um micro-ondas por 50 segundos em potência alta (1250 W). Após, são adicionados 0,935 mL de água destilada e 10 μL de solução de Vermelho do Nilo (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em acetona), sendo novamente colocadas no micro-ondas por mais 60 segundos. A faixa de varredura foi comprimento de onda de excitação entre 220 e 600 nm e emissão entre 240 nm e 850 nm (com incremento de 10 nm).

3.3 Análise de Dados de Espectroscopia de Fluorescência

Para a extração de informações úteis dos dados espectrais, fez-se o uso da metodologia PSCM (*Pure Spectra Chemometric Modeling*), associada à ferramenta de otimização heurística “*Ant Colony Optimization*”- ACO. Esta metodologia permite a obtenção de modelos que utilizam diretamente a intensidade de determinados pares de fluorescência (variáveis independentes) para a predição de estados do sistema (variáveis dependentes). Rotinas e procedimentos de cálculos foram realizados no software MATLAB (Ver. 5.3.0.10183 R11, The Mathworks, Inc., Natick, USA).

Devido à pouca quantidade de dados amostrais, optou-se pela utilização da metodologia de “*Cross Validation*” para teste e comparação de resultados. Nesta metodologia, parte-se de um conjunto de n amostras gerando-se n pares de conjuntos de calibração e validação. Sequencialmente cada amostra é retirada do conjunto de calibração para servir como amostra de teste. Esta técnica é capaz de extrair o máximo de informações dos dados e é indicada para situações onde o número de variáveis de entrada é significativamente superior ao número de amostras disponíveis, como é o caso apresentado neste trabalho (Li, Morris e Martin, 2002).

3.3.1 Modelos Baseados em Componentes Espectrais (*Pure Spectra Chemometric Modeling - PSCM*)

Este método de análise baseia-se na modelagem de variáveis de processo utilizando modelos multilíneares e elementos espectrais (excitação / emissão). A análise visa selecionar os componentes do espectro que apresentam maior correlação com as variáveis de estado, descartando ruídos e erros adicionados pelas regiões espectrais que não são relacionadas às variáveis de interesse (Skoog, Holler e Crouch, 2007). Neste trabalho, a seleção de grupos espectrais independentes é feita usando *Ant Colony Optimization* (ACO).

ACO é uma metodologia de otimização para problemas discretos. A ferramenta de otimização é baseada no comportamento de formigas reais, mais especificamente pela comunicação indireta entre elas dentro da colônia, usando a secreção de feromônios. A principal ideia da implementação da metodologia ACO é que nas formigas a convergência da trilha deixada pelas formigas no menor caminho entre a fonte de alimento e o ninho é um resultado do acúmulo de feromônio nas trilhas mais utilizadas (Mullen *et al.*, 2009).

A trilha de feromônios trata-se de um vetor utilizado internamente pela metodologia ACO como indicativo da qualidade de cada uma das variáveis de busca para resolução do problema de otimização. Na inicialização do algoritmo, este vetor é inicializado com o mesmo valor para cada variável de busca e o valor de cada uma é então atualizado inversamente proporcional ao erro da função objetivo e também multiplicado por um fator redutor. Este fator redutor simula a taxa de evaporação de feromônio real. No algoritmo implementado, a taxa de evaporação utilizada é igual a 0,5, indicando que a cada iteração cada componente do vetor trilha de feromônios tem seu valor reduzido em 50%.

Maiores informações sobre a metodologia PSCM são encontradas em Allegrini e Olivieri (2011).

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise Qualitativa Utilizando-se a Metodologia ACO

As medidas de espectrofluorescência são apresentadas na forma de tabelas, onde cada linha está correlacionada com um único comprimento de onda de excitação, e cada coluna está relacionada a um comprimento de onda de emissão. Esta matriz de dados pode ser apresentada graficamente na forma de gráficos 3D, conforme mostra a Figura 4.1.

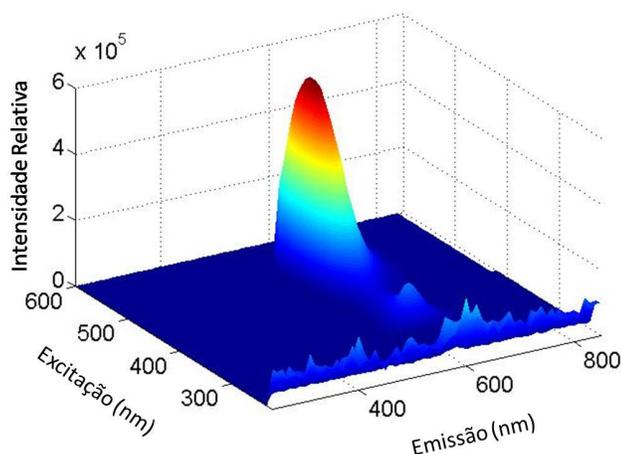


Figura 4.1: Espectro de fluorescência para amostra contendo azeite em acetona (0,1 mL/10 mL).

Utilizando-se primeiramente a metodologia ACO, obtiveram-se os gráficos apresentados na Figura 4.2, que mostram qualitativamente as regiões significativas do plano espectral de fluorescência 2D.

A aplicação da metodologia PSCM, associada à utilização do algoritmo ACO para a resolução do problema de otimização e seleção de variáveis de entrada dos modelos quimiométricos, permite a obtenção do que é chamada de assinatura espectroscópica da variável de estado analisada, dentro do meio onde são feitas as medidas de espectroscopia.

Esta análise qualitativa permite definir quais regiões espectrais apresentam maior correlação com a variável de estado, determinando assim, as regiões que carregam a informação referente à variável de interesse, ignorando possíveis informações irrelevantes e/ou ruídos presentes nos dados espectrais.

A informação referente à assinatura espectroscópica das variáveis de estado está contida na variável “Trilha de Feromônios”. Esta variável auxiliar do método ACO possui a função de indicar ao método o quão significativo cada elemento espectral é na predição da variável de estado avaliada, auxiliando o método na convergência ao ótimo almejado.

Estudos anteriores mostraram que o perfil da trilha de feromônios se mantém constante a partir de um certo número de avaliações da função objetivo; entretanto, este

perfil tende a variar quando comparado a diferentes estruturas de modelo (para a mesma variável e mesmo conjunto de dados espectrais). Esta variação entre a forma das trilhas de feromônio se caracteriza por salientar novas regiões, ou então regiões já indicadas para outras estruturas de modelos avaliadas.

A Figura 4.2 apresenta as trilhas de feromônios obtidas na avaliação da concentração de azeite em solução de acetona, caracterizado por espectroscopia fluorescente 2D e utilizando o corante Vermelho do Nilo. Nesta Figura, são apresentadas as trilhas de feromônio obtidas com modelos multilíneares polinomiais, sem avaliação de parâmetros de interação entre os pares. Nesta busca foram avaliados modelos de cinco estruturas diferentes, desde modelos com apenas uma variável de entrada (modelos com um par de fluorescência) até modelos com cinco variáveis de entrada distintas (modelos com cinco pares de fluorescência).

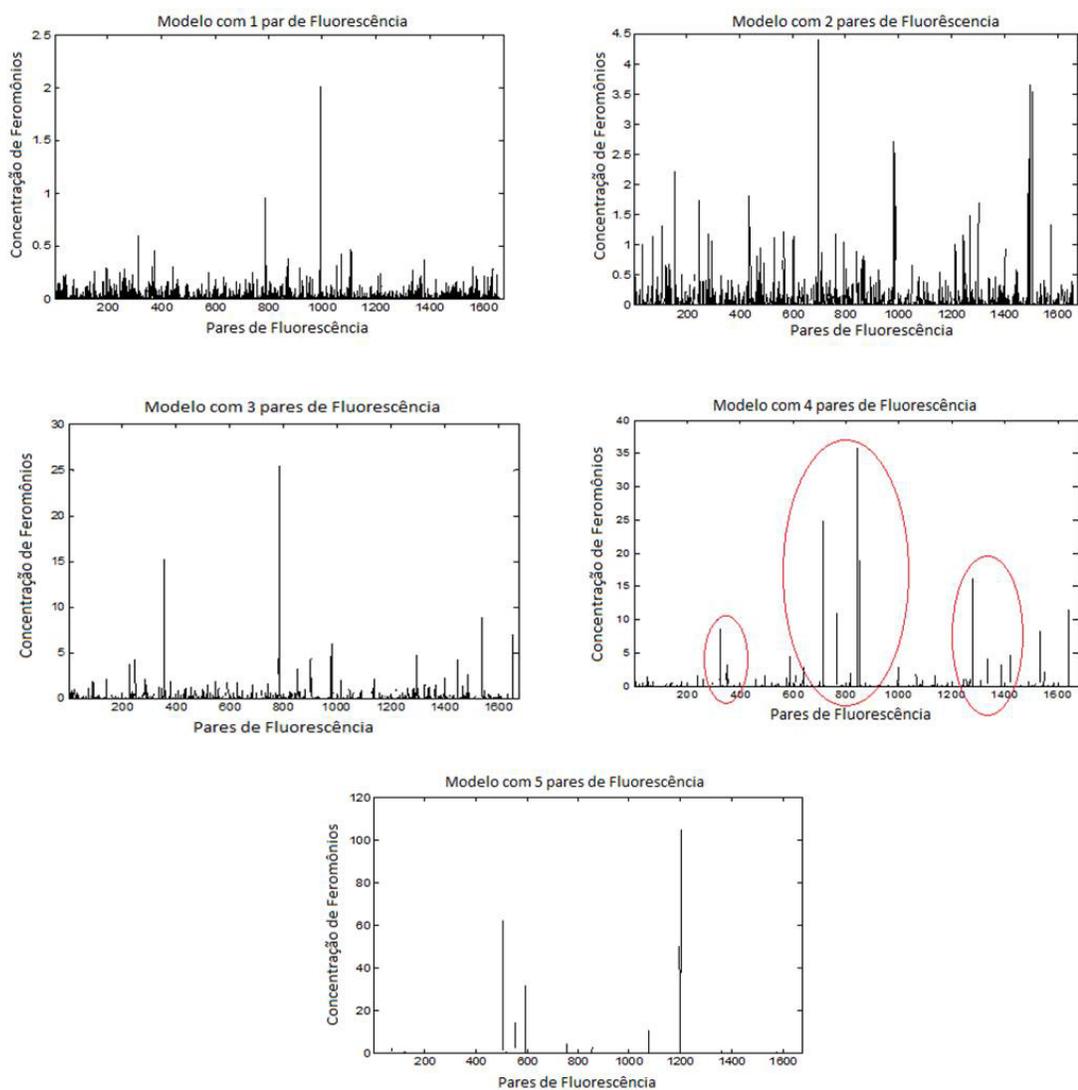


Figura 4.2: Concentração de feromônios obtida na caracterização de azeite de oliva em acetona utilizando a metodologia ACO aplicada a dados de espectroscopia fluorescente 2D.

Como pode ser observado, os modelos gerados com um e dois pares de fluorescência não apresentam uma segmentação eficiente na distinção de regiões importantes para a referida variável de estado, salientando componentes espectrais isoladamente. Já os modelos gerados com três, quatro e cinco pares apresentam regiões específicas definidas, apresentando um melhor indicativo da assinatura espectral da referida variável. No modelo com quatro pares é apresentada uma possível seleção de regiões significativas, por salientar de forma mais evidente regiões específicas do espectro.

4.2 Análise Quantitativa de Azeite em Acetona Utilizando EF2D

A análise PSCM foi realizada em um conjunto de dados composto por quatorze amostras, no qual estas foram analisadas considerando-se apenas a intensidade de fluorescência relativa, ou seja, o espectro de fluorescência da amostra de branco (concentração nula de azeite) foi reduzido das demais amostras.

Na Figura 4.3 são apresentados os erros percentuais obtidos entre os valores medidos e preditos das amostras de azeite (variável dependente) e modelos de diferentes números de variáveis de entrada (desde um até doze pares de fluorescência, em modelos multilíneares). Os erros são apresentados em função das amostras preditas. Estes resultados permitem que seja selecionada a estrutura de modelo que apresenta a melhor relação robustez versus tamanho de modelo (número de variáveis independentes utilizadas para a predição das variáveis dependentes).

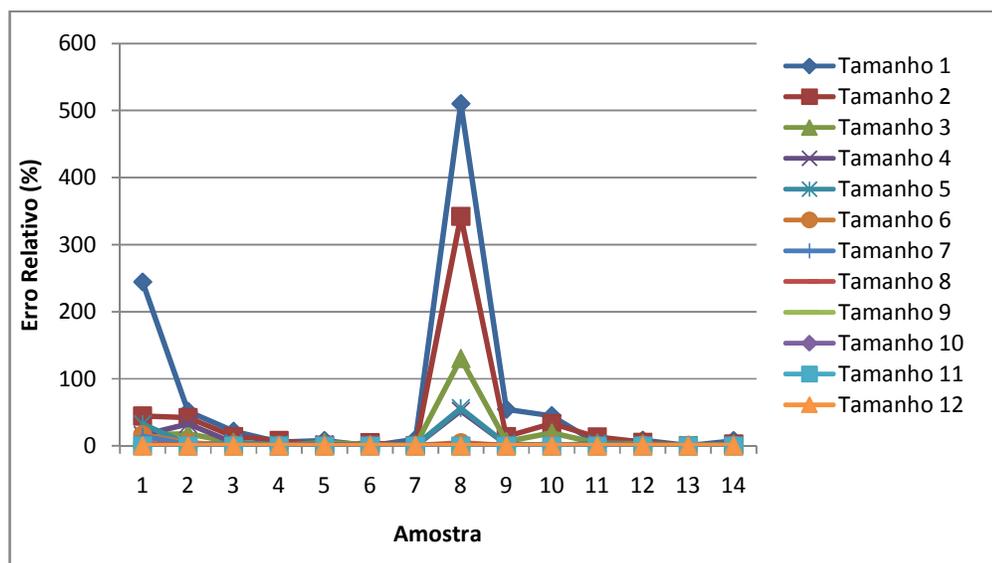


Figura 4.3: Erro relativo percentual obtido entre a variável predita e a variável medida, na qual o tamanho refere-se ao número de entradas (variáveis independentes) de cada modelo.

Os modelos que consideram os menores números de variáveis de entrada apresentam os maiores erros (principalmente para as amostras um e oito, que apresentam as menores concentrações de azeite dentro do conjunto de amostras), gerando um problema de escalonamento do gráfico, de forma que, para a seleção do melhor modelo, faz-se necessário a avaliação da Figura 4.4, onde são mostrados apenas os resultados de modelos compostos por oito ou mais variáveis de entrada, que são os que apresentam menores erros percentuais nas predições do conjunto amostral.

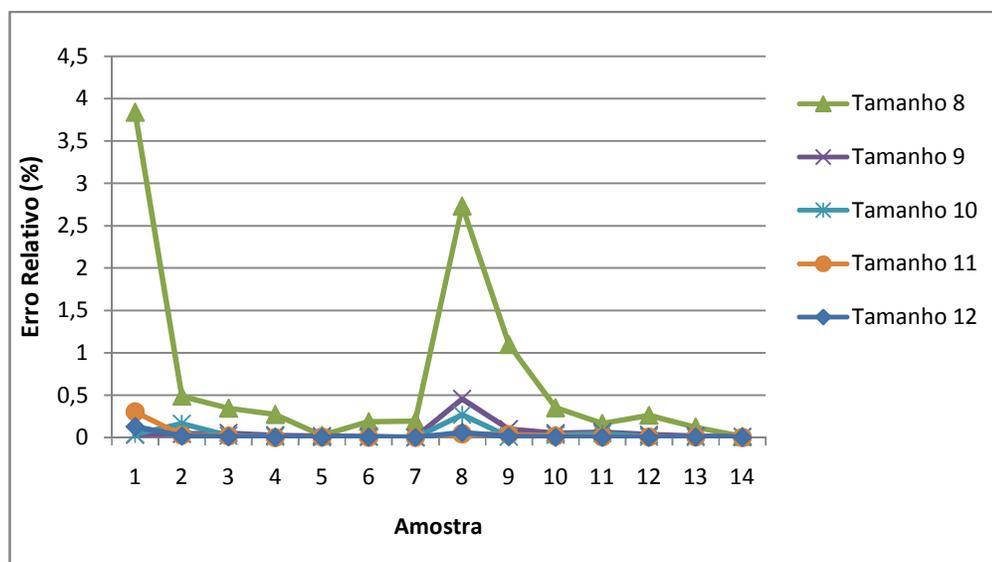


Figura 4.4: Erro relativo percentual obtido entre a variável predita e a variável medida nos modelos que apresentam erros considerados aceitáveis.

A Tabela 4.1 apresenta os pares de emissão / excitação selecionados nos modelos de tamanhos um a nove.

Tabela 4.1: Pares de Excitação / Emissão referentes aos modelos selecionados.

	Tamanho 8	Tamanho 9	Tamanho 10	Tamanho 11	Tamanho 12
Par 1	230/550	230/550	220/460	220/590	250/420
Par 2	240/750	260/410	220/810	240/740	270/620
Par 3	260/410	280/370	230/460	330/370	280/720
Par 4	280/370	310/360	290/530	340/700	310/530
Par 5	320/340	320/640	290/670	360/720	310/460
Par 6	440/670	320/750	400/750	390/850	360/500
Par 7	570/800	420/680	410/730	440/600	380/590
Par 8	570/810	440/670	460/660	460/660	400/560
Par 9	-	450/720	500/620	460/680	430/480
Par 10	-	-	510/790	490/580	560/660
Par 11	-	-	-	540/630	580/740
Par 12	-	-	-	-	580/790

A Figura 4.4 mostra que os resultados obtidos na predição da variável de estado, utilizando modelos com maior número de variáveis de entrada, apresenta erros percentuais maiores para as amostras um e oito, entretanto, nestes modelos, o erro não

assume valores superiores à 4% (nos piores casos), assumindo valores inferiores à 0,5% para modelos com nove ou mais variáveis de entrada.

Estes resultados comprovam a efetividade da metodologia de caracterização proposta, de forma que a quantificação de soluções de azeite em acetona, utilizando o corante Vermelho do Nilo e Espectroscopia Fluorescente 2D, é viável, apresentando erros de predição satisfatórios.

A ideia principal na seleção de um modelo é a busca pela melhor relação entre robustez (capacidade de predição) e tamanho de modelos (número de variáveis independentes utilizadas para a calibração do modelo). Com base nisso, o modelo selecionado é o de tamanho nove, visto que apresenta erros considerados aceitáveis (menores que 0,5%).

4.2.1 Validação da Metodologia de Análise Quantitativa

Para a avaliação dos modelos obtidos para quantificação da concentração de azeite de oliva em acetona, utilizando dados de espectroscopia fluorescente, foi realizada a caracterização de novas amostras, produzidas com uma marca de azeite diferente, marca Vilaflor (Portugal), daquela utilizada nas amostras que serviram para a calibração dos modelos. Este teste visa à avaliação da robustez da metodologia de caracterização. Os resultados obtidos neste teste são apresentados na Tabela 4.2.

O conjunto de teste é composto por quatro amostras, A, B, C e D, com concentrações de azeite de 3, 15, 25 e 40 mL de azeite/100 mL de acetona, respectivamente. Cada amostra é mensurada com espectroscopia fluorescente em duplicata, sendo cada medida avaliada separadamente.

Tabela 4.2: Resultados dos testes realizados para a validação da metodologia proposta.

	Amostra A (3% azeite)		Amostra B (15% azeite)		Amostra C (25% azeite)		Amostra D (40% azeite)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Medidas (mL/mL)								
Tamanho 8	2,77	0,51	9,80	7,47	8,35	7,42	10,25	12,97
Tamanho 9	4,47	0,36	12,63	1,51	12,02	9,63	11,54	14,68
Tamanho 10	4,68	-1,71	10,73	6,61	8,36	6,66	8,80	12,37
Tamanho 11	-0,99	-0,54	6,83	4,24	6,53	5,92	11,34	9,61
Tamanho 12	2,72	0,46	5,81	5,54	7,03	7,05	8,30	11,63
Média dos Modelos	2,44	0,18	7,80	4,56	7,21	6,45	8,54	10,54
Valor Predito	1,31		6,18		6,83		9,54	
Valor Corrigido	4,72		26,40		29,30		41,37	
Valor Real	3,00		15,00		25,00		40,00	
Erro Relativo	57%		76%		17%		3%	

Como pode ser observado, as amostras A e B apresentam um elevado erro relativo em relação à concentração real, já para as amostras C e D, o teste realizado mostrou resultados satisfatórios. Para as amostras A e B, os resultados da caracterização de cada uma das medidas de espectroscopia (duplicatas) apresentaram resultados

significativamente diferentes, indicando a presença de erros experimentais elevados nas medidas destas amostras. Fato que inviabiliza suas utilizações para a avaliação da eficiência da metodologia proposta.

O resultado apresentado pela aplicação direta dos modelos ajustados na predição das novas amostras de azeite mostrou ser ineficiente na caracterização das amostras de teste. Os valores preditos necessitaram de uma correção através da multiplicação por um fator constante, obtido através da relação média entre os componentes espectrais do espectro de branco de azeite mensurado na etapa de coleta das amostras de calibração e das amostras de teste. A diferença quantitativa entre estes espectros evidencia a discrepância nas características dos dados espectrais entre as duas etapas de coleta de dados experimentais.

A Figura 4.5 mostra os espectros dos brancos (soluções com 0% de azeite) utilizados na etapa de calibração dos modelos e no teste realizado, enquanto a Figura 4.6 mostra a diferença entre esses espectros de brancos. Ambas evidenciam a diferença apresentada entre os dois espectros, indicando que a solução de Vermelho do Nilo utilizada não se manteve constante (os testes foram realizados com grande intervalo de tempo), possivelmente devido à evaporação do solvente do reagente ou contaminação do mesmo com azeite. Outra possível fonte de erros pode ser devido ao tempo de conservação da solução de Vermelho do Nilo, pois o mesmo ficou dois meses acondicionado em geladeira, mas, devido a sua instabilidade, pode ter ocorrido alguma degradação na solução. Para evitar tais possíveis erros, nova solução de Vermelho do Nilo deveria ter sido feita, no entanto no experimento foi utilizada a solução que estava disponível. Esta diferença significativa entre as medidas demonstra um ponto fraco da metodologia, influenciando diretamente nas análises.

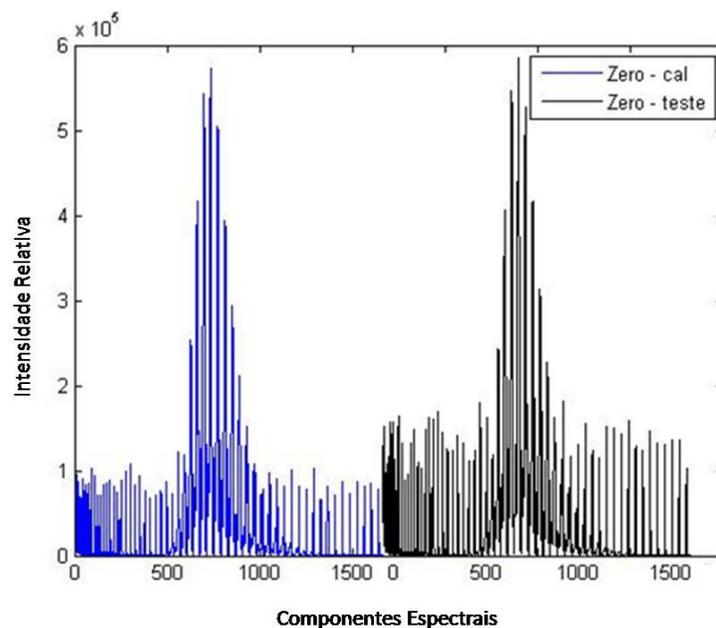


Figura 4.5: Espectros de brancos (0% de azeite em acetona) utilizados na calibração do modelo e no teste de validação, respectivamente.

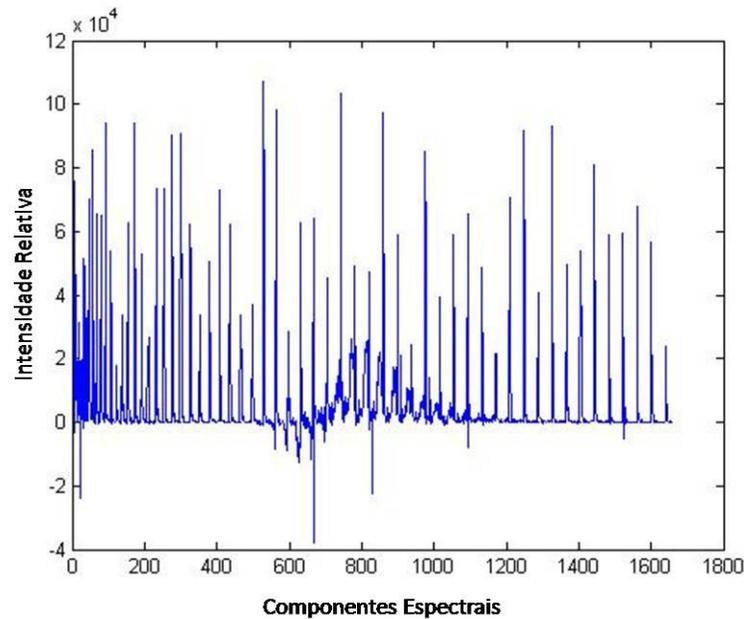


Figura 4.6: Diferença entre os espectros dos brancos utilizados na calibração do modelo e no teste de validação.

4.3 Cultivo das Microalgas

Para a construção das curvas de crescimento das microalgas, foram realizadas medidas diárias de absorvância dos fotobiorreatores, os quais foram mantidos nas condições de 20°C, 10000 lux (intensidade luminosa), fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro e alimentação de ar de 25 v.v.m. A relação entre densidade ótica e biomassa, apresentada na Equação 4.1, foi definida no trabalho de Ramirez (2013).

$$Biomassa \left(\frac{g}{L} \right) = 0,4669 X DO_{(570nm)} - 0,0243 \quad (4.1)$$

As curvas de crescimento de biomassa microalgal são apresentadas nas Figuras 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10.

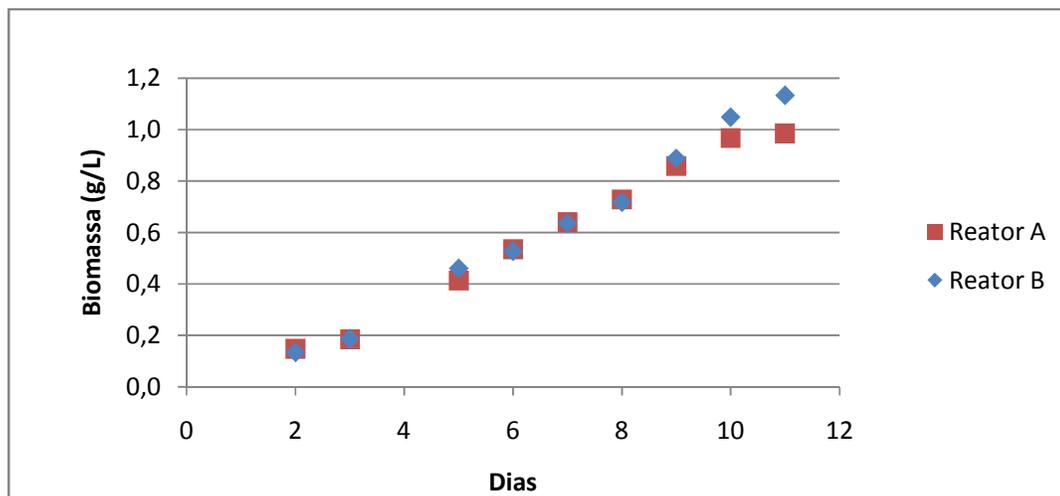


Figura 4.7: Curva de crescimento microalgal cultivada com 0% de vinhaça.

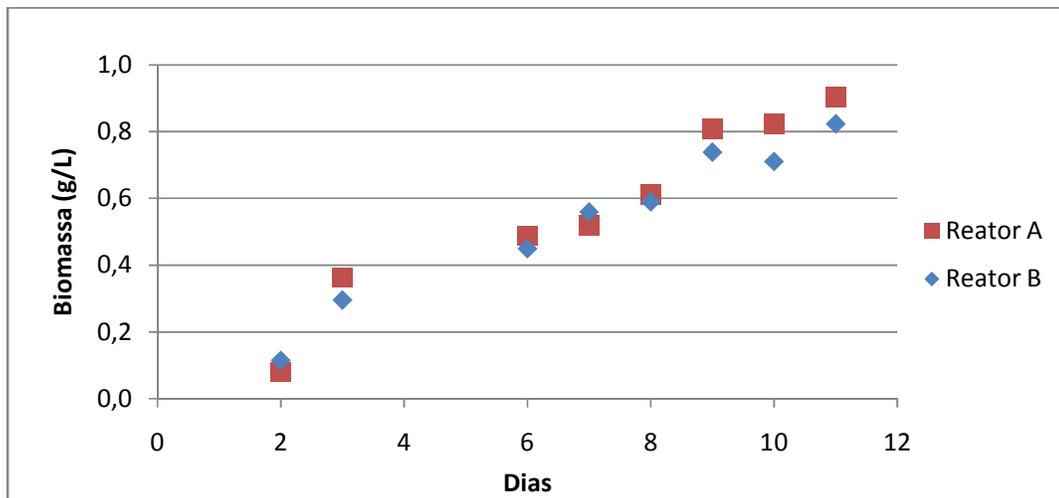


Figura 4.8: Curva de crescimento microalgal cultivada com 8,1% de vinhaça.

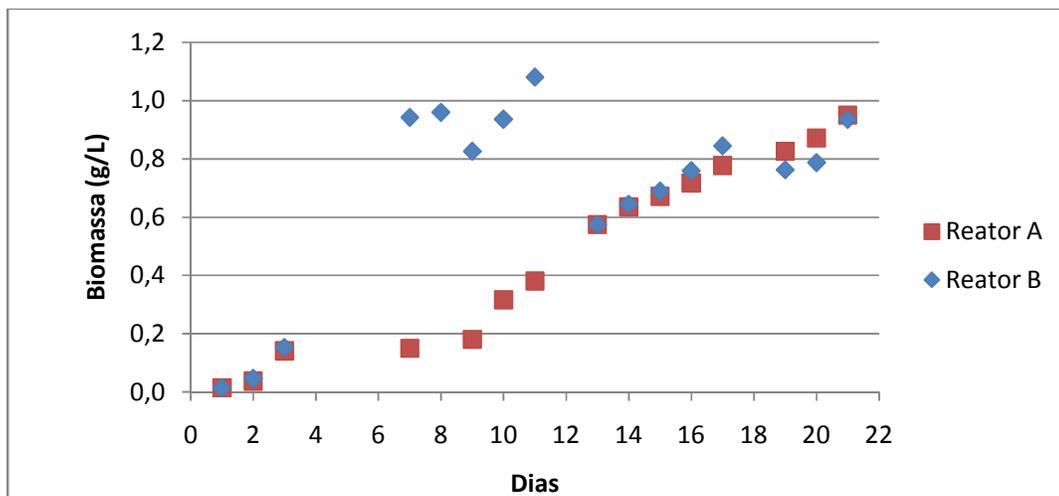


Figura 4.9: Curva de crescimento microalgal cultivada com 20% de vinhaça.

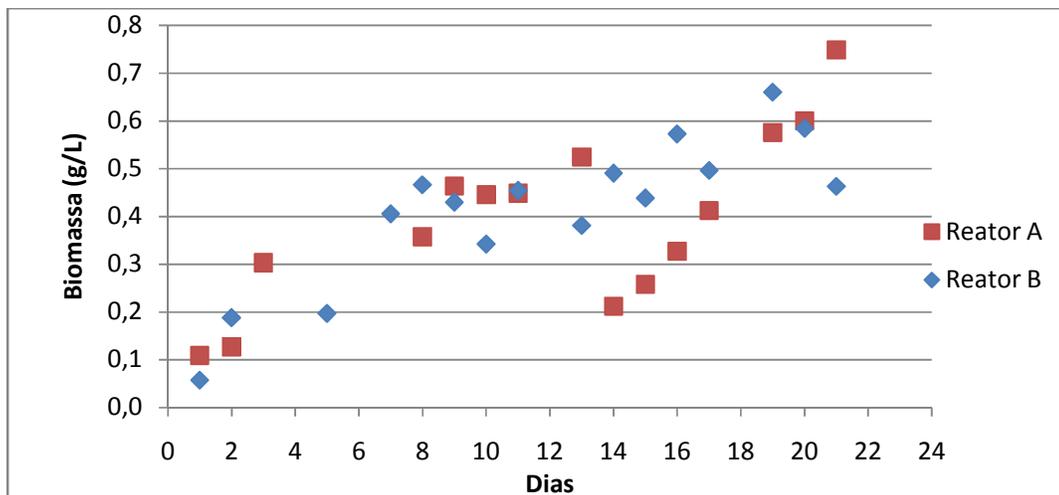


Figura 4.10: Curva de crescimento microalgal cultivada com 31,9% de vinhaça.

Como pode ser observado nas Figuras 4.7 e 4.8, os fotobiorreatores com 0% e 8,1% de vinhaça apresentaram uma boa equivalência entre as duplicatas. Já os reatores com 20% e 31,9%, embora apresentem a mesma tendência, não apresentam uma equivalência tão evidente. Isso ocorre porque a vinhaça utilizada continha muitos sólidos suspensos que ocasionaram diferenças de turbidez entre as duplicatas, fator que influi diretamente no crescimento desses microorganismos e que apresentou a maior evidência nos fotobiorreatores que continham 31,9% de vinhaça.

Como pode ser observado na Figura 4.11, ocorreu a floculação de particulados sólidos que dificultaram a homogeneização dos reatores, sendo que para maiores porcentagens de vinhaça houve maior floculação. A não homogeneidade do meio pode ser fonte de erro para as análises de densidade ótica em virtude da inconsistência das características das alíquotas para a análise. Portanto, a discrepância de dados que pode ser vista na Figura 4.9 entre o quinto e décimo primeiro dias pode ser devido a erros experimentais em decorrência da floculação de sólidos suspensos presentes na vinhaça.

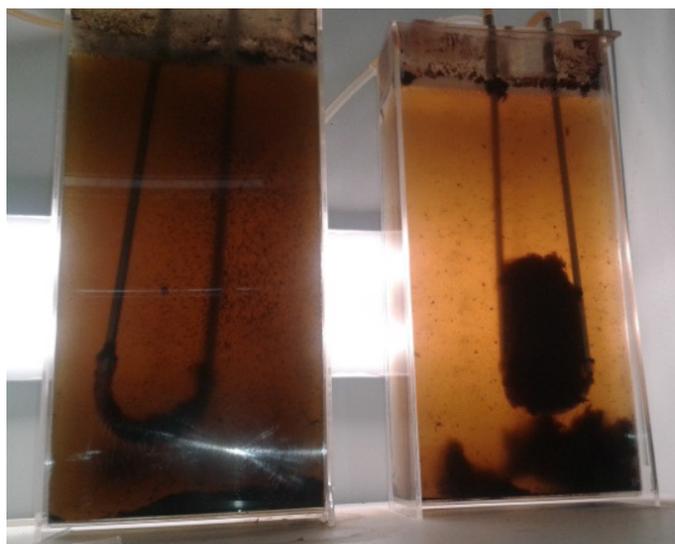


Figura 4.11: Fotobiorreatores com 20% e 31,9% de vinhaça com o conteúdo de sólidos suspensos floculados.

O cultivo dos fotobiorreatores com 0% e 8,1% de vinhaça teve duração de onze dias, como sugerido no trabalho de Ramirez (2013). Entretanto, nos fotobiorreatores com 20% e 31,9% de vinhaça, o cultivo foi de vinte e um dias devido a análises visuais que indicaram um atraso no crescimento das microalgas, como pode ser visto na Figura 4.12. Como visualmente a coloração esverdeada característica do crescimento desse microorganismo se mostrou evidente apenas a partir do décimo dia, decidiu-se dar continuidade ao cultivo para a obtenção de dados mais consistentes.

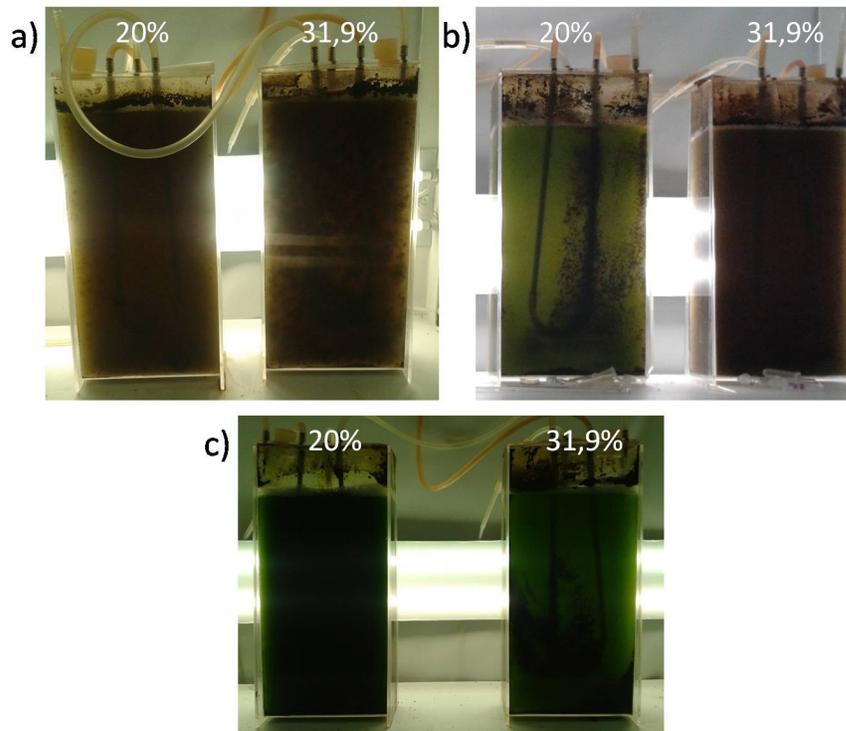


Figura 4.12: Acompanhamento visual do crescimento da microalga. a) quinto dia de cultivo; b) décimo dia de cultivo; c) décimo oitavo dia de cultivo.

4.3.1 Análise de Fluorescência dos Cultivos de Microalgas

Durante o período de cultivo foram realizadas medidas de espectroscopia fluorescente em intervalos de dois dias visando o acompanhamento do acúmulo lipídico das microalgas. A intenção é avaliar a aplicação direta dos modelos desenvolvidos para caracterização lipídica desenvolvida com azeite de oliva em acetona, com a finalidade de quantificar a evolução da concentração de lipídios nos reatores de microalgas.

Os resultados iniciais da aplicação dos modelos quimiométricos nos dados de espectroscopia dos fotobiorreatores, apresentaram resultados incoerentes com o que era esperado, como resultados de concentração negativa de lipídios, ou então, valores absolutos elevados. Estes resultados evidenciam que deve ser aplicada uma nova metodologia de calibração aos modelos quimiométricos, de forma a possibilitar a caracterização da concentração de lipídios nos reatores, sem sofrer o efeito da modificação das características dos espectros, devido à modificação da matriz de compostos do meio reacional, uma vez que esta sofre modificações significativas entre cultivos.

Apesar dos resultados negativos obtidos na avaliação quantitativa da concentração de lipídios em fotobiorreatores, pode ser observado na Figura 4.13 que os resultados obtidos através das análises de fluorescência apresentam uma tendência de crescimento que condiz com o crescimento da biomassa microalgal para os fotobiorreatores com 8,1% de vinhaça, indicando a viabilidade de acompanhamento do acúmulo lipídico através do método proposto, após ajustes no método de calibração. Como no começo do cultivo o meio encontrava-se turvo, dificultando a penetrabilidade de luz no meio, as microalgas

podem não ter realizado fotossíntese e terem consumido fonte de carbono diferente de CO_2 disponível no meio, o que pode afetar diretamente a forma como o microrganismo produz ou consome lipídios.

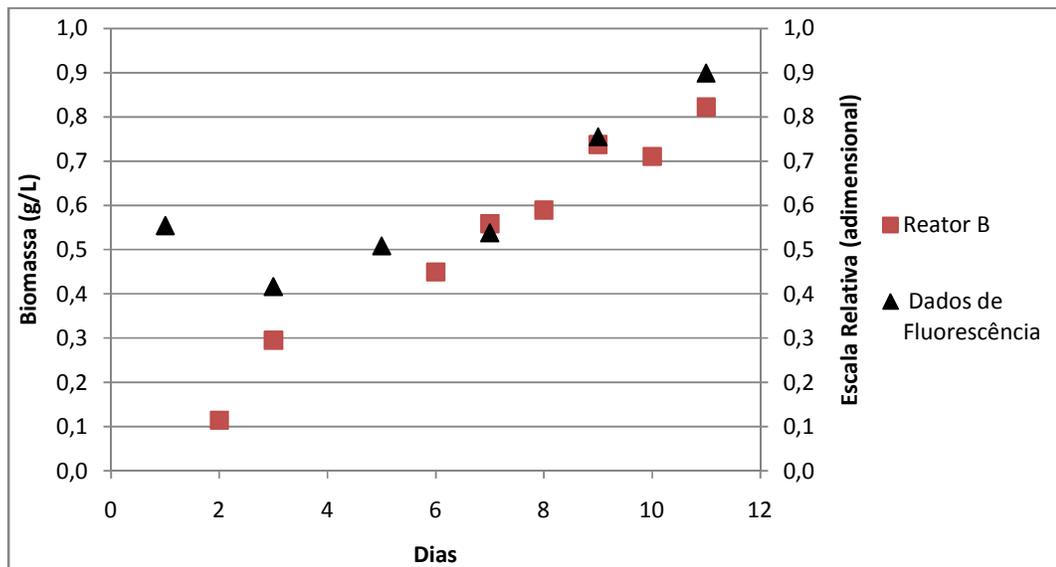


Figura 4.13: Crescimento da biomassa microalgal (coordenada da esquerda) e acompanhamento lipídico do cultivo (coordenada da direita) realizado com 8,1% de vinhaça no fotobiorreator B.

Para a análise do acompanhamento lipídico, os dados obtidos aplicando-se a metodologia desenvolvida foram normalizados para a obtenção das médias dos tamanhos de modelos de interesse, definidos na caracterização do azeite em acetona (tamanhos de modelo entre oito e doze). Com base nessa média, foi possível analisar a tendência dos dados obtidos para os diferentes cultivos realizados.

Para a avaliação qualitativa dos resultados obtidos na metodologia de caracterização proposta, os resultados obtidos na aplicação dos modelos quimiométricos previamente selecionados (modelos de tamanho entre oito e doze variáveis de entrada) nos dados de fluorescência oriundos dos fotobiorreatores foram normalizados e combinados através da média da predição, entre todos os modelos, para cada amostragem.

A Figura 4.14 apresenta os resultados da predição média normalizada para tendência de acúmulo lipídico, obtida para os cultivos realizados. Como podem ser observados, alguns dados apresentam comportamento oscilatório, possivelmente devido a erros experimentais ou ruídos de medida devido ao meio reacional altamente complexo. Outra possível fonte de erro está associada à instabilidade do corante Vermelho no Nilo, uma vez que o mesmo perde sua capacidade fluorescente no decorrer da análise fluorométrica, como mostrado na Figura 4.15. A amostra, de coloração arroxeada antes da análise, apresenta-se praticamente incolor após a varredura realizada pelo equipamento (em torno de dez minutos), indicando que, possivelmente, ocorre a degradação do Vermelho no Nilo e perda de fluorescência.

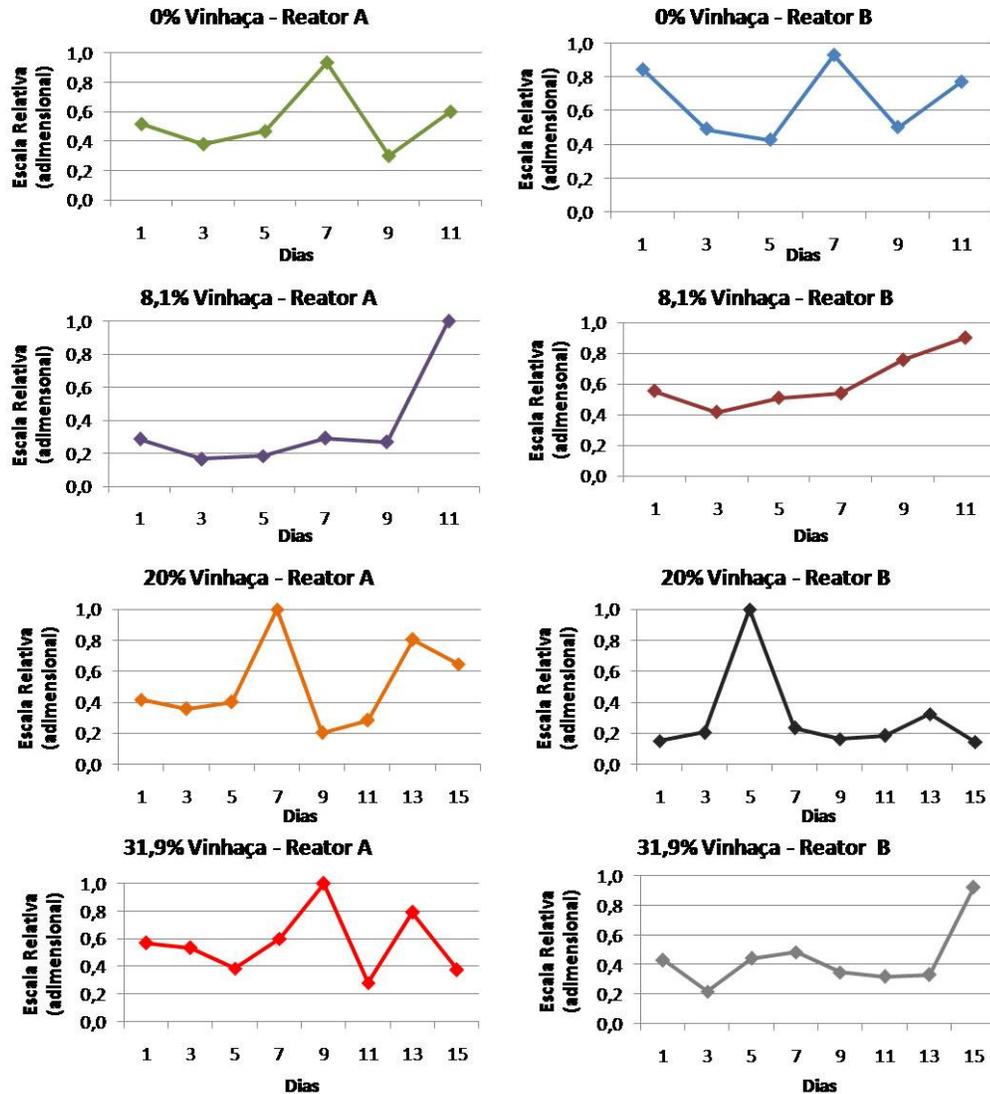


Figura 4.14: Média de concentração lipídica predita normalizada dos cultivos de microalgas, obtidas com dados de espectroscopia fluorescente e modelos quimiométricos ajustados com soluções de azeite de oliva em acetona.

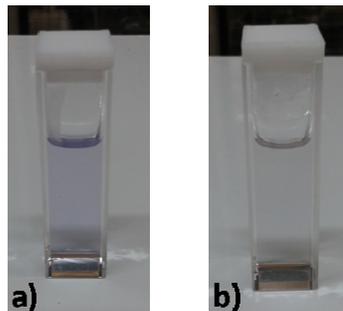


Figura 4.15: Comparação de coloração da amostra antes e depois da medida de espectroscopia fluorescente. a) amostra antes da análise – tom arroxado; b) amostra após análise – incolor (aproximadamente dez minutos).

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Com base nos resultados obtidos conclui-se que a metodologia de quantificação de lipídios estudada não pode ser aplicada diretamente para a quantificação dos lipídios presentes nas microalgas. No entanto, os resultados indicam que a metodologia pode ser refinada através de calibrações dos modelos quimiométricos, usando dados e amostras reais do processo, viabilizando o acompanhamento da concentração de lipídios nos fotobiorreatores através de medidas de espectroscopia fluorescente própria.

Nos primeiros testes realizados com diferentes concentrações de azeite de oliva em acetona foi possível a modelagem e predição de concentrações utilizando-se a metodologia PSCM, conforme pode ser visto na Figura 4.4. O teste de validação realizado mostrou ser ineficiente na caracterização de amostras analisadas com dois meses de diferença. Para obtenção de valores preditos significativos, os resultados do teste necessitam ser corrigidos através da utilização de um fator de correção constante, obtido através da análise da variação média apresentada entre os componentes espectrais das amostras de branco de azeite coletada em ambas as etapas. Com o uso deste fator de correção, a predição para as amostras C e D apresentou erros aceitáveis (17% e 7%, respectivamente). Para evitar a necessidade de correção em virtude da diferença entre as soluções de branco, como trabalho futuro poderão ser realizados novos testes com nova solução de Vermelho no Nilo em acetona. Este fato em conjunto com a perda de coloração durante a medição indica que o Vermelho do Nilo não parece ser o corante mais adequado para este tipo de análise.

Com base no modelo proposto, utilizando unicamente dados de azeite em acetona, foi realizada a quantificação lipídica das microalgas. Devido ao meio microalgal ser mais complexo do que soluções de azeite em acetona, apresentando elementos que interferem na matriz de espectroscopia de forma imprevisível, os resultados quantitativos obtidos não foram satisfatórios. A vinhaça, um dos constituintes do meio reacional, pode ter influência direta na fluorescência, no entanto o comportamento fluorométrico da mesma não foi avaliado individualmente.

Na tentativa de minimizar a influência do meio reacional nos modelos quimiométricos, foi feito o uso de intensidades de fluorescência relativas, tanto na etapa de calibração dos modelos, quanto na avaliação dos fotobiorreatores, entretanto os resultados não apresentaram nenhuma melhora significativa.

A avaliação qualitativa das predições de lipídios nos fotobiorreatores foi efetuada através da normalização destes e avaliação conjunta valendo-se da média entre os modelos quimiométricos, constatando-se o aparecimento de um padrão de variação da concentração de lipídios equivalente ao esperado, baseado na curva de crescimento de biomassa. Esta tendência de acúmulo lipídico se apresentou com maior evidência para o cultivo com 8,1% de vinhaça. Para os demais cultivos, os resultados apresentaram oscilações para certas amostragens, entretanto, existe a presença de padrões estacionários e/ou de incremento proporcional em partes do cultivo, indicando que estudos posteriores devem ser realizados para a avaliação da viabilidade desta metodologia de quantificação.

Os cultivos de todos os fotobiorreatores apresentaram resposta positiva, com aumento da biomassa. O fato de a vinhaça utilizada apresentar alta quantidade de sólidos suspensos pode ter influenciado no aumento da fase de adaptação da microalga ao meio

reacional, principalmente nos fotobiorreatores com 20% e 31,9%, fazendo com que estes apresentassem maior tempo de cultivo em relação aos fotobiorreatores com 0% e 8,1% de vinhaça. Para a otimização do tempo de cultivo das microalgas em meios contendo altos teores de vinhaça com muitos sólidos suspensos as repicagens do inóculo poderiam ser realizadas em meio já contendo as porcentagens de vinhaça desejadas. Assim, os microrganismos já estariam adaptados às condições impostas e a fase de adaptação do cultivo nos fotobiorreatores seria menor do que a constatada.

Embora a metodologia de quantificação lipídica microalgal não possa ser diretamente aplicada nos dados coletados, pode se constatar que existe uma relação entre crescimento de biomassa e acúmulo lipídico. Como próximos passos, além de se tratar os erros discutidos, aconselha-se investigar a relação entre crescimento de biomassa, acúmulo lipídico e qual a influência das características do meio de cultivo (iluminação, teor de nitrogênio, pH, etc.) no acúmulo de lipídios intracelulares.

6 Referências

AKIMOTO, S.; MIMURO, M. Application of time-resolved polarization fluorescence spectroscopy in the femtosecond range to photosynthetic systems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 1, p. 163-170, // 2007.

ALLEGRINI, F.; OLIVIERI, A. C. A new and efficient variable selection algorithm based on ant colony optimization. Applications to near infrared spectroscopy/partial least-squares analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 18-25, // 2011.

ALONZO, F.; MAYZAUD, P. Spectrofluorometric quantification of neutral and polar lipids in zooplankton using Nile red. **Marine Chemistry**, v. 67, n. 3-4, p. 289-301, // 1999.

ARAUJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95-98, // 2013. ISSN 1350-4177.

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.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F. D.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009 2009.

CARDOSO, L. G. V. et al. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais – Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 127-136, jan./mar. 2010 2010.

CHEN, W.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 135-141, // 2011.

CHEN, W. et al. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 41-47, // 2009.

CHEN, Z. et al. Scenedesmus sp. NJ-1 isolated from Antarctica: A suitable renewable lipid source for biodiesel production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3219-3225, // 2012.

CHENG, J. et al. Using wet microalgae for direct biodiesel production via microwave irradiation. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 531-535, // 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, // 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, // 2008.

CLEMENTSCHITSCH, F. et al. Sensor combination and chemometric modelling for improved process monitoring in recombinant E. coli fed-batch cultivations. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 2, p. 183-196, 11/4/ 2005.

COOKSEY, K. E. et al. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, n. 6, p. 333-345, // 1987.

COOPER, M. S. et al. Visualizing "green oil" in live algal cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 198-201, // 2010.

DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 11, n. 1, p. 108-114, // 2007.

DIAZ, G. et al. Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. **Micron**, v. 39, n. 7, p. 819-824, // 2008.

DOAN, T. T. Y.; OBBARD, J. P. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 895-901, // 2011.

DU, Z. et al. Microwave-assisted pyrolysis of microalgae for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4890-4896, // 2011.

ELSEY, D. et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 639-642, // 2007.

ELTGROTH, M. L.; WATWOOD, R. L.; WOLFE, G. V. Production and cellular localization of neutral long-chain lipids in the haptophyte algae *Isochrysis galbana* and *Emiliania huxleyi*. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 5, p. 1000-1009, // 2005.

EVANS, C. T.; RATLEDGE, C.; GILBERT, S. C. A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 4, n. 3-4, p. 203-210, // 1985.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, // 1957.

GENICOT, G. et al. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p. 1181-1194, // 2005.

GOVENDER, T. et al. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 507-511, // 2012.

GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 3, p. 965-973, // 1985.

GRIS, L. R. S. **Produção da Microalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator Airlift**. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL 2011.

HALIM, R. et al. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 178-185, // 2011.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, // 2008.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, n. 11, p. 1283-1287, // 2001.

IZARD, J.; LIMBERGER, R. J. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 2, p. 411-418, // 2003.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**. 1986. New York, Springer-Verlag.

JORGE, N. **Química e Tecnologia de Óleos Vegetais**. 2009. 165.

KAMISAKA, Y. et al. Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1438, n. 2, p. 185-198, // 1999.

KIM, M. K. et al. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2220-2228, // 2007.

KIMURA, K.; YAMAOKA, M.; KAMISAKA, Y. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 331-338, // 2004.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer Science+Business Media, LLC. Third Edition 2006.

LEE, S. J.; YOON, B. D.; OH, H. M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 7, p. 553-556, // 1998.

LI, B.; MORRIS, J.; MARTIN, E. B. Model selection for partial least squares regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, n. 1, p. 79-89, 10/28/ 2002. ISSN 0169-7439.

LIU, R. X. et al. Principal component regression analysis with SPSS. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 71, n. 2, p. 141-147, // 2003.

MAKULLA, A. Fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus*: Correlation to dilution rates. **Limnologia**, v. 30, n. 2, p. 162-168, // 2000.

MCGINNIS, K. M.; DEMPSTER, T. A.; SOMMERFELD, M. R. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 1, p. 19-24, // 1997.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização Química de Extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo Comparativo de Métodos de Extração.** UFRGS - Instituto de Química - Programa de Pós-Graduação em Química - Tese de Doutorado 2005.

METTING JR, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5-6, p. 477-489, // 1996.

MORESCO, C.; BUENO, N. C. Scenedesmaceae (Chlorophyceae - Chlorococcales) de um lago artificial urbano: Desmodesmus e Scenedesmus. **Biological Sciences**. v. 29, n. 3, p. 289-296, // 2007.

MULLEN, R. J. et al. A review of ant algorithms. **Expert Systems with Applications**, v. 36, n. 6, p. 9608-9617, // 2009.

NETO, A. M. P. et al. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v. 55, p. 525-531, // 2013.

RADMANN, E. M. et al. **CULTIVO DE MICROALGAS PARA A BIOFIXAÇÃO DE CO₂ E OBTENÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.** Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia Bioquímica 2011.

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo do Crescimento da Microalga *Scenedesmus sp.* em Vinhaça.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2013.

RAMOS, L. M. P.; SILVA, I. M.; CAMARA, F. M. ANALISE ECOLÓGICA DA COMUNIDADE FITOPLANCTÔNICA DA LAGOA NOVA BRASÍLIA. **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa - PB 2007.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2979-2985, // 2010.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, // 2011.

RÍOS, S. D. et al. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: Screening studies toward biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 378-388, // 2013.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, n. 4, p. 291-311, // 2011.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE MICROALGAS. **Revista CIATEC – UPF**, vol.4 (1), p.p.48-60 2012.

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

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis.** Belmont, CA, Thomson Brooks/Cole 2007.

SOXHLET, F. V. **Polytechnisches J.** **232**, 461 1879.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, // 2006.

TAKEDA, H. Cell wall sugars of some Scenedesmus species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 673-675, // 1996.

TARTAKOVSKY, B.; LISHMAN, L. A.; LEGGE, R. L. Application of multi-wavelength fluorometry for monitoring wastewater treatment process dynamics. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2941-2948, // 1996.

TONIAL, I. B. et al. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. **Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición** Vol. 59 Nº 1 2009.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, // 2001.

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, 2// 2011. ISSN 0960-8524.

XU, D. et al. Detection and quantitation of lipid in the microalga Tetraselmis subcordiformis (Wille) Butcher with BODIPY 505/515 staining. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 386-390, // 2013.