

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Física**

**Dissertação de mestrado**

**John Fredy Ricardo Marroquin**

**O USO DA ESPECTROSCOPIA ÓPTICA NA  
DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROALGAS**

Brasília

2020

**John Fredy Ricardo Marroquin**

**O USO DA ESPECTROSCOPIA ÓPTICA NA  
DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em física.

**Orientador:** Prof. Dr. Sebastião William da Silva.

Brasília

2020

## **Agradecimentos**

Ao professor Sebastião por me orientar pelos caminhos da ciência, pelo seu valioso tempo e por ser uma inspiração na vida acadêmica.

A minha mãe Nubia, meu pai Jairo e meu irmão Jairito por ser um apoio incondicional na vida.

A Rali pelo amor brindado e por ser a luz que torna mais claro o caminho.

Meus agradecimentos a minha prima Lady e seu esposo Julian, minha tia Nubia e meus primos Lucho e Richar.

Também agradeço profundamente aos amigos e colegas que contribuíram no trabalho de alguma forma.

A Capes pelo apoio financeiro.

## Resumo

Nesse trabalho as espectroscopias Raman ressonante e FTIR foram usadas com sucesso na diferenciação e caracterização bioquímica de três espécies diferentes de microalgas: *Chlamydomonas* sp. (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceanica* (NN). As características dos espectros Raman e de FTIR, juntamente com a análise por componentes principais, permitiram diferenciar as três espécies de microalgas com precisão superior a 96%. Além do mais, os dados espectroscópicos permitiram estimar os teores relativos de carotenoides, lipídios e carboidratos nas diferentes espécies de microalgas. A precisão dessas estimativas foi validada por técnicas convencionais tais como espectroscopia UV-VIS e gravimetria. A espectroscopia Raman determinou que o teor de carotenoides com relação ao teor de clorofilas *a* e *b* é 53 % maior na microalga NN, quando comparada com a microalga CO e 37 % superior com a observada na microalga CA. Por sua vez, a espectroscopia de FTIR mostrou que a espécie NN apresentou o maior teor lipídico relativo, seguido pela espécie CO. O menor teor lipídico foi observado para a espécie CA. Um comportamento semelhante foi observado para os teores relativos de carboidratos.

### Palavras chave

*Microalgas, Carotenoides, Lipídio, Espectroscopia Raman, Espectroscopia de FTIR.*

## **Abstract**

In this work, resonant Raman and FTIR spectroscopies were successfully used to differentiating and characterization of three different microalgae species: *Chlamydomonas* sp. (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) and *Nannochloropsis oceanica* (NN). The characteristics of the Raman and FTIR spectra, together with the Principal Component Analysis, allowed differentiating the three microalgae species with an accuracy greater than 96%. Furthermore, the spectroscopic data allowed to estimate the relative levels of carotenoids, lipids and carbohydrates in the different microalgae species. The accuracy of these estimates has been validated by conventional techniques such as UV-VIS spectroscopy and gravimetric analysis. Raman spectroscopy determined that the content of carotenoids in relation to the content of chlorophylls a and b is 53% higher in microalgae NN, when compared with microalgae CO and 37% higher than that observed in microalgae CA. On the other hand, FTIR spectroscopy showed that the NN species had the highest relative lipid content, followed by the CO species. The lowest lipid content was observed for the CA species. A similar behavior was observed for the relative levels of carbohydrates.

## **Keywords**

*Microalgae, Carotenoids, Lipid, Raman Spectroscopy, FTIR Spectroscopy.*

## Lista de figuras e tabelas

- Figura 1 Estado base de uma molécula e possíveis transições ou movimentos moleculares. Fonte: adaptada de [38]
- Figura 2 Modelo de representação atômica mola-bola dos três modos de vibração do  $H_2O$  e do  $CO_2$ . Fonte: adaptada de [40]
- Figura 3 Modelo de nuvem de elétrons da molécula de dióxido de carbono mostrando as vibrações ativas de IR e Raman. Fonte: adaptada de [40].
- Figura 4 Alterações de dipolo e polarização no dissulfeto de carbono, com infravermelho e espectros Raman resultantes. Fonte: adaptada de [40].
- Figura 5 Diagramas de deslocamento selecionados para  $CH_3$  em  $CH_3Br$ . (a) O estiramento simétrico de  $CH_3$  em  $CH_3Br$  acima de  $3000\text{cm}^{-1}$  (b) Estiramento assimétrico acima de  $3000\text{cm}^{-1}$  (c) Uma curvatura de  $CH$  perto de  $1450\text{-}1500\text{cm}^{-1}$ . (d) um modo de baixa frequência abaixo de  $600\text{cm}^{-1}$ . Fonte: [40].
- Figura 6 Curva de energia potencial para uma molécula diatômica. A linha sólida indica um potencial Morse que se aproxima do potencial real. A linha quebrada é o potencial da oscilação harmônica.  $D_e$  e  $D_0$  são as energias de dissociação teórica e espectroscópica, respectivamente. Fonte: adaptada de [40].
- Figura 7 Diagrama dos processos de espalhamento Rayleigh e Raman. O estado vibratório de energia mais baixa  $m$  é mostrado na parte inferior, com estados de energia crescente acima dele. Fonte: adaptada de [40].
- Figura 8 Espectros de duas amostras com arranjos moleculares diferentes. (a) Espectro do diamante com uma única banda característica devida à sua estrutura molecular. (b) Espectro do poliestireno com disposições moleculares menos simétricas e, por tanto, varia o número de bandas em termos da quantidade e forma das bandas. Fonte: adaptada [42].
- Figura 9 Elementos de simetria da molécula planar  $AB_4$  (por exemplo, íon  $PtCl_4^{2-}$ ). Fonte: [43].
- Figura 10 Polarização de uma molécula diatômica em um campo elétrico. Fonte: adaptada de [43].
- Figura 11 Mudanças no elipsoide de polarização durante a vibração da molécula de  $CO_2$ . Fonte: [43].
- Figura 12 Diferença entre as vibrações  $\nu_1$  e  $\nu_3$  na molécula de  $CO_2$  Fonte: [43].
- Figura 13 Mudanças no elipsoide de polarização durante a vibração normal de uma molécula de  $H_2O$ . Obtida de [43].

- Figura 14 Representação esquemática dos níveis de energia envolvidos na espectroscopia Raman (a) antiStokes, Rayleigh, Stokes (b) Raman e ressonância Raman. Fonte: [47].
- Figura 15 Comparação dos níveis de energia para Raman normal, ressonância Raman e fluorescência. Fonte: [43].
- Figura 16 Mudanças no momento dipolar para a molécula de H<sub>2</sub>O durante cada vibração normal. Fonte: [43].
- Figura 17 Diagrama dos níveis de energia para a absorção infravermelha e o efeito Stokes na dispersão Raman para uma transição vibracional. A energia dispersa do fóton ( $\hbar\omega$ ) é deslocada da energia de radiação laser incidente pela energia vibracional infravermelha obtida pela molécula ( $\hbar\omega_v$ ). Fonte: adaptada de [43].
- Figura 18 Os rangos na espectroscopia eletrônica. Fonte: adaptada de [58].
- Figura 19 Representação esquemática das transições eletrônicas. Fonte: [59].
- Figura 20 (a) espectros Raman de uma microalga para diferentes tempos de exposição (linha preta: 5 segundos, linha cinza escuro: 10 segundos e linha cinza claro: 15 segundos) (b) curva de calibração para quantificar o  $\beta$ -caroteno nas microalgas. Fonte: [14].
- Figura 21 São mostrados os dados obtidos das duas principais componentes (PC1 e PC2) do PCA. Os espectros de células com alto conteúdo de nitrogênio (N), N intermediário e N baixo são representados pelos símbolos indicados. O número ao lado de cada símbolo indica o dia do crescimento. Fonte: [78].
- Figura 22 (a) Espectros Raman das as três espécies de microalgas (NN, CO e CA) obtidos com a linha 405 nm. (b) Espectros Raman médios da microalga NN obtido com as linhas de excitação 405 e 532 nm. O espectro da clorofila, obtido com a linha 405 nm também é mostrado.
- Figura 23 Espectros Raman das três espécies de microalgas (CO, CA e NN) obtidos com a linha 405nm.. As linhas em preto mostram as médias espectrais.
- Figura 24 PCA dos 3 grupos de microalgas (NN: pontos vermelhos, CA: pontos verdes e CO: pontos azuis) obtidos em três diferentes semanas ((a)-(c)). Em (d) é mostrado a comparação entre as três espécies no período de 3 semanas.
- Figura 25 (a) (i) Gráfico de carregamento de peso obtido na região de 850–1750 cm<sup>-1</sup> gerado a partir dos espectros Raman (117 espectros) das três diferentes espécies de microalgas (NN, CO e CA) (i). Sobreposição dos espectros Raman da microalga CO, CA e NN (ii) e Razão entre as intensidades integradas de cinco diferentes bandas Raman associadas aos modos vibracionais dos carotenoides e a banda Raman da vibração  $\nu(\text{C-N})$  associada a clorofila. (b) Razão entre as áreas integradas  $A_{\text{carot}}/A_{\nu(\text{C-N})}$ .

Figura 26 (a) Espectros de absorção óptica dos pigmentos extraídos das microalgas CO, CA e NN. As linhas tracejadas no topo do painel representam aos componentes espectrais de absorção dos carotenoides e das clorofilas a e b, usados a Eq. 17 (linhas vermelhas). Esses espectros foram adaptados das referências [115,117,119-122]. As linhas verticais em 405 e 532 nm marcam os comprimentos de onda de excitação utilizados nos experimentos de espectroscopia Raman ressonante. Em (b) é mostrado o espectro de absorção óptica da microalga CO ajustado com curvas gaussianas. Em (c) são mostradas comparações entre os teores de carotenoides (Carat – barras laranjas) e clorofila ((Cl a + Cl b) - barras verdes) e as razões (Teor Carat/(Cl a + Cl b) – barras pretas) obtidos a partir dos ajustes. Para comparação, as razões  $A_{\text{carot}}/A_{\text{v(CN)}}$ , obtidas por espectroscopia Raman é mostrado pelas barras em vermelho.

Figura 27 Espectro de FTIR das três espécies de microalgas (CA, CO e NN). A banda atribuída à Amida I (em preto) foi escolhida como um pico de referência interno para a avaliação do conteúdo relativo de lipídios e carboidratos. As bandas de absorção nas regiões  $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$  (em cinza escuro) e  $1000 - 1190 \text{ cm}^{-1}$  (em cinza claro) foram usadas para estimar os teores relativos de lipídios e carboidratos.

Figura 28 PCA dos 3 grupos de microalgas (NN: pontos em azuis, CA: pontos em verde e CO: pontos em vermelho).

Figura 29 (a) Teor lipídico relativo obtidos para as microalgas CO, CA e NN, por meio dos espectros de FTIR (razão  $A_{\text{lipídios}}/A_{\text{amida 1}}$  - barras pretas) e pelo método gravimétrico (barras vermelhas). Os valores foram normalizados com relação ao teor lipídico da microalga CO. (b) Teor relativo de carboidratos obtidos para as microalgas CO, CA e NN, por meio dos espectros de FTIR.

Tabela1 Composição do meio de cultura utilizado no cultivo das s três espécies de microalgas. (BG11).

Tabela2 Atribuições dos modos vibracionais Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) das microalgas CO, CA e NN obtidos com a linha de excitação 405 nm.

Tabela3 Estimativas dos teores de carotenoides relativos aos teores de clorofila, obtidos por três diferentes metodologias. Dois deles, a partir dos espectros de absorção UV-VIS: 1) Soma dos espectros de absorção óptica das componentes individuais de carotenoides e clorofilas a e b. Linhas vermelhas na Fig 26 (a). 2) Ajuste dos espectros de absorção óptica usando equações gaussianas. 3) A terceira estimativa foi baseada na Razão entre as áreas integradas  $A_{\text{carot}}/A_{\text{v(CN)}}$  obtidas dos espectros Raman.

Tabela4 Atribuições dos modos vibracionais ( $\text{cm}^{-1}$ ) das microalgas CO, CA e NN obtidos por FTIR.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>9</b>
<b>2. Contextualização e Objetivos</b>	<b>13</b>
2.1. Problema	13
2.2. Objetivos	15
2.2.1.    Objetivo Geral	15
2.2.2.    Objetivos específicos	15
2.3. Sobre as propriedades vibracionais das moléculas	16
2.3.1.    Vibrações moleculares	16
2.3.2.    Vibrações em grupo	21
2.4. Considerações sobre a espectroscopia Raman	24
2.4.1.    Espalhamento Raman -Teoria clássica	30
2.4.2.    Sobre a simetria	31
2.4.3.    Elementos de simetria	32
2.4.4.    Regras de seleção	34
2.4.5.    Espectroscopia Raman de Ressonância	38
2.4.6.    Principais Vantagens da espectroscopia Raman	41
2.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	42
2.6. Uma breve comparação entre IR e Raman	45
2.7. UV-VIS	46
2.7.1.    Princípios	49
2.8. As microalgas	50
2.8.1.    Aplicações industriais	52
2.9. Sobre a Análise de Componentes Principais (PCA)	54
2.10. Revisão bibliográfica	57
<b>3. Materiais e métodos</b>	<b>61</b>
3.1. Cultivo das microalgas	61
3.2. Aquisição dos Espectros Raman	62

3.2.1.	Preparação das amostras	62
3.2.2.	Instrumentação	63
3.2.3	Processamento dos dados	63
3.3	Aquisição dos espectros de FTIR	64
3.3.1	Preparação das amostras	64
3.3.2	Instrumentação	64
3.4	Aquisição dos espectros de UV-VIS	65
3.4.1	Preparação das Amostras - Extração de pigmentos em acetona	65
3.4.2	Instrumentação	65
3.5	Método gravimétrico (conteúdo lipídico total)	66
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussões</b>	<b>67</b>
4.1	Espectroscopia Raman	67
4.2	Espectroscopia UV-VIS	74
4.3	Espectroscopia de FTIR	77
<b>5</b>	<b>Conclusões e perspectiva de trabalhos futuros</b>	<b>83</b>
5.1	Conclusões	83
5.2	Perspectiva de trabalhos futuros	84
	Bibliografia	85
	Apêndice A	95

# Capítulo 1

## Introdução

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que contêm clorofila e têm a capacidade de sintetizar grandes quantidades de compostos químicos a partir do dióxido de carbono e da luz solar [1-3]. Podem ser encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos/úmidos incluído rios, lagos, oceanos e solo [4]. Foi estimada a existência de 200.000 a 800.000 espécies, das quais apenas cerca de 35.000 são identificadas. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, dessa forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos. Entre uma grande variedade de compostos, as cinco biomoléculas principais que compõem as células das microalgas são as proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e pigmentos. Algumas dessas biomoléculas são importantes na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e de biocombustíveis. Entre as características mais atrativas encontra-se que as microalgas mostram mudanças na estrutura ou na composição dependendo das condições ambientais. Deste modo, recentes estudos mostram que quando submetidas a estresse por falta de nutrientes, algumas espécies de microalgas aumentam significativamente o conteúdo de lipídeos (até aproximadamente 80% do peso seco das células em algumas espécies) [5-7] e de carotenoides [8]. Apesar do acúmulo significativo dessas biomoléculas, a biomassa de microalgas durante o estresse nutricional é frequentemente reduzida em comparação com as células cultivadas em condições não estressadas. Assim, um dos principais objetivos do campo de pesquisa das

microalgas é, portanto, identificar as cepas e as condições de cultura que proporcionam um alto rendimento em termos de biomoléculas importantes para a indústria.

Evidência disso é que o potencial das microalgas como fonte comercial de pigmentos é amplamente reconhecido e estudado [9,10]. Na indústria, os pigmentos são usados como corantes e aditivos alimentares. Também, pigmentos especiais como os carotenoides têm sido propostos como agentes preventivos e eficazes para o tratamento de uma variedade de doenças humanas. Por exemplo, o  $\beta$ -caroteno, a luteína e a zeaxantina apresentam propriedades de prevenção ao câncer [11-13]. Deste modo, tem-se estimulado a pesquisa para a produção e o uso de carotenoides naturais como os produzidos pelas microalgas.

Por outro lado, na atualidade estão se desenvolvendo pesquisas em lipídeos obtidos de microalgas que têm o grande potencial de mudar o panorama na produção de biocombustíveis. Atualmente, são necessários grandes territórios para o cultivo das plantas oleaginosas, fonte principal da sua matéria prima [14]. A principal desvantagem do uso das plantas oleaginosas é em relação ao uso da terra [15], já que as plantações ocupam grandes extensões de terra que poderiam ser utilizados para outros importantes fins. Além disso, no cultivo de plantas oleaginosas os gastos com água são consideravelmente grandes [16]. Em contrapartida, o cultivo das microalgas não necessita de grandes territórios. Isso se deve aos instrumentos artificiais nas quais são cultivadas. Ditos instrumentos recebem o nome de biorreatores e possibilitam que o cultivo se dê em espaços controlados. Nesse contexto, autores apontam que a produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis é amplamente considerada como uma das alternativas mais sustentáveis e um meio viável de combater o impacto ambiental dos combustíveis fósseis no aquecimento global [17].

Contudo, estudos recentes [18] apontam que para as microalgas serem consideradas como uma verdadeira fonte de matéria-prima para a indústria seria necessário que as mesmas proporcionem altas concentrações de biomoléculas produzidas em ciclos de crescimento curto e em base sustentável. Assim, a produção em larga escala de pigmentos e lipídeos é um desafio a ser superado. Para isso, são necessários estudos detalhados das diferentes espécies de microalgas com relação ao seu conteúdo de biomoléculas, especialmente de lipídeos e pigmentos.

Recentemente, vem se desenvolvendo formas eficazes de quantificar as biomoléculas presentes nas espécies de microalgas. Entre elas, um método usado com frequência faz uso

do corante fluorescente neutro de lipídios, o *Nile Red*, que pode ser usado para criar imagens de acúmulo lipídico neutro dentro das células ou para analisar a biossíntese lipídica por espectroscopia de fluorescência [19,20]. No entanto, os métodos baseados no *Nile red* podem consumir muito tempo, não são quantitativos quanto aos métodos cromatográficos e pode haver variação na eficiência da acumulação do corante em algumas espécies de algas [20].

Uma abordagem alternativa é o uso das microespectroscopias ópticas (Raman, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), absorção UV-VIS). Estes são métodos para análise de organismos inteiros usando células intactas que envolvem a medição da dispersão e absorção de luz [21]. Grupos moleculares específicos podem ser identificados por suas bandas de absorção e emissão, permitindo quantificar as macromoléculas (incluindo proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos).

Particularmente, a espectroscopia Raman é uma poderosa técnica que apresenta características apropriadas na caracterização físico-química de sistemas biológicos, que detecta diretamente vibrações de ligações bioquímicas por meio do espalhamento inelástico de fótons que são emitidos por um laser [22]. O princípio por trás da espectroscopia Raman é o efeito Raman [23]. Quando são irradiadas as moléculas e átomos de algum composto por uma fonte de luz, os fótons podem retornar na forma de dispersão elástica (dispersão Rayleigh) ou inelástica (efeito Raman). No efeito Raman, os fótons emitidos podem retornar com uma frequência mais baixa ou mais alta, dependendo se o estado fundamental final tiver menos energia que o estado inicial ou se o estado final for mais energético que o inicial. No caso dos fótons retornarem menos energéticos, é chamado de espalhamento Stokes, já no caso de voltarem mais energéticos de espalhamento anti-Stokes. Dependendo da quantidade de fótons dispersos, o espectro Raman mostra vários picos que sofrem alterações com as mudanças nas características de uma amostra [1].

Sob outra perspectiva, a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma espectroscopia vibracional molecular que pode caracterizar grupos funcionais químicos em diferentes regiões de absorbância, permitindo a detecção simultânea da abundância relativa de diferentes componentes celulares orgânicos em uma única análise [24]. Os lipídeos, carboidratos e proteínas apresentam absorções características em diferentes frequências do espectro infravermelho médio, fazendo do FTIR uma ferramenta poderosa no monitoramento de composições bioquímicas de microalgas [25]. Também, essa técnica

apresenta vantagens impressionantes devido à alta confiabilidade, sensibilidade e velocidade do procedimento de medição [26]. Além disso, a quantidade de material necessário para a análise pode ser reduzida para um pequeno número de células [27].

Contudo, como geralmente as diferenças espectrais Raman e FTIR das microalgas de distintas espécies são sutis, algoritmos efetivos de processamento de dados são frequentemente necessários para análise e interpretação das informações. Assim, a Análise de Componentes Principais (PCA) é um dos métodos de classificação não supervisionados mais usados na espectroscopia Raman [28] e neste caso úteis na distinção dos espectros Raman e FTIR. Os espectros contêm informações de intensidade obtidas em uma ampla faixa de diferentes números de onda. Cada um desses números de onda pode ser considerado como uma dimensão independente, na qual os dados de Raman são medidos [29]. O PCA reduz a dimensionalidade do conjunto de dados Raman e FTIR original, com a maior parte de sua variação retida nos componentes principais selecionados [28].

Considerando esses aspectos, neste trabalho propomos utilizar a espectroscopia Raman combinada com análise multivariacional e FTIR para caracterizar três espécies de microalgas (*Chlamydomonas sp.* (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceânica* (NN)) e determinar o teor relativo entre carotenoides e clorofila nessas espécies. Além disso, é desenvolvida uma técnica efetiva para caracterizar e quantificar o teor relativo entre lipídeos e proteína nas espécies das microalgas de uma forma relativamente simples comparada com os métodos tradicionais.

# Capítulo 2

## Contextualização e Objetivos

### 2.1. Problema

As microalgas constituem um dos grupos mais diversos de microrganismos aquáticos, com uma estimativa de 800.000 espécies [30] das quais apenas 35.000 são descritas [31]. O estudo extensivo de espécies cultivadas levou ao isolamento e determinação química de mais de 15.000 compostos, incluindo ácidos graxos, esteróis, compostos fenólicos, terpenos, enzimas, polissacarídeos, alcaloides, toxinas e pigmentos [32]. Devido à sua alta biodiversidade e enorme potencial de produtividade, as microalgas representam um recurso interessante a ser explorado, oferecendo grandes possibilidades para o isolamento de compostos de interesse industrial [33,34]. O interesse também reside na sua utilidade como biomassa biotecnológica, pois as microalgas podem ser facilmente cultivadas em condições controladas, manipuladas como microrganismos de laboratório convencionais e geneticamente modificados sem nenhum risco de disseminação.

Para a quantificação de biomoléculas a partir de microalgas, como lipídeos e pigmentos, existem numerosos métodos derivados principalmente de técnicas fitoquímicas desenvolvidas para plantas maiores [31]. As técnicas clássicas de extração de solventes orgânicos; incluindo maceração (imersão), percolação, extração de contra-corrente, extração líquida pressurizada e soxhlet; são tecnologias amplamente descritas para extrair lipídios e pigmentos [31]. Esses processos são reprodutíveis e permitem a extração rápida dos componentes químicos, mas geralmente implicam o uso de grandes quantidades de solventes

e o risco de desnaturação térmica ou transformação de moléculas de interesse [35]. Também, todos esses métodos implicam a extração direta das biomoléculas, o que resulta em perdas consideráveis de tempo e gastos desnecessários de reagentes. Considerando uma produção industrial em massa de microalgas, na qual precisam de controles rápidos e efetivos do cultivo em relação ao teor das biomoléculas, essas metodologias extrativas tradicionais não fornecem opções eficientes para serem aplicadas a cultivos em grandes proporções.

Em contraste, as medições realizadas nas microalgas usando espectroscopia Raman e análise FTIR são reconhecidas pela sua simplicidade na preparação das amostras [36], sendo necessário, em muitas ocasiões, apenas poucos minutos para centrifugar e secar [37]. Cada espectro obtido das microalgas geralmente é obtido em poucos minutos, colocando essas técnicas espectroscópicas como superiores comparadas com as técnicas tradicionais em relação ao tempo e o gasto de reagentes. Também, para o tratamento dos espectros obtidos das microalgas é preciso reconhecer e atribuir as bandas a um modo vibracional característico. Posteriormente, se realiza a associação desses modos com as diferentes estruturas moleculares para determinar a composição específica da amostra.

Por outro lado, dependendo das condições e das espécies, as microalgas produzem diversas biomoléculas em quantidades diferentes. Tendo em vista que para as microalgas serem consideradas competitivas nas diferentes aplicações industriais é necessária uma produção elevada de biomoléculas, de modo que é de fundamental importância a seleção de cepas que sejam boas produtoras. Assim, um dos maiores desafios na produção em massa de microalgas pode ser abordado em termos de identificar e reconhecer as cepas com melhores desempenhos na produção das biomoléculas desejáveis.

De tal modo, este trabalho surge como uma contribuição na identificação de cepas de microalgas com potencial para a produção em grande escala de lipídeos e pigmentos, fornecendo métodos de quantificação de biomoléculas alternativos aos tradicionais. A partir disso surge a pergunta guia da pesquisa:

*“Como caracterizar e quantificar pigmentos e lipídeos nas espécies de algas *Chlorella sorokiana*, *Nannochloropsis oceanica* e *Chlamydomonas* sp?”*

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivo Geral**

Fazer uso de técnicas de espectroscopia óptica para diferenciar e caracterizar a composição bioquímica de três diferentes espécies de microalgas. São elas: (*Chlamydomonas sp.* (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceânica* (NN)).

### **2.2.2. Objetivos específicos**

1. Usar as espectroscopias Raman e de FTIR para comparar e diferenciar três diferentes espécies de microalgas.
2. Quantificar e comparar o teor de carotenoides em três diferentes espécies de microalgas.
3. Quantificar e comparar o teor de lipídeos e carboidratos com relação ao teor de proteína em três diferentes espécies de microalgas.

## 2.3. Sobre as propriedades vibracionais das moléculas

### 2.3.1. Vibrações moleculares

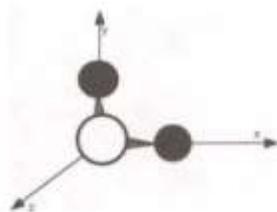
Radiação eletromagnética com comprimentos de onda específicos produzem transições ou movimentos moleculares. Assim, comprimentos onda na região do micro-onda provocam movimentos rotacionais, excitações na região do infravermelho correspondem a movimentos vibracionais e comprimentos no Ultravioleta-Visível causam transições eletrônicas e comprimentos de onda mais energéticos podem induzir movimentos translacionais (Fig.1). No movimento eletrônico, os elétrons alteram os níveis de energia ou as direções de rotação. Para o movimento de translação, a molécula inteira muda para uma nova posição, enquanto que para o movimento de rotação, a molécula gira em torno de seu centro de massa [38]. A energia vibracional é necessária para que átomos individuais dentro de uma molécula mudem de posição em relação um ao outro sem mover ou girar a molécula.

Sem considerar a energia devida aos movimentos translacionais, a energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional<sup>1</sup>, sendo cada uma mais energética que a outra respectivamente [39]. Para descrever analiticamente a energia de uma molécula são necessários seis 'graus de liberdade' desde que não haja alguma mudança na energia eletrônica (absorção de um fóton ou uma promoção de um elétron para um estado eletrônico excitado). Desses graus de liberdade, três são usados para descrever a translação da molécula no espaço e os outros três para descrever o movimento de rotação, exceto para as moléculas lineares onde unicamente são possíveis dois tipos de rotação [39,40]. Deste modo, se  $N$  é o número de átomos numa molécula, o número de vibrações possíveis é  $3N-6$  para todas as moléculas, exceto as lineares onde é  $3N-5$ . Para uma molécula diatômica, isso significa que só tem uma vibração (alongamento da ligação).

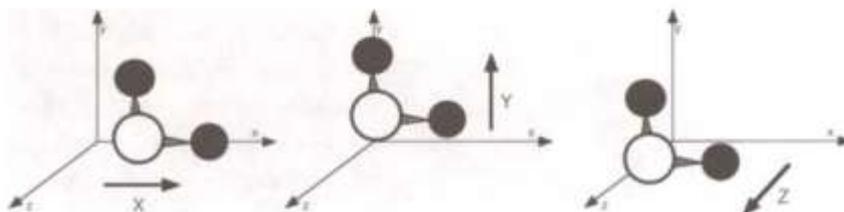
---

<sup>1</sup> Para moléculas em fase gasosa

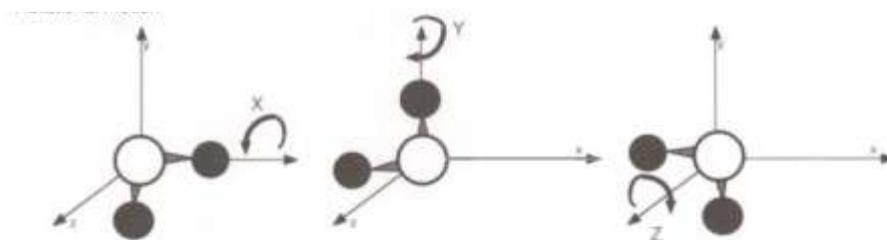
Estado fundamental



Movimento translacional



Movimento rotacional



Movimento vibracional

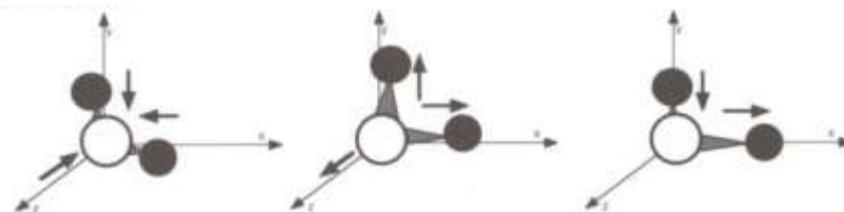


Fig. 1: Estado base de uma molécula e possíveis transições ou movimentos moleculares. Fonte: adaptada de [38]

Para moléculas poliatômicas, os movimentos de vibração podem ser decompostos em oscilações nas quais os átomos se movimentam em fase e são chamadas de modos normais de vibração. Cada modo normal tem uma frequência característica. Por exemplo, uma molécula tri-atômica tem três modos de vibração: tensão simétrica<sup>2</sup> (Symietrical strech), flexão (bending ou deformation mode) e tensão assimétrica (asymetrical strech). As

---

<sup>2</sup> Normalmente, o número de vibrações da tensão coincide com o número de ligações. A simetria de um modo normal de vibração é o de uma representação irredutível

moléculas de água  $H_2O$  e dióxido de carbono  $CO_2$  são um claro exemplo desse tipo. Na Fig.2 são mostrados os modos puros de vibração dessas moléculas, nas quais não há translação do centro de gravidade da molécula devido ao deslocamento do carbono e do oxigênio que se compensam entre eles. Nesses diagramas é usado o modelo de "massa-mola". A mola representa a ligação ou ligações entre os átomos. Quanto mais forte a ligação, maior a frequência. As massas representam os átomos e, quanto mais pesadas, menor a frequência. A expressão que relaciona a massa dos átomos e a força de ligação à frequência vibracional é a lei de Hooke, por enquanto, é suficiente pensar que ligações fortes e átomos leves fornecerão frequências mais altas de vibração e átomos pesados e ligações fracas darão as mais baixas [40]

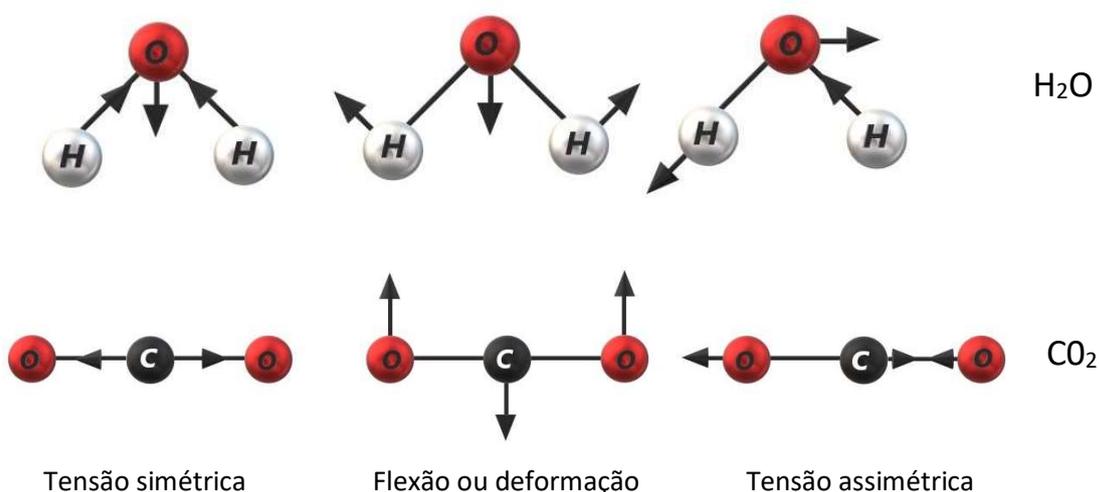


Fig. 2: Modelo de representação atômica mola-bola dos três modos de vibração do  $H_2O$  e do  $CO_2$ . Fonte: Adaptada de [40]

Entretanto, deve-se ressaltar que somente as tensões e flexões não tornam as vibrações Raman ou infravermelho ativas e, em geral, não seria esperado observar todas as vibrações em qualquer espectroscopia. Para que o modo normal de uma vibração de uma molécula se encontre presente no seu espectro Raman (seja ativo) deve haver uma variação na polarizabilidade da molécula durante a vibração. Nas moléculas triatômicas a tensão simétrica pode causar grandes alterações de polarização e, portanto, forte dispersão Raman com alteração fraca ou inexistente de dipolo e, assim, fraca ou nenhuma absorção no

infravermelho [40]. O modo de deformação ou flexão pode causar uma mudança de dipolo, mas pouca mudança de polarização, o que acaba gerando uma forte absorção de infravermelho e uma dispersão Raman fraca ou inexistente. Na Fig. 3 é mostrada uma representação da nuvem de elétrons para o dióxido de carbono. Se qualquer uma das moléculas vibra, a nuvem de elétrons muda conforme os núcleos positivos alteram de posição e, dependendo da natureza da mudança, isso pode causar uma variação no momento dipolar ou na polarização [40]

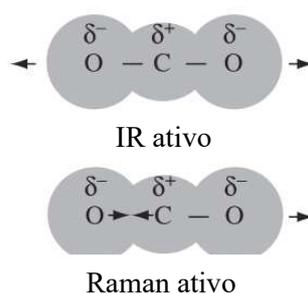


Fig. 3: modelo de nuvem de elétrons da molécula de dióxido de carbono evidenciando as vibrações ativas de IR e Raman. Fonte: adaptada de [40]

Para exemplificar as vibrações ativas em IR e Raman, na Fig. 4 é mostrada as possíveis vibrações para o disulfeto de carbono, juntamente com os correspondentes espectros de absorção no infravermelho e espalhamento Raman. Também, são mostradas as possíveis variações da polarizabilidade  $\alpha$  e do momento do dipolo  $\mu$ . Deste modo, é possível enunciar que para haver atividade no infravermelho é necessário que  $\frac{\partial \mu}{\partial Q} \neq 0$ , na qual Q representa a coordenada normal. Essa equação, explicitamente, significa que ao redor da posição de equilíbrio deve haver variação no momento de dipolo produzida pela vibração. Por outro lado, no Raman a atividade está relacionada com a variação do momento de dipolo induzido, ou da polarizabilidade, provocada pela vibração. Para que um modo normal Q seja Raman ativo é necessário que  $\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0$ , como mostrado na figura 4. Cabe destacar que a polarizabilidade pode ser representada por um elipsoide (elipsoide de polarizabilidade). Assim, quando uma ligação distende, aumenta-se a distância internuclear. Isso facilita a formação de um dipolo induzido e, como consequência, acarreta no aumento da polarizabilidade e, por conseguinte, na diminuição do elipsoide. Quando a ligação contrai o elipsoide se amplia (fig. 4).

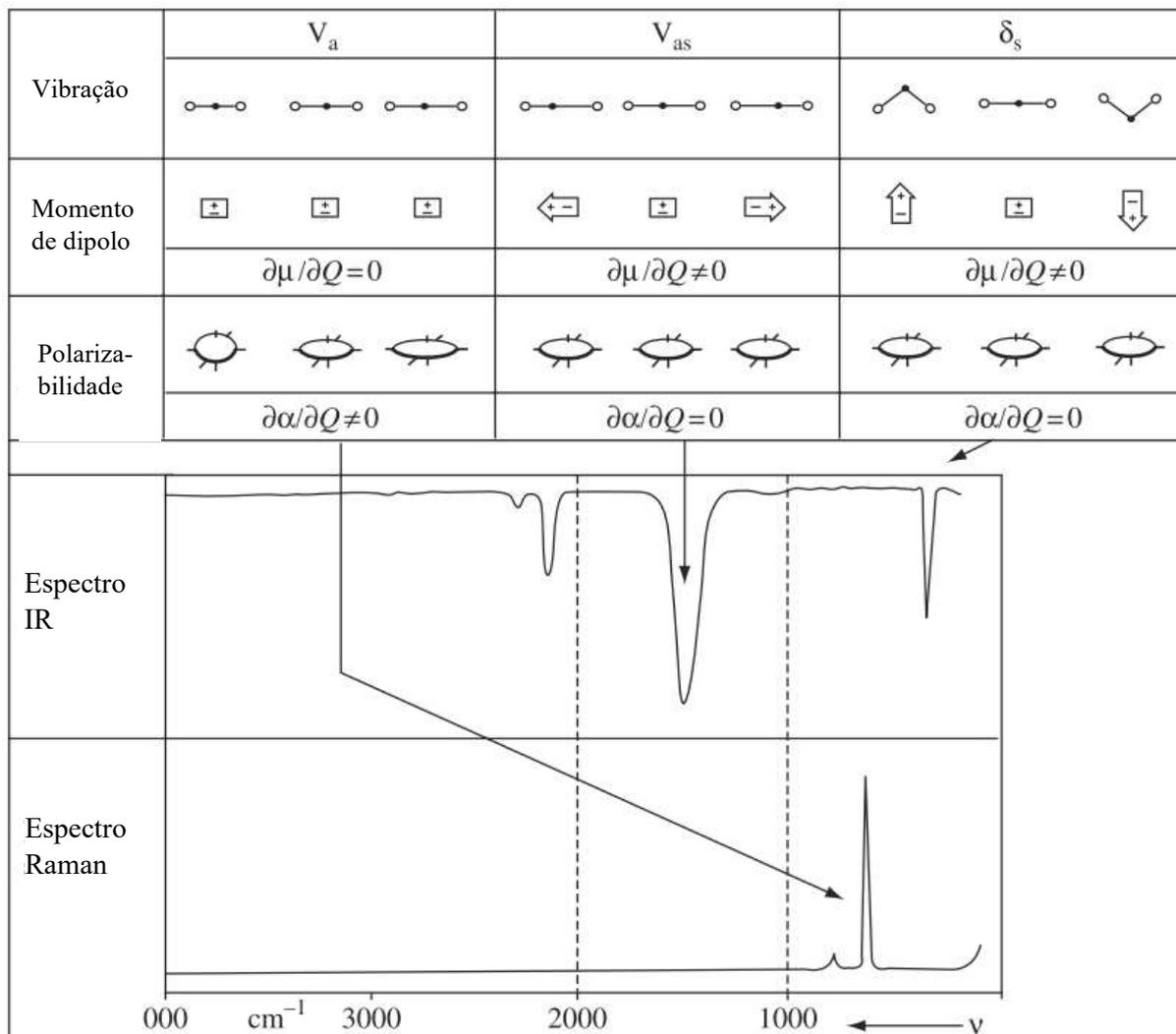


Fig. 4: Alterações de dipolo e polarização no dissulfeto de carbono juntamente com seus espectros de infravermelho e Raman. Fonte: adaptada de [40]

Ao procurar as vibrações ativas nos espectros reais espera-se corresponder um pico característico à vibração. Isso é chamado de atribuição da vibração. Assim, é possível descrever uma vibração em poucas palavras úteis. Em alguns casos, isso é bastante preciso, mas em outros, a descrição não é adequada para descrever o movimento real [40]. No entanto, bandas comuns podem ser atribuídas e descritas razoavelmente para muitas moléculas.

### 2.3.2. Vibrações em grupo

Um dos princípios para atribuir as vibrações a picos espectrais está relacionado com o fato de que duas ou mais ligações próximas, e com energias semelhantes, podem interagir. É, justamente, a vibração do grupo de átomos ligados por essas ligações que se observa em um espectro [40]. Por exemplo, o grupo  $CH_2$  possui um estiramento simétrico e antissimétrico, em vez de dois estiramentos separados de  $CH$ . Determina-se disso e da geometria da molécula que diferentes tipos de vibrações são possíveis para diferentes grupos moleculares [40]. Na Fig. 5, são indicadas algumas das vibrações para a molécula de  $CH_3$ . Primeiramente, as moléculas são evidenciadas na posição de equilíbrio com setas mostrando a direção do deslocamento vibracional e, para ilustrar o significado desse deslocamento, são indicadas nos extremos do movimento vibracional.

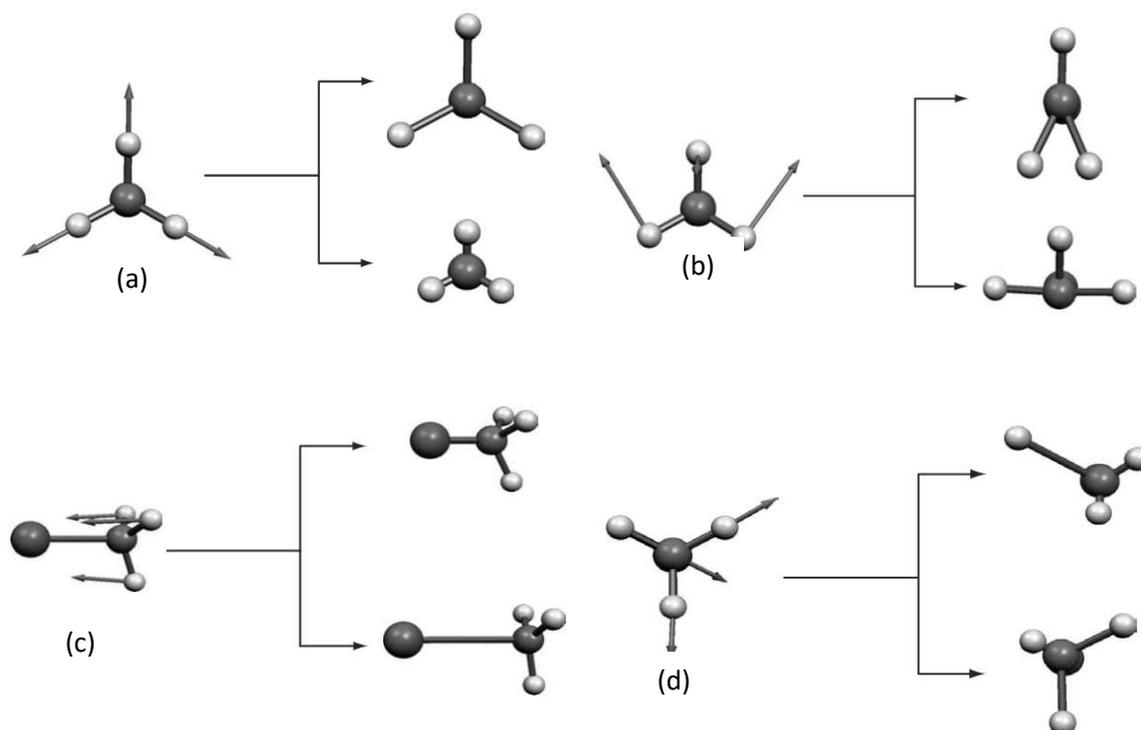


Fig. 5. Diagramas de deslocamento selecionados para  $CH_3$  em  $CH_3Br$ . (a) O estiramento simétrico de  $CH_3$  em  $CH_3Br$  acima de  $3000\text{cm}^{-1}$ . (b) Estiramento assimétrico acima de  $3000\text{cm}^{-1}$ . (c) Uma curvatura de  $CH$  perto de  $1450\text{-}1500\text{cm}^{-1}$ . (d) um modo de baixa frequência abaixo de  $600\text{cm}^{-1}$ . Fonte: [40]

Por outro lado, as vibrações podem ser tratadas separadamente se há uma grande diferença de energia entre as vibrações em diferentes ligações ou se os átomos estão bem separados na molécula. Assim, para  $CH_3Br$ , as ligações  $C - H$  em  $CH_3$  devem ser tratadas como um grupo, mas a vibração  $C - Br$  é tratada separadamente. Assim como evidenciado na Fig. 5, para as vibrações do grupo  $CH_3$  selecionadas, a molécula é completada usando o bromo. Conforme dito, a ligação  $C - Br$  vibra a uma frequência muito mais baixa e não interage consideravelmente com os altos deslocamentos de  $CH_3$  mostrados.

Para uma descrição mais detalhada das vibrações, é necessário estudar os fatores que as descrevem. Segundo o modelo clássico, os núcleos atômicos são considerados massas pontuais e as ligações químicas com massa desprezível. Assim, supondo o comportamento de um oscilador harmônico para uma molécula diatômica, onde  $F(x) = -kx$ , a frequência é dada por

$$\omega = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

onde  $k$  é a constante de força e  $\mu$  é a massa reduzida dos átomos. Por outro lado, a energia de vibração quantizada é dada através de

$$E_v = \hbar\omega \left( v + \frac{1}{2} \right)$$

onde  $\omega$  é o valor clássico da frequência do oscilador em  $\text{cm}^{-1}$ <sup>3</sup> e o número quântico é da forma  $v = 0, 1, 2, \dots$ . Uma vibração fundamental, também chamada vibração de primeira ordem, corresponde a uma mudança do estado fundamental molecular para o primeiro nível de energia. Com tudo, resulta importante conhecer os possíveis estados eletrônicos fundamentais.

Na Fig. 6, são mostrados os esboços de um estado eletrônico fundamental típico de uma molécula. O eixo  $y$  representa a energia do sistema e o eixo  $x$  a separação internuclear. A linha curva representa o estado eletrônico. Numa vibração harmônica clássica, os níveis de energia estão igualmente espaçados. Mas, na representação quântica de uma ligação química os níveis de energia não estão igualmente espaçados (Fig. 6). Em grandes separações

---

<sup>3</sup> Na espectroscopia vibracional costuma-se a representar a frequência com  $\text{cm}^{-1}$ , embora o número de onda seja representado com a mesma unidade.

internucleares, os átomos são essencialmente livres e, à medida que a distância diminui, eles são atraídos um pelo outro para formar uma ligação [40]. Se eles se aproximarem muito, as forças nucleares causam repulsão e a energia da molécula aumenta acentuadamente, como representado. Assim, a energia mais baixa está no comprimento da ligação. No entanto, nem toda energia é possível dentro da curva, pois as moléculas estarão vibrando e as energias vibracionais que são quantizadas devem ser consideradas [40]. As linhas de ligação são os estados vibracionais quantizados. Um nível vibratório específico de um estado eletrônico específico é frequentemente chamado de nível vibrônico.

A curva da Fig. 6, denominada curva de Morse, refere-se a uma vibração, aparentemente simples, mas existem apreciações que geralmente não são adicionadas para deixar o diagrama compreensível [40]. O primeiro nível ( $v = 0$ ) é o estado fundamental em que a molécula não está vibrando e o segundo nível ( $v = 1$ ) é o estado em que um quantum da energia exata é absorvido e a molécula vibra. Os níveis acima disso exigem energias aproximadas, mas não exatamente duas vezes, três vezes, quatro vezes, etc., dos quanta necessários para mover a molécula do estado fundamental 0 para o primeiro estado excitado 1 [40]. Quando uma mudança de mais de um quantum ocorre, o pico obtido é chamado de “overtone”. Em Raman, a dispersão ocorre apenas em circunstâncias especiais. Na maioria dos “overtones” de espectros Raman são previstos como muito fracos ou inexistentes. Para descrever todas as vibrações em uma molécula, um conjunto semelhante de linhas de ligação, mas com energias diferentes é necessário para cada vibração.

A principal diferença entre o modelo quântico e o clássico está relacionada ao estado de mais baixa energia e à distância internuclear [39]. A energia vibracional do ponto zero no modelo quântico é  $\frac{1}{2}h\nu$ , em contraste, classicamente o mínimo do poço de potencial é zero.

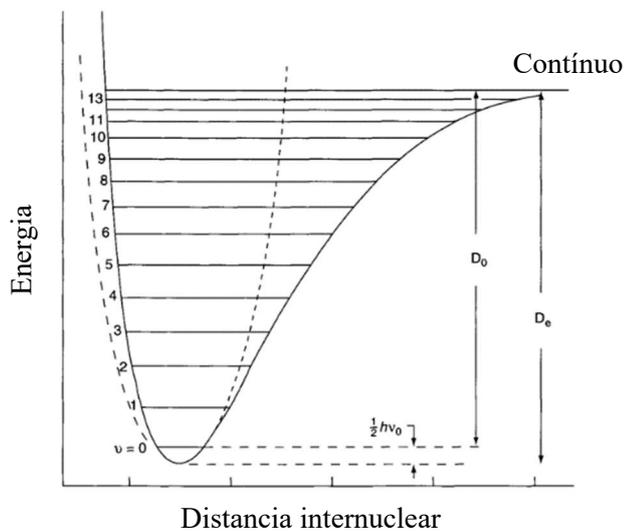


Fig. 6: Curva de energia potencial para uma molécula diatômica. A linha sólida indica um potencial Morse que se aproxima do potencial real. A linha quebrada é o potencial da oscilação harmônica.  $D_e$  e  $D_0$  são as energias de dissociação teórica e espectroscópica, respectivamente. Fonte: adaptada de [40]

## 2.4. Considerações sobre a espectroscopia Raman

O estudo da interação entre a luz e a matéria chama-se espectroscopia. Entre o amplo estudo dessa disciplina, destaca-se a espectroscopia Raman como uma técnica frequentemente usada para analisar as vibrações moleculares e prover informação sobre as estruturas químicas e bioquímicas. Como os níveis vibracionais de uma molécula particular dependem intimamente da sua estrutura, ou seja, da natureza dos seus átomos constituintes, das ligações entre estes átomos e de sua simetria molecular; a espectroscopia Raman pode ser usada como um método analítico para determinar a estrutura química das moléculas, assim como a conformação das interações intermoleculares nas que estão envolvidos [39]. Também, por meio dos padrões espectrais característicos ou “*fingerprinting*” obtidos nos espectros, é possível determinar quantitativa ou semi-quantitativamente a abundância de alguma substância em uma amostra [40]. Dita substância pode estar em diferentes condições como quente ou fria; em estado sólido líquido ou vapor; incluso em diferentes escalas como é o caso das partículas microscópicas, etc. Diferentemente da espectroscopia IR, na espectroscopia Raman é estudada a luz dispersada ao invés da absorvida. Uma molécula

pode absorver um fóton se a energia deste coincide com uma diferença entre níveis quânticos. Mas a colisão entre o fóton e a molécula também pode dispersar o fóton, independentemente da energia deste, como no caso da espectroscopia Raman, na qual se estuda os fótons que colidem com as moléculas de uma amostra.

Quando é incidido um feixe de luz monocromática sobre uma amostra, os fótons podem interagir com as moléculas de diferentes formas. Assim, quando a energia do fóton incidente coincide com o nível de energia entre o estado base da molécula e um estado excitado, o fóton pode ser absorvido e a molécula promovida para um nível de energia mais excitado. Agora, considere os tamanhos relativos de uma onda de luz e de uma molécula. Na região visível, o comprimento de onda da luz está entre 400 e 700 nm, enquanto o tamanho de uma molécula pequena de ácido oleico, por exemplo, está entre 0,7- 1,97 nm [41], por tanto, o comprimento de onda é muito maior que a molécula. Deste modo, uma possível interação dos fótons incidentes é atravessar as moléculas da amostra e não ocorrer nenhuma troca de energia. Por outro lado, se os fótons que interagem com as moléculas são dispersados, é possível obter dois possíveis desfechos para esses fótons (tudo de acordo o princípio da conservação da energia):

- Uma fração dos fótons interage elasticamente com as moléculas da amostra. Assim, a energia presente nos fótons é “absorvida” pela molécula. Essa interação pode ser considerada como a formação de um 'complexo' de vida muito curta entre a energia da radiação e os elétrons na molécula na qual os núcleos não têm tempo para se mover de forma apreciável. Isso resulta em uma forma de alta energia da molécula com uma geometria eletrônica diferente, mas sem nenhum grande movimento nuclear. Este 'complexo' entre a radiação e a molécula, frequentemente chamado de estado virtual da molécula, não é estável e a luz é liberada imediatamente como radiação dispersa. Deste modo, quando envolvida apenas a distorção da nuvem de elétrons na dispersão, os fótons serão dispersos sem mudanças de frequência, pois os elétrons são leves quando comparados com os núcleos [40]. Esse processo de dispersão é considerado como dispersão elástica e é o processo dominante. Para moléculas, é chamado espalhamento de Rayleigh  $h\nu_0 = \hbar\nu_0$  (fig. 7).
- Se for induzido o movimento nuclear durante o processo de interação fóton-molécula, a energia será transferida do fóton incidente para a molécula ou da molécula para o fóton

espalhado. Nestes casos, o processo é inelástico e a energia do fóton disperso é diferente da energia do fóton incidente por uma unidade vibracional, isso é chamado espalhamento Raman [23]. É inerentemente um processo fraco, pois apenas um de cada  $10^6$  a  $10^8$  fótons espalhados é disperso por Raman, o que não torna fracas as medidas porque com lasers e microscópios modernos, densidades de energia muito altas podem ser incididas sobre áreas pequenas[40]. Essa dispersão inelástica pode ser de dois tipos:

- i. A maioria das moléculas a temperatura ambiente está no seu estado fundamental. Como pode se observar na Fig.7, o processo de espalhamento Raman do estado vibracional do estado fundamental ( $m$ ), leva à absorção de energia pela molécula e sua promoção a um estado vibracional excitado para uma energia mais alta ( $n$ ). Assim, o fóton incidente de energia  $h\nu_0$  é absorvido, elevando o sistema para um estado virtual. É neste momento que se dispersa um fóton com energia  $h\nu_s < h\nu_0$ . A diferença de energia total do sistema  $-h\nu_m$ , dada por  $(h\nu_0 - h\nu_m = h\nu_s)$ , é utilizada para excitar uma molécula levando-a para um estado vibracional de maior energia como se mostra na Fig. 7. Este fenômeno é conhecido como espalhamento Raman Stokes.
- ii. Devido à energia térmica, algumas moléculas podem estar presentes em um estado excitado. Assim, após absorver o fóton incidente de energia  $h\nu_0$ , a molécula emite um fóton de energia  $h\nu_s > h\nu_0$ , havendo transferência de energia para o fóton disperso. Para conservar a energia total do sistema, a diferença de energia  $+h\nu_m$ , dada por  $(h\nu_0 + h\nu_m = h\nu_s)$ , indica que parte da energia vibracional da molécula se torna energia emitida, como se vê na Fig. 7. Este fenômeno é conhecido como espalhamento Raman anti-Stokes.

As intensidades relativas dos dois processos (Stokes e anti-Stokes) dependem da população dos vários estados da molécula. As populações podem ser calculadas segundo a lei de distribuição de energias de Maxwell-Boltzmann, na qual, na temperatura ambiente, 99% das moléculas estão no estado vibracional de menor energia [40]. Assim, em comparação com a dispersão de Stokes, a dispersão anti-Stokes é fraca e se tornará mais fraca à medida que a frequência da vibração aumenta, devido à diminuição da população dos estados vibracionais excitados. Além disso, a dispersão anti-Stokes aumentará em relação a

dispersão Stokes à medida que a temperatura sobe. Geralmente, a temperatura ambiente, se trabalha medindo apenas o efeito Stokes [40], assim como é implementado neste trabalho.

Quando há mais de uma vibração que fornece espalhamento Raman efetivo (Raman ativo), existe uma regra básica de seleção necessária para entender esse padrão. A dispersão intensa Raman ocorre a partir de vibrações que causam uma mudança na polarizabilidade da nuvem de elétrons ao redor da molécula. Geralmente, vibrações simétricas causam as maiores mudanças e dão a maior dispersão. Isso contrasta com a absorção por infravermelho, na qual a absorção mais intensa é causada por uma alteração no dipolo e, portanto, as vibrações assimétricas que as causam são as mais acentuadas [40]. Em alguns casos, as vibrações de uma molécula podem ser tanto ativas infravermelho quanto no Raman, mas as duas técnicas geralmente fornecem padrões de intensidade bastante diferentes. Como resultado, os dois são frequentemente complementares e, usados juntos, dão uma melhor visão da estrutura vibracional de uma molécula [40].

Deste modo, no total, as mudanças de energia que são detectadas na espectroscopia vibracional são aquelas necessárias para causar movimento nuclear. Essas mudanças são mostradas esquematicamente na Fig.7, na qual se tem os processos que ocorrem numa vibração. É importante ressaltar que no processo inelástico, como os estados virtuais não são estados reais da molécula, e sim criados quando o laser interage com os elétrons e causa polarização, a energia desses estados é determinada pela frequência de radiação usada.

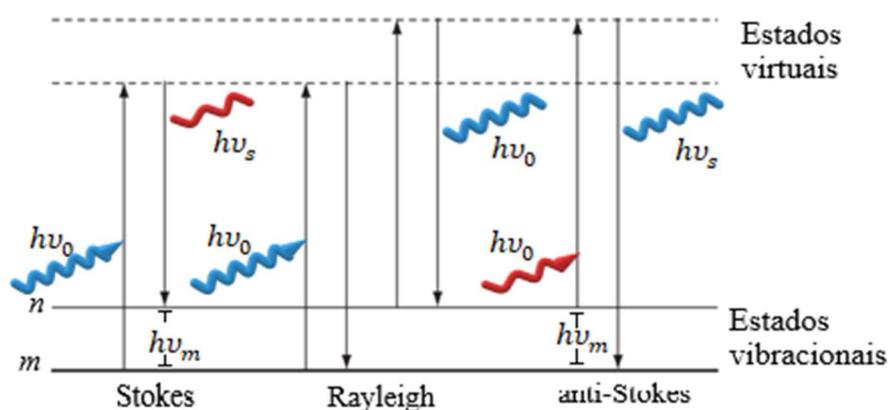


Fig. 7: Diagrama representando os processos de espalhamento Rayleigh e Raman. O estado vibracional de energia mais baixa  $m$  é evidenciado na parte inferior, com estados de energia crescente acima dele. Tanto a energia incidente (setas para cima) quanto à energia dispersada (setas para baixo) têm energias muito maiores que a energia de uma vibração. Fonte: adaptada de [40].

As possíveis vibrações moleculares podem ser observadas mediante representações gráficas chamadas espectros Raman, neles são representadas as intensidades da luz dispersada (em unidades arbitrárias u. a. (eixo y)) para cada energia ou frequência (eixo x) da luz. Essa frequência é mostrada comumente como comprimento de onda com unidades de  $\text{cm}^{-1}$ <sup>4</sup>. Usualmente, na dispersão Raman é apresentada apenas o espectro de Stokes e é dada como uma mudança da energia com relação a energia do feixe de laser. Isso é obtido subtraindo a energia dispersa da energia do laser. Deste modo, obtém-se a diferença de energia correspondente entre o estado fundamental e os estados vibracionais excitados ( $n$  e  $m$  na Fig. 7). A dispersão é medida como a luz detectada pelo detector e a quantidade máxima de luz detectada é o ponto mais alto do traço (maior a dispersão) [40].

Embora diferentes faixas de energia sejam possíveis, as informações de interesse na maioria das ocasiões estão na faixa de  $100\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  na espectroscopia no infravermelho e na espectroscopia Raman, uma vez que isso inclui a maioria dos modos característicos de uma molécula [40]. Uma vantagem específica da dispersão Raman é que desvios da linha de laser de  $50\text{ cm}^{-1}$  ou menos podem ser facilmente gravados com o equipamento correto [40]. Muitas máquinas modernas, por razões de custo e simplicidade, não estão configuradas de maneira adequada para medir mudanças abaixo de  $100\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , porém não medem o efeito anti-Stokes [40]. As intensidades das bandas no espectro Raman dependem da natureza da vibração, dos fatores de instrumentação e da amostragem, que tem um grande efeito sobre as intensidades absolutas, as larguras de banda observadas e as posições da banda.

Para obter informação por meio das bandas dos espectros Raman é preciso considerar a disposição molecular nas amostras que estão medindo. Deste modo, para um cristal com uma disposição regular de átomos idênticos, todos na mesma configuração (como os átomos de carbono no diamante), é frequente achar uma banda dominante porque tem-se uma distribuição simétrica característica dos átomos do cristal propriamente dito (Fig. 8(a)). Por outro lado, amostras com disposições moleculares diferentes e ligações de outro tipo podem apresentar padrões de bandas diferentes nos espectros. Por exemplo, o espectro Raman do poliestireno é mais complexo, em termos da quantidade e forma das bandas, uma vez que a

---

<sup>4</sup> Estritamente falando, a dispersão Raman deve ser expressa como uma mudança de energia em relação à radiação excitante e deve ser referida como  $\text{cm}^{-1}$ , mas geralmente é expresso simplesmente como  $\text{cm}^{-1}$ .

molécula é menos simétrica, além do fato que tem uma combinação de átomos de hidrogênio e de carbono em certa disposição e diferentes tipos de ligações que conectam os átomos (Fig. 8 (b)) [42].

Por meio dos espectros também é possível determinar vibrações de alta e baixa frequência a partir das bandas que representam ligações características. É claro que as frequências de vibração dependem das massas dos átomos e das forças das ligações moleculares. Deste modo, átomos pesados e ligações fracas apresentam altas intensidades Raman e átomos leves e ligações fortes apresentam baixas intensidades. Contudo, no espectro do poliestireno (Fig. 8 (b)) pode se observar vibrações de alta frequência devido a ligação carbono-hidrogênio (C-H), em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$ . Também, se evidenciam vibrações de baixa frequência devido a ligação carbono-carbono C-C, em torno de  $800\text{ cm}^{-1}$ . Percebe-se então que as vibrações da ligação C-H têm uma frequência maior do que as vibrações de C-C devido ao fato de que o hidrogênio é mais leve que o carbono [42]. Também, se pode observar uma banda intensa na região dos  $1600\text{ cm}^{-1}$ , essa vibração é característica dos átomos de carbono com ligações duplas (C=C). Evidentemente, essa ligação dupla é mais forte que a ligação C-C na região dos  $800\text{ cm}^{-1}$  e, portanto, apresenta uma maior intensidade no espectro.

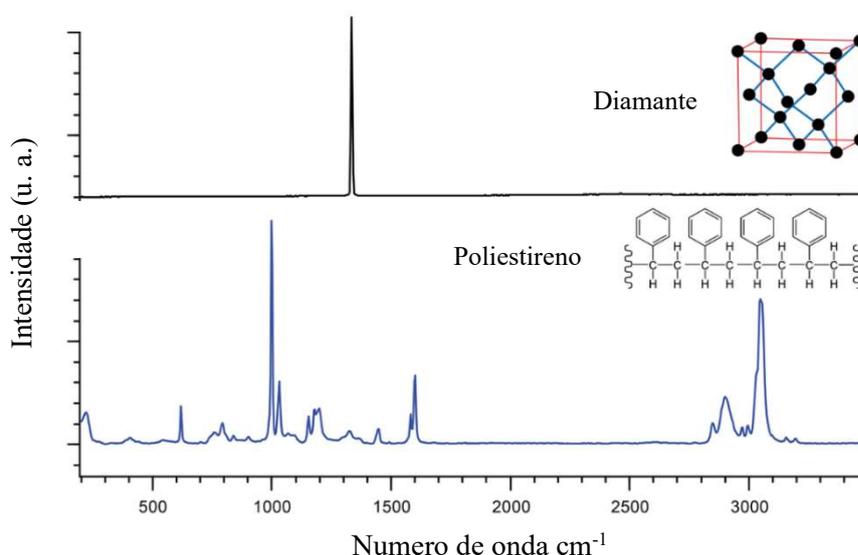


Fig. 8: Espectros de duas amostras com arranjos moleculares diferentes. (a) Espectro do diamante com uma única banda característica devida à sua estrutura cristalina. (b) Espectro do poliestireno com disposições moleculares menos simétricas e, portanto, varia o número de bandas em termos de sua quantidade e forma. Fonte: adaptada de [42]

As vibrações de uma molécula complexa podem ser consideradas como consequência, em parte, de muitas vibrações diatômicas simples. No entanto, toda a riqueza do espectro Raman só pode ser entendida considerando as vibrações dos maiores grupos de átomos (como vibracional de expansão e contração do anel de carbono aromático, que aparece a  $1000\text{ cm}^{-1}$  no poliestireno) [42].

Um espectro Raman, portanto, é formado por uma série de bandas características, cada uma associada a um modo vibracional. O espectro é único para cada material e permite na maioria dos casos sua identificação. É importante notar que, embora seja interessante entender completamente os modos vibracionais, algumas vezes não é necessário, pois é possível usar um banco de dados de referência para realizar essa identificação [42].

#### 2.4.1. Espalhamento Raman -Teoria clássica

Segundo a teoria eletromagnética clássica, a intensidade do campo elétrico de uma onda eletromagnética oscilante no tempo é descrita por [43]:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1)$$

Na qual  $E_0$  é a amplitude e  $\nu_0$  a frequência do Laser. Quando se irradia uma molécula diatômica por um feixe de luz monocromática, um momento dipolar elétrico  $P$  é induzido:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2)$$

onde  $\alpha$  é uma constante de proporcionalidade, chamada polarizabilidade, sendo uma grandeza que relaciona a suscetibilidade da molécula ao campo aplicado. Se a molécula está vibrando a uma frequência  $\nu_m$ , o seu deslocamento  $q$  é descrito por:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t) \quad (3)$$

onde  $q_0$  é a amplitude de vibração. Para uma pequena amplitude de vibração,  $\alpha$  é uma função linear de  $q$ . Deste modo, pode-se expandir na série de Taylor de modo que:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 + \dots \quad (4)$$

Na qual  $\alpha_0$  é a polarizabilidade na posição de equilíbrio, e  $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$  é a variação de  $\alpha$  com relação à variação de  $q_0$ , avaliada na posição equilíbrio.

Substituindo na equação (2), obtemos:

$$P = \alpha E_0 \cos \cos (2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q E_0 \cos (2\pi\nu_0 t) \quad (5)$$

Combinando a equação obtida com a equação (3), obtemos.

$$P = \alpha E_0 \cos \cos (2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 \cos (2\pi\nu_0 t) \cos (2\pi\nu_m t) \quad (6)$$

$$P = \alpha E_0 \cos \cos (2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 [\cos \cos \{2\pi(\nu_0 + \nu_m)t\} + \cos \{2\pi(\nu_0 - \nu_m)t\}] \quad (7)$$

Deste modo, em concordância com a teoria eletromagnética clássica, o primeiro termo representa um dipolo oscilante que irradia luz com frequência  $\nu_0$  (espalhamento Rayleigh), enquanto que o segundo termo corresponde ao espalhamento Raman com frequência  $\nu_0 + \nu_m$  (anti-Stokes) e  $\nu_0 - \nu_m$  (Stokes). Se  $\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0$  é igual a zero, não há vibração Raman-ativa, visto que a taxa de mudança de polarizabilidade ( $\alpha$ ) com a vibração não deve ser nula. Essa análise é válida para uma dimensão, para três dimensões é um tensor, ou uma matriz quadrada de ordem três, no espalhamento Raman normal esta matriz é simétrica [43].

Uma descrição mais aprofundada do efeito Raman, usando um tratamento quântico é apresentado no Apêndice A.

#### 2.4.2. Sobre a simetria

O conceito de simetria nas moléculas é amplamente usado e aplicado para resolver problemas estruturais em diferentes linhas de pesquisa como na Espectroscopia Raman, Infravermelho, NMR, medidas magnéticas e métodos de difração. Em síntese, a simetria pode ser definida como exposta por Hermann Weyl “Uma coisa é simétrica se há algo que você pode fazer a ele para que depois de ter terminado ele, parece a mesma coisa de

antes”[44]. Um círculo, por exemplo, pode ser rodado por qualquer ângulo e tem a mesma aparência. A propósito das moléculas, a simetria refere-se à correspondência de elementos em lados opostos de um ponto, linha ou plano, que é chamado de centro, eixo ou plano de simetria (elementos de simetria). Considerando um cristal, o número de maneiras pelas quais os elementos de simetria podem ser combinados são agrupados em 32 conjuntos, denominados de grupos pontuais. Teoricamente, pode existir um número infinito de grupos de pontos, uma vez que não há restrições na ordem dos eixos rotacionais de uma molécula isolada. No entanto, no sentido prático, poucas moléculas possuem eixos rotacionais  $C_n$  onde  $n > 6$ . Cada grupo de pontos possui uma tabela de caracteres. A derivação das regras de seleção para uma molécula isolada é feita com essas considerações. Se elementos de simetria são combinados com translações, obtêm-se operações ou elementos de simetria que podem definir a simetria do espaço como em um cristal [43]. Existem sete elementos de simetria espacial, os quais são obtidos a partir de dois elementos de simetria, o eixo do parafuso (rotação seguida por uma translação) e o plano de deslizamento (reflexão seguida por uma translação), quando adicionados aos elementos de simetria do grupo de cinco pontos [43]. Este conjunto final de elementos de simetria permite determinar regras de seleção para o estado sólido. A derivação de regras de seleção para uma molécula em particular ilustra a natureza complementar dos espectros de infravermelho e Raman e a aplicação da teoria de grupos à determinação da estrutura molecular [43].

### 2.4.3. Elementos de simetria

A disposição espacial dos átomos em uma molécula é chamada de configuração ou estrutura de equilíbrio. Essa configuração é invariável em um determinado conjunto de operações geométricas chamado grupo [43]. As moléculas são orientadas em um sistema de coordenadas (frequentemente cartesianas). Se, ao realizar uma determinada operação geométrica na configuração original, a molécula for transformada em outra configuração que é sobreposta ou indistinguível da original (embora sua orientação possa ser alterada), diz-se que a molécula contém um elemento de simetria [43]. Em geral, as moléculas são classificadas considerando seus elementos de simetria, entre os quais se destaca.

- Identidade: O elemento de simetria que transforma a configuração de equilíbrio original em outro sobreposto no original sem mudança de orientação, de maneira que

cada átomo entre si é chamado identidade e é denotado por E ou I. Na prática, essa operação significa deixar a molécula inalterada.

- Rotações  $C_n$ : Se uma molécula é girada em torno de algum dos seus eixos para uma nova configuração que é indistinguível da original, entende-se que a molécula possui um eixo de simetria rotacional. A rotação pode ser no sentido horário ou anti-horário, dependendo da molécula. Por exemplo, a mesma configuração é obtida para a molécula de água, girando-a no sentido horário ou anti-horário. No entanto, para a molécula de amônia, diferentes configurações são obtidas, dependendo da direção em que a rotação é realizada [43]. O ângulo de rotação pode ser  $360^\circ/n$ . A ordem do eixo rotacional é chamada n ou p, e  $C_n$  denota a rotação. As moléculas lineares têm eixos infinitos de simetria ( $C_{inf}$ )[43].
- Planos de simetria  $\sigma$ : Se um plano divide a configuração do equilíbrio de uma molécula em duas partes que são um o reflexo da outra, então o plano é chamado de plano de simetria. Se uma molécula tiver dois desses planos que se cruzam em uma linha, e essa linha for um eixo de rotação, deduz-se que a molécula tem um eixo de rotação vertical C e os dois planos são referidos como planos verticais de simetria ( $\sigma_v$ ) [43]. Outro caso envolvendo dois planos de simetria e sua interseção surge quando uma molécula tem mais de um eixo de simetria. Por exemplo, os planos que se cruzam em três eixos perpendiculares entre eles são chamados de diagonal ( $\sigma_d$ ). A Fig. 9 (a) – (c) ilustra os elementos de simetria da molécula planar  $AB_4$  (por exemplo, íon  $PtCl_4^{2-}$ ) [43]. Se um plano de simetria é perpendicular ao eixo rotacional principal, é chamado horizontal e é denotado por  $\sigma_h$ .

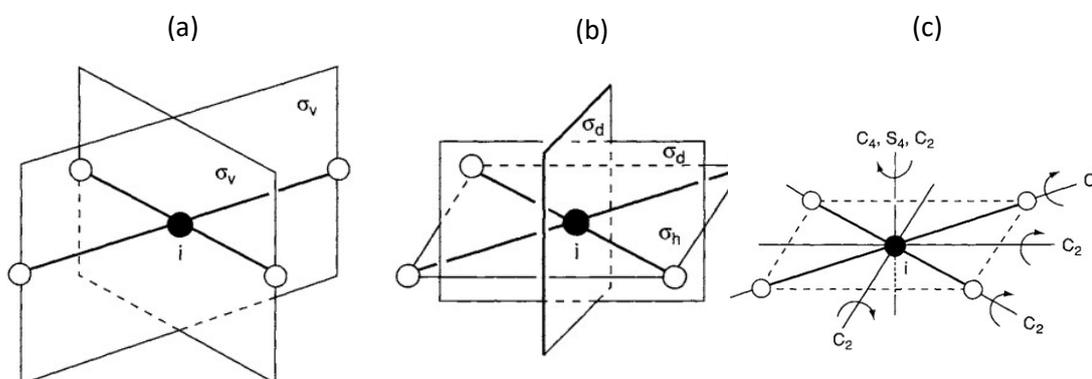


Fig. 9: Elementos de simetria da molécula planar  $AB_4$  (por exemplo, íon  $PtCl_4^{2-}$ ). Fonte: [43]

- Centro de simetria ( $i$ ): Se uma linha reta traçada de cada átomo de uma molécula através de um ponto encontra um átomo equivalente equidistante do ponto, esse ponto é chamado de centro de simetria da molécula [43]. O centro de simetria pode ou não coincidir com a posição de um átomo. Se o centro de simetria está situado em um átomo, o número total de átomos na molécula é ímpar. Se o centro de simetria não está em um átomo, o número de átomos na molécula é par. A Figura 9c ilustra um centro de simetria e eixos rotacionais para a molécula  $AB_4$  planar.
- Rotação e reflexão dos eixos: Se uma molécula é girada  $360^\circ/n$  em torno de um eixo, depois refletida em um plano perpendicular ao eixo, e se a operação produz uma configuração indistinguível da original, a molécula possui o elemento de simetria da rotação-reflexão, que é designado por  $S_n$ .

#### 2.4.4. Regras de seleção

As regras de seleção podem ser aplicadas a cada vibração normal para determinar se uma vibração está ativa nos espectros IR e Raman. Como as origens dos espectros de IR e Raman são marcadamente diferentes, suas regras de seleção também se diferenciam [43]. De acordo com a mecânica quântica [45,46], uma vibração é IR-ativa se o momento dipolar for alterado durante a vibração e é Raman-ativa se a polarizabilidade for alterada durante a vibração.

Para discutir a atividade Raman, é preciso considerar a natureza da polarizabilidade ( $\alpha$ ). Quando uma molécula é colocada em um campo elétrico (ou na influência de um laser), ela sofre distorção, pois os núcleos carregados positivamente são atraídos em direção ao polo negativo e os elétrons em direção ao polo positivo (Fig. 10). Essa separação de carga produz um momento dipolar induzido  $P$  (Eq. 2) dado por  $\delta$

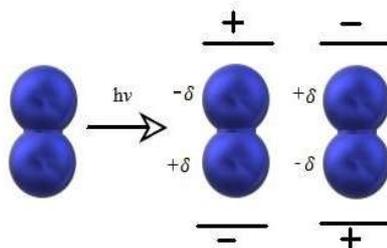


Fig. 10: Polarização de uma molécula diatômica em um campo elétrico. Fonte: adaptada de [43]

Nas moléculas reais, uma relação como a descrita pela Eq.2 não se mantém, pois  $P$  e  $E$  são vetores que consistem em três componentes nas direções  $x$ ,  $y$  e  $z$ . Assim, essa equação deve ser escrita como:

$$P_x = \alpha_{xx}E_x + \alpha_{xy}E_y + \alpha_{xz}E_z \quad (8)$$

$$P_y = \alpha_{yx}E_x + \alpha_{yy}E_y + \alpha_{yz}E_z \quad (9)$$

$$P_z = \alpha_{zx}E_x + \alpha_{zy}E_y + \alpha_{zz}E_z \quad (10)$$

Na forma matricial é escrito como:

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad (11)$$

A primeira matriz do lado direito é chamada de tensor de polarização. Na dispersão Raman normal, esse tensor é simétrico:  $\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$ ,  $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$  e  $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$ . De acordo com a mecânica quântica, há uma vibração Raman-ativa se um desses componentes do tensor de polarizabilidade for alterado durante a vibração.

No caso de pequenas moléculas, é factível determinar se a polarização muda ou não durante a vibração. Considere as moléculas diatômicas como  $H_2$  ou moléculas lineares como  $CO_2$ . As nuvens de elétrons têm uma forma alongada como a forma de um ovo com seções transversais circulares. Nessas moléculas, os elétrons são mais polarizáveis (um  $\alpha$  maior) ao longo da ligação química do que na direção perpendicular a ela. Se traçar um  $\alpha_i$  ( $\alpha$  na direção  $i$ ) do centro de gravidade em todas as direções chega-se a uma superfície tridimensional. Convencionalmente, se plota  $\frac{1}{\sqrt{\alpha}}$  ao invés de um  $\alpha_i$  e o corpo tridimensional resultante chama-se de elipsóide de polarização. A Fig. 11 mostra as alterações de um elipsoide desse tipo durante as vibrações da molécula de  $CO_2$  [43].

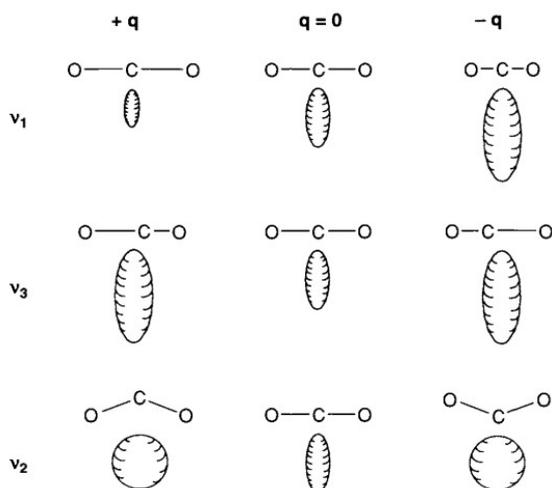


Fig. 11: Mudanças no elipsoide de polarização durante a vibração da molécula de CO<sub>2</sub>. Fonte: [43].

Em termos do elipsoide de polarizabilidade, a vibração é ativa por Raman se o tamanho, a forma ou a orientação mudarem durante a vibração normal. Por exemplo, na vibração  $\nu_1$  (Fig. 11), o tamanho do elipsoide está mudando e os elementos diagonais ( $\alpha_{xx}$ ,  $\alpha_{yy}$  e  $\alpha_{zz}$ ) estão mudando simultaneamente. Assim,  $\nu_1$  é Raman ativo. Por outro lado, embora o tamanho do elipsoide esteja mudando durante a vibração  $\nu_3$ , os elipsoides nos dois deslocamentos extremos ( $+q$  e  $-q$ ) são exatamente os mesmos neste caso. Portanto, essa vibração não é ativa por Raman se considerarmos o pequeno deslocamento. Em contraste, a diferença entre  $\nu_1$  e  $\nu_3$  é mostrada na Fig. 12. Note que a atividade Raman é determinada por  $(\frac{d\alpha}{dq})_0$  (inclinação próxima à posição do equilíbrio) [43]. Durante a vibração  $\nu_2$ , a forma do elipsoide é esférica nas duas configurações extremas. No entanto, o tamanho e a forma do elipsoide são exatamente os mesmos em  $+q$  e  $-q$ . Portanto, não é ativo para Raman pelo mesmo motivo que  $\nu_3$ . Assim como mostrado nos exemplos, não é necessário descobrir o tamanho exato, forma ou orientação do elipsoide para determinar a atividade Raman.

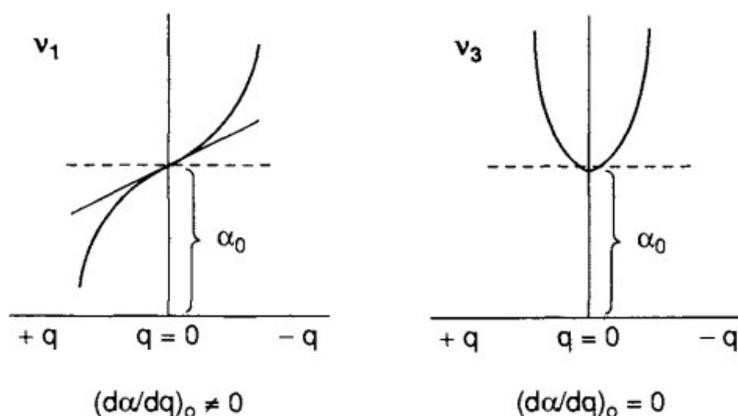


Fig. 12: Diferença entre as vibrações  $v_1$  e  $v_3$  na molécula de  $\text{CO}_2$  Fonte: [43].

A Fig. 13 ilustra as alterações no elipsoide de polarização durante as vibrações normais da molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . A vibração  $v_1$  é Raman ativa da mesma forma que vibração  $v_1$  do  $\text{CO}_2$ . A vibração  $v_2$  também é Raman ativa, porque a forma do elipsóide é diferente em  $+q$  e  $-q$ . Em termos do tensor de polarizabilidade ( $\alpha_{xx}, \alpha_{yy}, \alpha_{zz}$ ), todos estão mudando com taxas diferentes. Finalmente, a vibração  $v_3$  é Raman ativa porque a orientação do elipsoide está mudando durante a vibração [43]. Essa atividade ocorre porque um elemento fora da diagonal ( $\alpha_{yz}$ ) está sendo alterando.

Note que, no  $\text{CO}_2$ , a vibração que é simétrica em relação ao centro de simetria ( $v_1$ ) é Raman ativa, mas não ativa por IR, enquanto as que são anti-simétricas em relação ao centro de simetria ( $v_2$  e  $v_3$ ) são ativos para IR, mas não para Raman. Essa condição é chamada de princípio de exclusão mútua e vale para qualquer molécula que possua um centro de simetria [43].

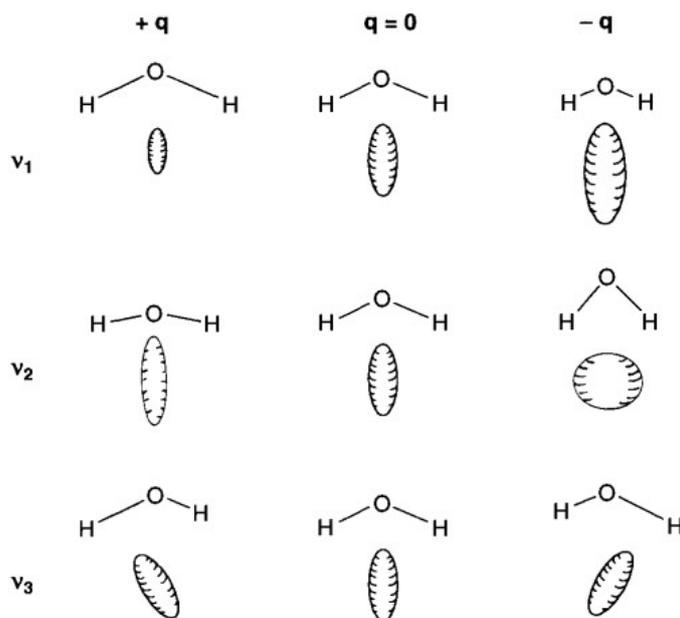


Fig. 13: Mudanças no elipsoide de polarização durante a vibração normal de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . Fonte: [43].

Esses exemplos demonstram que as atividades de IR e Raman podem ser determinadas pela análise dos modos normais. Uma abordagem tão simples não é aplicável às moléculas grandes e complexas. Para simplificar, deve ser usada a teoria de grupos que fornece métodos favoráveis para determinar as atividades de IR e Raman das vibrações normais de tais moléculas [43].

#### 2.4.5. Espectroscopia Raman de Ressonância

Na espectroscopia Raman clássica, o sinal depende apenas da frequência  $\nu_0$  do laser usada para induzir o efeito Raman. Como se trata de um sinal disperso, a intensidade do sinal Raman variará de acordo com a quarta potência dessa frequência ( $\nu^4$ ) [47]. No entanto, se essa frequência coincidir com a de uma transição eletrônica da molécula irradiada, há uma melhoria em um subconjunto dos modos ativos de Raman que podem atingir seis ordens de magnitude [40]. Isso significa que a espectroscopia Raman se torna uma técnica muito mais sensível. Quando a condição de ressonância ocorre, é possível obter informações eletrônicas e vibracionais da amostra, inclusive quando se tem fluorescência. Esse aspecto muito específico da espectroscopia Raman tem sido amplamente utilizado em cromóforos biológicos, como grupos de hemes, aglomerados de ferro-enxofre, clorofilas, moléculas de

carotenoides, anéis de porfirina (que estão presentes no centro de uma série de enzimas-chave) e os pigmentos feitos de ftalocianinas [47]. Mais recentemente, foi demonstrado que a espectroscopia Raman ressonante poderia ser usada em amostras biológicas integradas, como cloroplastos ou folhas inteiras, para acompanhar as alterações de conformação de cromóforos específicos (neste caso, moléculas de carotenoides), após a construção de um processo regulatório [48]. Nesse caso, o Raman ressonante permite uma pesquisa direta dos eventos moleculares, subjacentes a um processo metabólico *in situ* e *in vivo* [47].

Também, no efeito de ressonância (Fig. 14), é possível observar seletivamente uma molécula em um meio complexo, desde que haja uma transição de absorção, cuja energia coincida com a energia dos fótons incidente [47]. Isso torna possível estudar as interações assumidas pelos cromóforos nas proteínas, ou a conformação delas, embora essas proteínas ainda estejam incorporadas em uma membrana biológica ou não sejam completamente purificadas.

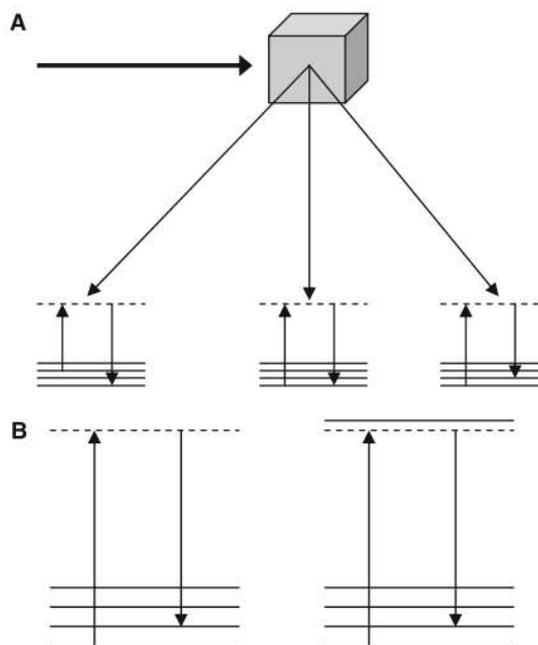


Fig. 14: Representação esquemática dos níveis de energia envolvidos na espectroscopia Raman (a) anti-stokes, Rayleigh, Stokes (b) Raman e Raman ressonante. Fonte: [47]

Quando ocorre a ressonância, apenas uma fração dos modos vibratórios da molécula de dispersão é melhorada. Mais precisamente, no caso mais simples, quando apenas um estado eletrônico está envolvido na ressonância, o sinal surge dos modos vibracionais que

envolvem movimentos nucleares correspondentes às distorções experimentadas pela molécula durante a transição entre o estado fundamental e o excitado usado para induzir a ressonância [49]. Essa seleção intramodo pode aparentemente constituir uma limitação. Se um grupo químico da molécula não estiver diretamente envolvido na transição eletrônica (por exemplo, um grupo carbonil não conjugado), a ressonância Raman não fornecerá nenhuma informação sobre isso. No entanto, a parte funcional da maioria dos cromóforos biológicos consiste nos átomos que se conjugam com a transição eletrônica [47]. Portanto, a ressonância Raman fornecerá informações seletivas sobre a parte "biologicamente relevante" dessas moléculas [48].

Além disso, a análise dos modos Raman ressonante ativos observados após a excitação com uma determinada transição eletrônica fornecerá informações sobre a natureza dessa transição, sobre os núcleos envolvidos e sobre o acoplamento entre essa transição e os diferentes modos vibratórios dessa molécula [47]. Em resumo, a natureza e a posição das bandas Raman ressonante fornecerão informações sobre a estrutura vibracional dos estados eletrônicos de baixa energia envolvidos na transição usada para induzir a ressonância, enquanto a intensidade dessas bandas fornecerá informações sobre o acoplamento dessa maneira com a transição eletrônica [47]. O conteúdo das informações dos espectros de Raman ressonante dependerá da precisão com a qual os modos vibracionais das moléculas estudadas podem ser calculados. Embora tenha sido feito um progresso definido nos dois principais cromóforos envolvidos na fotossíntese, a saber, as moléculas de clorofila e os carotenoides, ainda não são possíveis simulações perfeitas das propriedades vibracionais dessas moléculas complexas e altamente conjugadas [50-52].

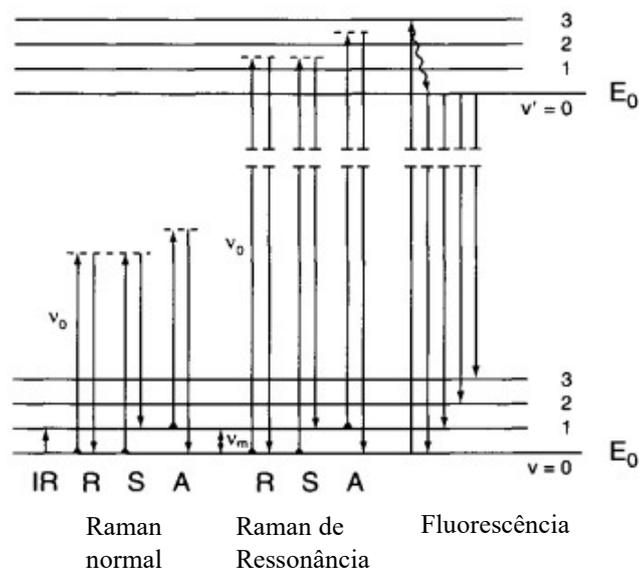


Fig. 15 Comparação dos níveis de energia para Raman normal, Raman ressonante e espectro de fluorescência. Fonte: [43]

Por outro lado, existe outro fenômeno na dispersão de fótons chamado de fluorescência Ressonante (RF). A RF ocorre quando a molécula é excitada para um nível discreto do estado eletrônico excitado [43]. Esses espectros de fluorescência são observados quando a molécula do estado excitado decai para o nível vibratório mais baixo por meio de transições sem radiação, como mostra a Fig. 15. Comparativamente, o tempo de vida do estado excitado na Ressonância Raman é muito curto ( $\sim 10^{-14}$  s), enquanto os de RF são muito mais longos ( $\sim 10^{-8}$  para  $10^{-5}$  s). Também, uma variável não esclarecida no diagrama está relacionada com que os processos de espalhamento e absorção no ressonante Raman são separados pelo tempo, uma variante não representada no esquema [43].

#### 2.4.6. Principais Vantagens da espectroscopia Raman

- Como o diâmetro do feixe de laser é normalmente de 1-2  $\mu\text{m}$ , apenas uma pequena área de amostra é necessária para obter os espectros Raman.
- A espectroscopia Raman é ideal para estudos de compostos biológicos em solução aquosa uma vez que água é um dispersor Raman fraco. Assim, os espectros Raman

de amostras em solução aquosa podem ser obtidos sem grande interferência das moléculas de água.

- Com o efeito Raman ressonante é possível aumentar seletivamente as vibrações de um determinado grupo cromofórico na molécula. Isso é particularmente vantajoso em estudos vibracionais de grandes moléculas biológicas contendo grupos cromofóricos [43].

## **2.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

Cada elemento possui elétrons em um único nível de energia correspondentes à sua estrutura atômica. Mesmo que um elemento seja exposto à radiação de todos os comprimentos de onda, apenas os comprimentos de onda ou fótons de energia que correspondem aos níveis (estados de energia) dentro desse átomo podem interagir. O padrão resultante, chamado espectro, coincide com a absorção ou emissão dos fótons específicos para esse elemento em particular. Esse fenômeno é responsável pelas linhas de emissão produzidas por átomos e moléculas excitadas, bem como pelas bandas de absorção em todas as regiões do espectro eletromagnético. Ele forma a base de toda espectroscopia atômica e molecular [38].

Em geral, as interações da luz-matéria são caracterizadas pela energia da radiação e seus efeitos nos materiais. Deste modo, a energia da radiação infravermelha (IR) é muito baixa para afetar os elétrons dentro de um átomo, no entanto, a absorção dessa radiação provoca mudanças na energia vibracional, produzindo principalmente vibrações nas moléculas [38]. A medição das energias características IR (fótons) que correspondem a essas mudanças resulta em um espectro como os obtidos das microalgas objeto deste estudo. Com base em sua estrutura atômica, cada molécula produz um espectro de IR único e característico. O número específico e a posição das bandas de absorção para qualquer molécula são governados por seus graus de liberdade, seus grupos funcionais e as regras de seleção de IR. Um padrão espectral, às vezes chamado de impressão digital, é usado para identificar um material desconhecido quando as absorções em seu espectro são combinadas com as absorções no espectro de um material conhecido. Além disso, uma vez que os grupos

funcionais (combinações de átomos) produzem absorções na mesma frequência (ou quase na mesma frequência), independentemente do restante da molécula, a presença ou ausência de certos grupos funcionais pode ser determinada pela interpretação do espectro de IR [38]. Todas essas características fazem da técnica IR uma ferramenta poderosa para a caracterização de compostos.

Em particular, as vibrações moleculares produzem oscilações nas cargas elétricas com frequências governadas pelas frequências normais de vibração do sistema. Os graus de liberdade especificam o número máximo de vibrações fundamentais para uma molécula. Uma vibração fundamental, também chamada vibração de primeira ordem, corresponde a uma mudança do estado fundamental molecular para o primeiro nível de energia. Uma vibração de primeira ordem produz as mais fortes absorções de energia, mas apenas as que estão ativas na região IR serão vistas como uma banda de absorção no espectro IR. As regras de seleção, baseadas na simetria da molécula, determinam se uma determinada vibração será vista no espectro [43]. Existem várias regras de seleção, entre elas:

- Regra de seleção específica: unicamente estão permitidas as transições entre estados vibracionais consecutivos  $\Delta v = \pm 1$ . Como IR é uma espectroscopia de absorção, a banda mais importante de um modo de vibração é devida à transição entre o estado mais populoso e o primeiro estado excitado  $v = 0 \rightarrow v = 1$ .
- Regra de seleção global ou primaria: a vibração molecular tem que produzir um dipolo oscilante para que possa absorver energia. Assim, as vibrações do  $CO_2$  (Fig.2)  $\nu_2$  e  $\nu_3$  são ativas no IR, enquanto que  $\nu_1$  é inativa. Nas moléculas mais complexas é útil aplicar as propriedades da simetria das vibrações para determinar quais são ativas. Uma vibração molecular pode dar lugar a uma banda ativa no IR se a simetria da vibração é a mesma que a de uma ou mais coordenadas  $x, y, z$ .

Em uma molécula heteronuclear, vibrações não simétricas alteram a distância entre os dois núcleos e, portanto, seu momento dipolar. Esse momento dipolar vibratório cria um campo elétrico dipolar que, por sua vez, absorve uma unidade discreta de energia específica para essa transição. Vibrações em uma molécula diatômica homonuclear ou vibrações simétricas em uma molécula heteronuclear não alteram o momento dipolar e, portanto, não são vistas no espectro IR. Na prática, o número de bandas de absorção observadas em um espectro de IR é geralmente menor que o número de frequências fundamentais. Além das

regras de seleção específica e primária, outros fatores que afetam o número de bandas de absorção são (1) degenerescência, no qual dois modos vibracionais podem ocorrer em frequências idênticas, (2) sobreposições ou absorções fracas ou (3) modos vibracionais externos a faixa de análise do instrumento [38].

Alternativamente, o número de bandas observadas pode ser aumentado pela detecção de absorções fracas, ou chamadas proibidas, nas quais a mudança no nível vibracional é maior que um. Estes são conhecidos como conotações (overtones) [40]. Duas ou mais vibrações fundamentais também podem interagir para produzir bandas de absorção discretas que ocorrem a uma frequência correspondente à soma ou à diferença das frequências de banda individuais. Tais absorções são conhecidas como bandas de combinação [38].

A atividade IR de pequenas moléculas pode ser determinada pela análise do modo de uma vibração normal ou modo normal. A vibração de uma molécula diatômica homopolar não é IR-ativa, enquanto a de uma molécula diatômica heteropolar é IR-ativa [43]. Note que na Fig. 16 o momento dipolar da molécula de H<sub>2</sub>O é alterado durante cada vibração normal, assim, todas as vibrações ( $\nu_1$ ,  $\nu_2$  e  $\nu_3$ ) são ativas por IR. Por outro lado, verificando a figura 2, da molécula de CO<sub>2</sub>, pode-se ver que  $\nu_2$  e  $\nu_3$  são ativos por IR, enquanto  $\nu_1$  não.

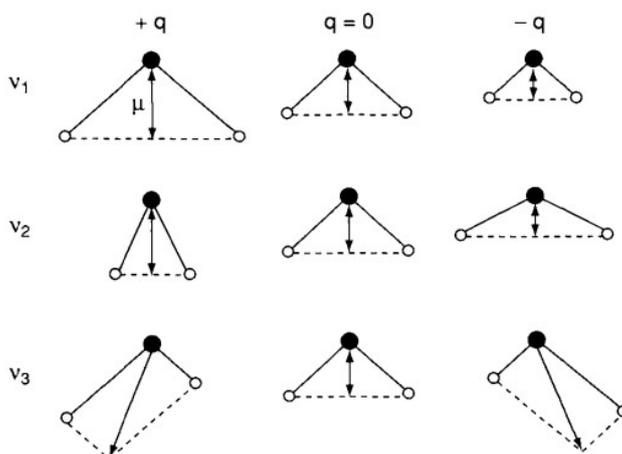


Fig. 16 Mudanças no momento dipolar para a molécula de H<sub>2</sub>O durante cada vibração normal. Fonte: [43]

A maioria dos instrumentos de IR utilizados na década de 1970 era baseado em monocromadores de prisma ou grade [38]. No entanto, um grande avanço aconteceu na espectroscopia IR com a introdução de espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier, que tinha, nos seus inícios, complexidades numéricas do procedimento envolvido na análise de Fourier. Depois, em 1964, a descoberta do algoritmo Fast Fourier Transform (FFT)

por James Cooley e John Tukey reduziu o tempo para o cálculo computacional da transformação de horas para apenas alguns segundos. As vantagens do FTIR sobre instrumentos dispersivos se traduzem em melhorias práticas, como coleta de dados em alta velocidade, maior resolução, limites mais baixos de detecção e maior autonomia na medição [38].

Considerando as aplicações, alguns estudos demonstraram que a espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier tem potencial como uma ferramenta prática para identificar alterações em componentes biológicos a partir das suas bandas de absorção, permitindo, em muitas ocasiões, quantificar macromoléculas [25, 53-56]. Assim, essa técnica pode ser usada como alternativa para superar as limitações dos métodos bioquímicos [27]. Especificamente, provou ser uma técnica sensível para estudar alterações específicas de espécies na composição molecular de microalgas, mesmo no nível de célula única [26,57]. Neste trabalho, a espectroscopia FTIR foi usada como técnica principal na identificação e quantificação de lipídeos.

## **2.6. Uma breve comparação entre IR e Raman**

A maneira pela qual a radiação é empregada nas espectroscopias de infravermelho e Raman é diferente. No IR a energia infravermelha cobre uma faixa de frequências é direcionada para a amostra. A absorção ocorre quando a frequência da radiação incidente corresponde à de uma vibração, de modo que a molécula é promovida a um estado vibracional excitado. A perda dessa frequência de radiação do feixe depois de passar pela amostra é então detectada. Em contraste, a espectroscopia Raman usa uma única frequência de radiação para irradiar a amostra e é a radiação espalhada pela molécula, em uma unidade vibracional de energia diferente do feixe incidente, que é detectada. Assim, diferentemente da absorção no infravermelho, o espalhamento Raman não exige a correspondência da radiação incidente com a diferença de energia entre o estado fundamental e os estados excitados [40].

Também, como visto, as regras de seleção são marcadamente diferentes, o que faz com que algumas vibrações sejam Raman ativas e outras IR ativas. Em geral, uma vibração é IR-ativa, Raman-ativa ou ativa em ambas; no entanto, vibrações totalmente simétricas são,

na maioria das vezes, Raman ativa [43]. Como os compostos absorvem radiação em várias regiões do espectro, as informações obtidas sobre a atividade molecular nas duas técnicas são frequentemente complementares e, usados em conjunto, dão uma visão melhor da estrutura vibracional de uma molécula. [40,43]. Finalmente, na figura 17, se mostra esquematicamente uma comparação, em termos de níveis energéticos, da forma pela qual acontece a absorção infravermelha e a dispersão Raman.

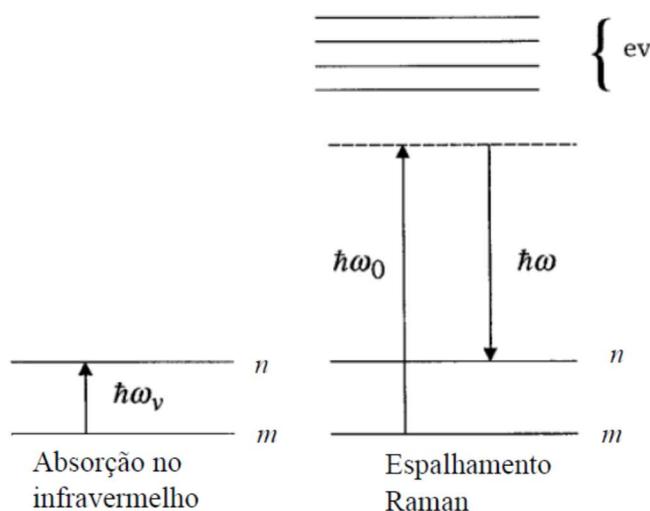


Fig. 17. Diagrama dos níveis de energia para a absorção infravermelha e o efeito Stokes na dispersão Raman para uma transição vibracional. A energia dispersa do fóton ( $\hbar\nu$ ) é deslocada da energia de radiação laser incidente pela energia vibracional infravermelha obtida pela molécula ( $\hbar\nu_v$ ). Fonte: [43]

## 2.7. UV-VIS

Como todos os compostos absorvem radiação em várias regiões do espectro, as informações sobre a atividade molecular em cada região fornecem dados complementares para a caracterização de cada material [38]. Quando uma amostra é irradiada por frequências no ultravioleta e visível (200-800nm), os fótons de certas frequência são absorvidos pelos elétrons de valência, estes são promovidos do seu estado fundamental para um dos muitos níveis vibracionais no estado eletrônico excitado (ocorrem transições eletrônicas) e por tanto as moléculas passam a estados mais energéticos. As frequências no UV-VIS tem energia suficiente para promover elétrons desde o orbital molecular ocupado mais alto (bonding) ao

menor orbital molecular não ocupado (antibonding). A diferença de energia entre bonding e antibonding é chamado de gap de energia. A energia de um fóton deve corresponder exatamente ao *gap* de energia para que seja absorvido. Nesse sentido, as moléculas com diferentes estruturas químicas têm diferentes intervalos energéticos ou *gaps* de energia e diferentes espectros de absorção. Na maioria dos casos, os grupos cromóforos são os responsáveis pelas transições eletrônicas [40]. O estudo dessa interação nessa faixa específica chama-se espectroscopia UV-VIS, que é conhecida como um dos métodos mais antigos em espectroscopia molecular [58]. Dentro da faixa geral de radiação eletromagnética de particular interesse, a espectroscopia de absorção UV-VIS ocupa apenas uma região de frequência ou número de onda muito estreita (Fig. 18). No entanto, esse intervalo é de extrema importância, pois as diferenças de energia correspondem às dos estados eletrônicos de átomos e moléculas; a partir disso nasce o conceito de *espectroscopia eletrônica* [58]. Além disso, na região espectral visível, as interações entre matéria e radiação eletromagnética se manifestam como cor. Dentre as possíveis as transições eletrônicas, destaca-se

- Transições  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ : Para que existam esses tipos de transições deve haver excitações produzidas por frequências na região ultravioleta de vazio (ao redor de  $\lambda = 150 \text{ nm}$ ). As ligações características que absorvem nessa região são  $H - CH_3$  e  $H_3C - CH_3$
- Transições  $\pi \rightarrow \sigma^*$ : Este tipo de transições ocorre quando as moléculas são submetidas a frequências no UV-distante ( $\lambda = 150 - 200 \text{ nm}$ ).
- Transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ : Correspondem ao UV distante e próximo ( $\lambda = 200 - 400 \text{ nm}$ )
- Transições  $n \rightarrow \sigma^*$ :  $n \rightarrow \pi^*$ : As energias são consideravelmente menores correspondendo à região visível ( $\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$ ).

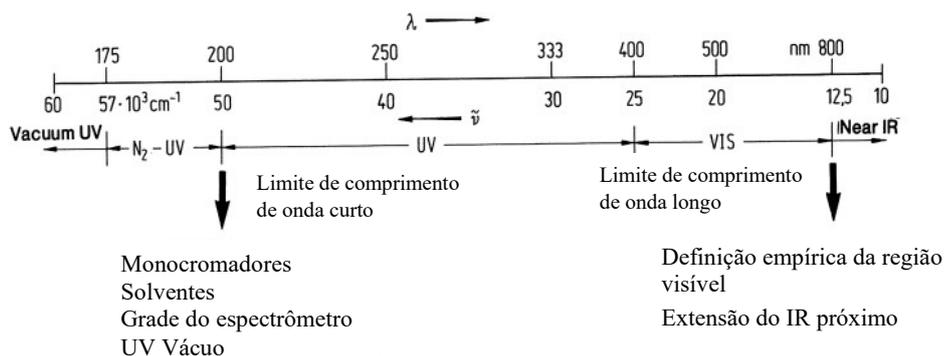


Fig. 18: Intervalo de energia envolvidos na espectroscopia eletrônica. Fonte: adaptado de [58].

## Transições Eletrônicas

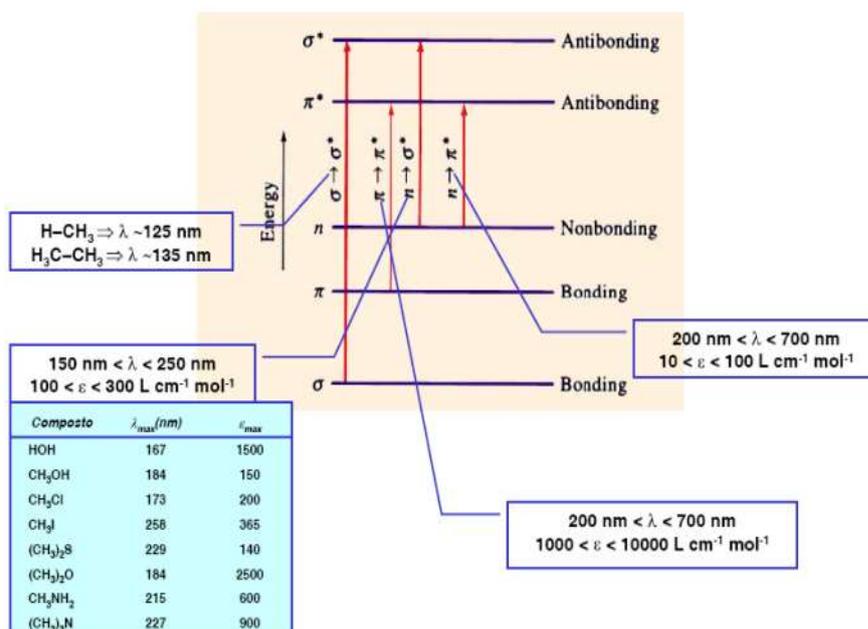


Fig. 19: Representação esquemática das transições eletrônicas. Fonte: [59]

Os orbitais  $\pi$  surgem devido a ligações duplas, e orbitais  $n$  são para elétrons sem ligação.  $\pi^*$  são orbitais  $\pi$  anti-ligação. Assim, a melhor absorção de UV-Vis é devida a moléculas que contêm ligações duplas. Os orbitais  $\pi$  adjacentes uns aos outros que estão conectados, chamados de conjugados, normalmente aumentam a absorção. As transições  $\sigma$

\*, associadas a ligações simples, são mais energéticas e surgem no UV distante, porém menos úteis para uso rotineiro [59]. O aparecimento de bandas ou ombros largos nos espectros UV-Vis é devido aos numerosos estados vibracionais e rotacionais de uma molécula, que levam a separar os *gaps* de energia ligeiramente diferentes.

A espectroscopia UV-VIS é útil em casos qualitativos, como no trabalho de identificar os grupos funcionais ou compostos, comparando com bandas características do espectro de absorvância. Também, nos casos quantitativos é usada para a determinação da concentração do analito (usando a lei de Beer), na quantificação de biomoléculas, na cinética das reações químicas, entre outras [60].

### 2.7.1. Princípios

As bases matemáticas-físicas das medidas de absorção da luz na região de UV-VIS e IR são dadas pela lei de Bouguer-Lambert-Beer (BLB),

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = l_g\left(\frac{100}{T(\%)}\right) \equiv A_\nu = \varepsilon_\nu \cdot c \cdot d \quad (12)$$

No qual  $\varepsilon_\nu$  é o coeficiente de extinção molar,  $I_0$  é a intensidade da luz monocromática que incide na amostra,  $I$  é a intensidade da luz que sai da amostra,  $c$  é a concentração da substância absorvente de luz,  $d$  é o comprimento do caminho da amostra em cm.

O coeficiente de atenuação molar é a característica de um composto individual para absorver em um determinado comprimento de onda e essa propriedade é devida a grupos funcionais, conjugação, etc. Se um composto não possui um coeficiente de atenuação alto, ele pode ser marcado com um grupo apropriado para aumentar sua absorvância [61]. O comprimento do caminho na equação geralmente está relacionado ao tamanho da cubeta, que é de 1 cm nos espectrofotômetros padrão [60]. De acordo à Lei, a absorvância é proporcional à concentração de uma espécie absorvente  $c$  e ao caminho ótico  $d$  do meio absorvente.  $A_\nu = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)_\nu$  representa a absorvância, enquanto  $T_\nu = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)_\nu \cdot 100\%$  é a transmitância [46]. A correlação funcional entre  $\varepsilon_\nu$  e o número de onda  $\nu$  é chamada "espectro de absorção" de um composto. Como o coeficiente de extinção pode variar em várias ordens de magnitude dentro do espectro de absorção de um único composto inorgânico ou orgânico, o valor

logarítmico  $\log \log (\varepsilon) = f(\nu)$  pode ser usado em vez de  $\varepsilon = f(\nu)$  para plotar um espectro de absorção [62].

A aplicação da lei de Bouguer-Lambert-Beer implica uma medição da relação entre as intensidades luminosas  $I$  e  $I_0$ . No entanto, como as medições são feitas em cubetas de quartzo (região UV-VIS), parte da luz é perdida por reflexão nas superfícies da cubeta [60]. Para eliminar esta fonte de erro, é feita uma medição de referência em uma cubeta com o mesmo comprimento no caminho, mas sem a substância a ser medida. Como a maior parte da espectroscopia UV-VIS é realizada com soluções, a cubeta padrão contém o solvente puro, que idealmente não deve absorver na região espectral em consideração [62]. Assim,  $I_0$  é medido após a luz atravessar a cubeta padrão ou de referência e  $I$  após a luz atravessar a cubeta que contém a amostra. Dependendo da construção e do modo de operação do equipamento, o relacionamento  $I_0/I$  é mostrado como um valor de  $T_\nu(\%)$  ou  $A_\nu$ [62]. Este resultado é independente das perdas devido à reflexão e à influência do solvente. A transmitância foi obtida do espectrômetro no qual foram realizados os espectros das microalgas.

## 2.8. As microalgas

As microalgas fascinam por sua beleza e por suas propriedades exaltadas pelas publicidades em diferentes indústrias [63]. Elas são microrganismos eucariontes que tem sobressaído pela sua alta eficiência na produção de biomassa sintetizada a partir do  $\text{CO}_2$  e luz solar. Esses organismos crescem de forma autótrofa ou heterótrofa, o que faz que sua forma de obter energia varie de espécie para espécie, as quais estão distribuídas em diferentes meios e adaptadas a diversas condições ambientais, motivo pelo qual se denominam organismos ubíquos [64-66].

Historicamente, as microalgas têm sido cultivadas em pequena escala por laboratórios de pesquisa e universidades para desenvolver experimentos e alimentar organismos marinhos. A maioria dos produtores comerciais cultiva uma variedade limitada de espécies principalmente como suplementos alimentares, para produção de pigmentos ou como alimento para a aquicultura [67]. A produção comercial de algas é um mercado de pequeno

volume e alto valor [68], envolvendo para seu cultivo diferentes espécies como *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, entre outras [69].

Antes de se aprofundar nos detalhes do cultivo, é necessário estabelecer uma ideia clara sobre os motivos da cultura de microalgas. A razão, basicamente, consiste em que muitos compostos como pigmentos, ácidos graxos, enzimas, polímeros, peptídeos, e toxinas estão sendo extraídos da biomassa das microalgas [70]. Alguns desses compostos extraídos das microalgas têm grande potencial de substituir algumas fontes atuais que são inviáveis [5]. Nesse sentido, diversas agências governamentais e indústrias nacionais e internacionais, interessadas na redução de custos e de contaminação, estão particularmente interessadas na produção em grande escala de microalgas para a produção de biocombustíveis e de pigmentos [71-75].

Para isso, é importante estudar as dinâmicas de crescimento das microalgas, o que não é possível fazer em ambientes naturais devido as diversas variáveis físico-químicas e às condições biológicas presentes nos cultivos. Nesse sentido, uma ampla gama de biorreatores (dispositivos artificiais para o cultivo) está sendo construída com a finalidade de estudar os parâmetros que afetam o cultivo e as cepas de microalgas com mais suscetibilidade a desenvolver maior quantidade de alguns compostos e biomoléculas específicas [76,77]. Deste modo, alguns estudos mostram que a estimulação de certos parâmetros favorece o crescimento do teor total de algumas biomoléculas de interesse industrial.

Por exemplo, o cultivo de microalgas estressadas por falta de nitrogênio mostrou um incremento no teor de lipídeos [78], biomoléculas que são usadas para a criação de biocombustíveis. Mas ainda existem desafios tecnológicos significativos até que se produzam biocombustíveis derivados de algas que sejam competitivos economicamente, tais como o desenvolvimento de cepas selecionadas e de métodos de cultivo adequados; a otimização das técnicas de colheita e extração de lipídios e a otimização dos processos de produção dos combustíveis propriamente ditos [76] e reconhecimento de cepas altamente produtivas.

### 2.8.1. Aplicações industriais

Das biomoléculas isoladas das microalgas, os pigmentos e os lipídeos são de especial interesse devido às vantagens que representam na indústria de alimentos, de saúde e de biocombustíveis. Por exemplo, os pigmentos obtidos a partir das microalgas têm uma forte demanda ainda em crescimento no mercado pelos benefícios antioxidantes [4]. Assim, o preço do  $\beta$ -caroteno, um pigmento das microalgas, atinge em média 780 dólares por kg, enquanto os pigmentos sintéticos não chegam à metade desse valor [4].

Alguns pesquisadores se concentraram ativamente nos últimos anos na pesquisa dos carotenoides de fontes de microalgas. Assim, encontraram as principais áreas de aplicação industrial para estes microrganismos, reais ou potenciais, no campo de alimentos e saúde. Especificamente, as propriedades antioxidantes exibidas por essa classe de compostos constituem atualmente seu principal interesse [4]. As funções dos carotenoides nas células de microalgas são diversas. São responsáveis pela colheita de luz, mas também contribuem para estabilizar a estrutura e auxiliam na função dos complexos fotossintéticos, eliminando as espécies reativas de oxigênio e dissipando o excesso de energia [79]. A atividade antioxidante intrínseca dos carotenoides constitui a base de sua ação protetora contra o estresse oxidativo [4].

Da literatura é conhecido que a maioria das reações de oxidação nos alimentos pode repercutir na degradação de vitaminas, pigmentos e lipídios, com conseqüente perda de valor nutricional e desenvolvimento de sabores desagradáveis [80,81]. Os antioxidantes artificiais, que são adicionados aos alimentos, podem inibir a oxidação ou retardar a iniciação e propagação das cadeias de radicais livres [4]. Nos últimos anos, a quantidade de aditivos alimentares sintéticos legalmente permitidos tem diminuído constantemente, devido ao seu papel suspeito de promover a carcinogênese, além de alegações de toxicidade hepática e renal [82]. Por outro lado, o  $\beta$ -caroteno natural tem sido usado como substitutivo antioxidante ideal pelo mercado de saúde porque é uma mistura de isômeros trans e cis, que possuem características anticâncer; essa mistura dificilmente pode ser obtida por síntese química [79]. Deste modo, os pigmentos naturais, especialmente os carotenoides, obtidos das microalgas tem uma importância científica e comercial cada vez maior, em vista da conscientização da saúde dos consumidores em geral.

Também, os carotenoides são corantes particularmente fortes. Alguns deles, da microalga *Chlorella*, têm sido usados regularmente como pigmentos e, portanto, foram incluídos como ingredientes para a alimentação de peixes e aves (para melhorar a cor amarelada da gema de ovo) [83-87]. Além disso, o  $\beta$ -caroteno tem experimentado uma demanda crescente como pró-vitamina A (retinol) em preparações multivitamínicas; geralmente é incluído na formulação de alimentos saudáveis [87-89].

Por outro lado, o interesse de obter lipídeos das microalgas reside na sua importância como potencial fonte de biocombustíveis. Deste modo, se todo o combustível de transporte derivado de petróleo for substituído por biodiesel, considerando uma taxa média de consumo, em um país como os Estados Unidos se precisariam ao redor de 0,53 bilhão de m<sup>3</sup> de biodiesel por ano [5]. O óleo da palma, uma das plantas oleaginosas mais produtivas, produz aproximadamente 5.950 litros de óleo por hectare [5]. Para produzir a quantidade de biodiesel que EUA precisa, a partir de óleo de palma, seriam necessário cultivar uma área de 111 milhões de hectares aproximadamente ou quase 61% de todas as terras agrícolas

Com base nestes cálculos, é determinante afirmar que o cultivo de plantas oleaginosas não é capaz de substituir os combustíveis líquidos derivados do petróleo num futuro previsível. Este panorama é diferente se as microalgas forem usadas como fonte de biodiesel [2]. Em um sistema de produção bem projetado, localizado em uma zona tropical, uma produtividade anual média de biomassa de microalgas pode estar na região de 1.535 kg m<sup>-3</sup> [5,90]. Considerando um teor de óleo médio de 30% de peso seco na biomassa e neste nível de produtividade, o rendimento de óleo por hectare de área de terra total é de 123 m<sup>3</sup> por ano. Isso equivale a uma produção de biodiesel de microalgas de 98,4 m<sup>3</sup> por hectare. Portanto, produzir os 0,53 bilhões de m<sup>3</sup> de biodiesel que os EUA precisam como combustível de transporte exigiria que as microalgas fossem cultivadas em uma área de 5,4 milhões de hectares ou apenas 3% da área de cultivo dos EUA [77]. Este é um cenário viável, em termos de território, mesmo que a biomassa de algas contenha apenas 15% de óleo por peso seco. Outra vantagem importante das microalgas é que, ao contrário de outras culturas oleaginosas, elas crescem rapidamente e geralmente dobram sua biomassa em 24 horas [5]. De fato, o tempo de duplicação da biomassa para microalgas durante o crescimento exponencial pode ser tão curto quanto 3,5 h, que é significativamente mais rápido do que o tempo de duplicação para as plantações atuais [5].

Diversos estudos mostram que a produção de biocombustíveis baseados em microalgas são os únicos que tem o potencial de desbancar o petróleo como fonte principal dos combustíveis [2,5] e é até agora a opção mais promissora na substituição das fontes atuais [91]. Assim, ressalta-se a importância de discutir a questão: por que ainda não têm sido substituídas as plantas oleaginosas como fontes atuais dos biocombustíveis?

Os impedimentos para o cultivo de microalgas em grande escala são, principalmente, económicos [2,18]. A produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem problemas tecnológicos com relação métodos eficientes para recuperar sua biomassa. Também é preciso desenvolver processos de extração que permitam a recuperação do óleo da biomassa úmida sem a necessidade de secar [2]. Além disso, um requisito fundamental implica assegurar altos níveis de ácidos graxos e pigmentos, também, a capacidade de fornecer altas concentrações de biomassa em ciclos de crescimento curto [92]. Assim, um dos maiores desafios na produção em massa de biocombustíveis e de pigmentos pode ser abordado em termos de identificar e reconhecer as cepas com melhores desempenhos na produção de biomoléculas desejáveis.

## **2.9. Sobre a Análise de Componentes Principais (PCA)**

As medidas espectrais de diferentes grupos moleculares frequentemente contêm bandas que se sobrepõem ou medidas de diferentes amostras que apresentam espectros similares. Como consequências disso, os dados nos espectros são difíceis de analisar e interpretar visualmente. Assim, para facilitar a inspeção de dados, métodos de análise espectral multivariada não supervisionada<sup>5</sup> são frequentemente usados, entre eles o PCA é o método mais comum na análise multivariacional dos espectros Raman [28].

O PCA é uma poderosa ferramenta não paramétrica, útil para analisar dados quando se trata de identificar possíveis padrões e expressá-los de forma que sejam destacadas suas semelhanças e diferenças. Como os padrões de dados podem ser difíceis de encontrar quando se tem muitas dimensões e quando se tornam difíceis as análises das representações gráficas,

---

<sup>5</sup> Nenhum conhecimento a priori das características da classe é necessário, mas deve ser determinado a partir da própria análise.

o PCA mostra outra perspectiva a fim de revelar as estruturas simplificadas, às vezes ocultas ou confusas, que costumam estar subjacentes ao conjunto de dados [29].

A principal vantagem do PCA é dada em termos da sua efetividade na descrição de um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas em um novo conjunto de variáveis reduzidas sem uma correlação linear. Esse novo conjunto de variáveis é conhecido como componentes principais (PC). Deste modo, com o PCA é possível expressar o máximo da variação total dos dados em apenas alguns componentes principais e cada PC derivado sucessivamente expressa quantidades decrescentes da variação [93]. É de grande importância afirmar que essa nova representação não tem perdas consideráveis de informação.

O primeiro componente principal representa a combinação linear com variação máxima, é usada quando estamos procurando essencialmente uma dimensão, na qual as observações sejam separadas ou espalhadas ao máximo [94]. O segundo componente principal representa a combinação linear com variação máxima em uma direção ortogonal a primeira componente principal e assim por diante. Em geral, as principais componentes definem dimensões diferentes daquelas definidas por funções discriminantes ou variáveis canônicas. Em algumas aplicações, as componentes principais são um fim em si mesmo e podem ser passíveis de interpretação. Mais frequentemente, as componentes principais são obtidas para uso como entrada para outra análise [94]

Por exemplo, duas situações em regressão em que os componentes principais podem ser úteis são (1) se o número de variáveis independentes é grande em relação ao número de observações, um teste pode ser ineficaz ou até impossível e (2) se as variáveis independentes são altamente correlacionadas, as estimativas dos coeficientes de regressão podem ser instáveis [94]. Nesses casos, as variáveis independentes podem ser reduzidas a um número menor de componentes principais que produzirão um teste melhor ou estimativas mais estáveis dos coeficientes de regressão.

Outro dispositivo útil de redução de dimensão é avaliar as duas primeiras componentes principais para cada vetor de observação e construir um gráfico de dispersão para verificar a normalidade multivariada, valores extremos e assim por diante. Finalmente, observamos que no termo componente principal, usa-se o adjetivo principal, descrevendo que tipo de componentes -principal, primário, fundamental e assim por diante. Não é usado o princípio substantivo como um modificador para componentes [94]

Particularmente, nos espectros Raman e FTIR, o PCA pode ser usado para reduzir a dimensionalidade, deixando a maior parte da variação retida nos componentes principais selecionados [95-101]. Mais especificamente, transformando linearmente os números de ondas espectrais originais em um conjunto de bases lineares equivalentes, ou "componentes principais", nos quais os componentes principais precedentes abrangem a maioria das variações de dados [102]. Na análise espectral multivariada o PCA tem sido usado com sucesso e é amplamente aceito para interpretação dos dados [28]

Por exemplo, o conjunto de dados obtido de um espectro Raman determinado pode-se expressar como uma matriz  $X$  de  $m \times n$ ,

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & x_{13} & \cdots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & x_{23} & \cdots & x_{2n} \\ x_{31} & x_{32} & x_{33} & \cdots & x_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{m1} & x_{m2} & x_{m3} & \cdots & x_{mn} \end{bmatrix} = [\mathbf{x}_1 \quad \mathbf{x}_2 \quad \mathbf{x}_3 \quad \cdots \quad \mathbf{x}_n] \quad (13)$$

Onde  $n$  é o número de espectros Raman obtidos da amostra,  $m$  é o número de posições espectrais (números de onda) em que os desvios Raman são registrados e  $x_i$  é um vetor de comprimento  $m$  que representa o  $i$ -ésimo espectro Raman [102]. A matriz de covariância  $C_X$  do conjunto de dados Raman original  $X$  pode então ser determinada, assim como os vetores próprios de  $C_X$ . A matriz de vetores próprios resultante  $W$  é dada por:

$$W = [w_1 \quad w_2 \quad w_3 \quad \cdots \quad w_m] \quad (14)$$

onde  $w_i$  é um vetor de coluna de comprimento  $m$  que representa o  $i$ -ésimo autovetor de  $C_X$ . Note que os vetores próprios são organizados com valores próprios decrescentes, ou seja, contribuições decrescentes para a variação geral do conjunto de dados Raman [29]. A pontuação do componente principal  $P$  é obtida projetando o conjunto de dados Raman original  $X$  na nova base estendida pelos vetores próprios, ou seja,

$$P = WX = \begin{bmatrix} X_1^T W_1 & X_1^T W_2 & X_1^T W_3 & \cdots & X_1^T W_m \\ X_2^T W_1 & X_2^T W_2 & X_2^T W_3 & \cdots & X_2^T W_m \\ X_3^T W_1 & X_3^T W_2 & X_3^T W_3 & \cdots & X_3^T W_m \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ X_n^T W_1 & X_n^T W_2 & X_n^T W_3 & \cdots & X_n^T W_m \end{bmatrix} \quad (15)$$

ou

$$\mathbf{P} = \mathbf{W}^T \mathbf{X} = [\mathbf{p}_1 \ \mathbf{p}_2 \ \mathbf{p}_3 \ \dots \ \mathbf{p}_m] \quad (16)$$

onde  $p_i$  é um vetor de coluna de comprimento  $n$  que representa as pontuações do  $i$ -ésimo componente principal de cada uma das  $n$  medidas no conjunto de dados Raman. Como as componentes principais correspondentes aos maiores valores respondem pela maioria das variações no conjunto de dados. Assim, a classificação dos espectros Raman na maioria dos casos pode ser obtida com essas primeiras componentes principais. O PCA é, portanto, uma poderosa ferramenta analítica para redução de dimensionalidade na espectroscopia Raman [28]

Assim como estudos prévios [102], nesse trabalho, as três primeiras componentes principais PC1, PC2 e PC3 são usados para visualizar a separação dos espectros Raman distantes estatisticamente dos espectros Raman normais.

## 2.10. Revisão bibliográfica

Nas últimas décadas foram desenvolvidos estudos envolvendo o uso das técnicas de espectroscopia Raman, FTIR e UV-Vis na caracterização de microalgas. Esses trabalhos aportaram valiosas ferramentas para o desenvolvimento dessa dissertação. Entre os principais estudos destacou-se:

Em uma dissertação publicada na Bahia em 2013 [14], duas espécies de microalgas (*Haematococcus pluvialis* e *Nannochloropsis sp*) foram caracterizadas por espectroscopia Raman. Foram identificados sinais caraterísticas de carotenoides e lipídeos. A partir disso, os autores determinaram dois fatores que influenciam positiva e negativamente a intensidade desses sinais. A saber, o esgotamento dos nutrientes no cultivo aumenta a intensidade Raman enquanto que um maior tempo de exposição ao laser diminui a intensidade dos sinais (Fig. 20 (a)). Finalmente, por meio da curva de calibração obtida dos sinais Raman e diferentes concentrações de  $\beta$ -caroteno (Fig. 20 (b)), os autores quantificaram o teor de carotenoides nas espécies *Haematococcus pluvialis* (8,4 %) e *Nannochloropsis sp* (0,79 %).

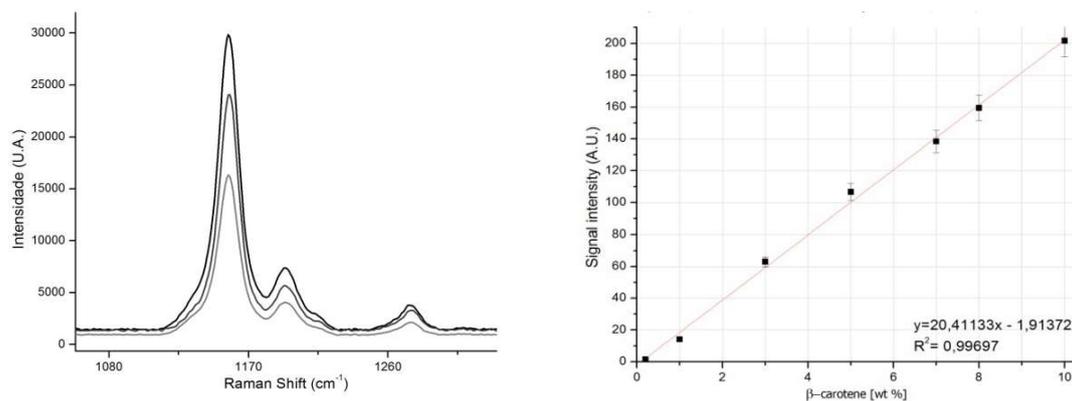


Fig. 20: (a) espectros Raman de uma microalga para diferentes tempos de exposição (linha preta: 5segundos, linha cinza escuro: 10 segundos e linha cinza claro: 15 segundos) (b) curva de calibração para quantificar o  $\beta$ -caroteno nas microalgas. Fonte: [14]

Em um artigo, publicado em 2012 [103], a espectroscopia Raman foi utilizada na determinação da concentração de  $\beta$ -caroteno em corpos lipídicos das microalgas *in vivo*. Foi evidenciado que algumas algas, consideradas úteis em biotecnologia, contêm  $\beta$ -caroteno em grandes quantidades. Também, no estudo foi desenvolvido um método simples para medir a concentração de  $\beta$ -caroteno em corpos lipídicos de algas a partir da razão da intensidade de seus modos vibracionais Raman. Essa metodologia permitiu uma determinação rápida do teor  $\beta$ -caroteno presentes nas microalgas, visando uma seleção das cepas mais produtivas [103]. Finalmente, foi mostrado que a concentração de  $\beta$ -caroteno é proporcional ao volume de corpos lipídicos nas algas e a intensidade de luz durante do cultivo. Em um trabalho publicado em 2017 [104], o efeito da deficiência de nitrogênio na produção de lipídios pela microalga da espécie *Scenedesmus obliquus* foi estudada por espectroscopia Raman confocal. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados obtidos por técnicas tradicionais, como o a técnica de *Nile Red* e o método gravimétrico. Os sinais de diferentes células de microalgas foram obtidos por microscopia Raman e com isso foi possível estabelecer um modelo para a previsão do conteúdo lipídico intracelular. Além do mais, esse método permitiu correlacionar o teor de ácidos graxos obtidos por espectroscopia Raman com aqueles obtidos pelo método gravimétrico. Foi determinada uma correlação significativa ( $R^2 = 0,83$ ), com o que concluíram que a espectroscopia Raman é aplicável à detecção semi-quantitativa do conteúdo lipídico da microalga. Por último, as imagens pseudo-coloridas da distribuição lipídica obtida por espectroscopia Raman evidenciaram que os lipídios se acumulam na região pirenóides das células. A quantificação do teor lipídico em microalgas

da espécie *Chlorella vulgaris* foi também estudado em um trabalho publicado em 2013 [37]. Nesse trabalho foram monitoradas as alterações das intensidades de sinal em  $1440\text{ cm}^{-1}$  e  $2845\text{-}3107\text{ cm}^{-1}$  ao longo de um período de estresse por falta de nitrogênio. Os autores estabeleceram uma curva de calibração relacionada à intensidade do sinal e abundância de lipídios. Essa curva mostrou uma alta correlação entre a intensidade do sinal em  $2845\text{-}3107\text{ cm}^{-1}$  e a abundância de lipídios nas microalgas. Além do mais, a mesma curva de calibração foi aplicada na quantificação lipídica de duas amostras desconhecidas. Os resultados mostraram que as diferenças entre os teores lipídicos estimados pela curva de calibração e medidos por cromatografia gasosa foram inferiores a 2% em peso. O pré-tratamento da amostra envolveu apenas centrifugação, e o tempo necessário para a quantificação lipídica foi reduzido para menos de 1,5 h. Por fim, os autores, concluíram que a detecção por espectroscopia Raman tem um grande potencial na caracterização de microalgas de alto rendimento, fornecendo informações valiosas para monitorar a qualidade da cultura de microalgas e estabelecendo parâmetros para a produção em massa de biodiesel a partir de microalgas [37].

Em um artigo de 2010 [78], a micro-espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi usada para determinar o conteúdo de lipídios e carboidratos nas microalgas de água doce das espécies *Chlamydomonas reinhardtii* e *Scenedesmus subspicatus* cultivadas em ambientes com concentrações de nitrogênio (N) limitados. Ambas as algas exibiram divisão celular restrita e apresentaram um aumento do tamanho celular no transcorrer o tempo. A quantificação das bandas dos espectros de FTIR mostrou que razão das áreas dos lipídios/amida I e dos carboidratos/amida I aumentou ao longo do tempo. Para confirmação desses resultados os autores usaram o método *Nile Red*. Dessa análise, os autores concluíram que o FTIR é um método confiável para a determinação do rendimento da indução lipídica. Adicionalmente, eles usaram o PCA dos espectros de FTIR para estudar as correlações entre o tempo de cultivo e o aumento do teor das biomoléculas geradas (Fig. 21). Assim, foi identificado que os teores de lipídios e carboidratos aumentam na fase inicial do cultivo. Contudo, foi observado que enquanto o teor de lipídios continua crescendo no tempo, o teor de carboidratos diminui.

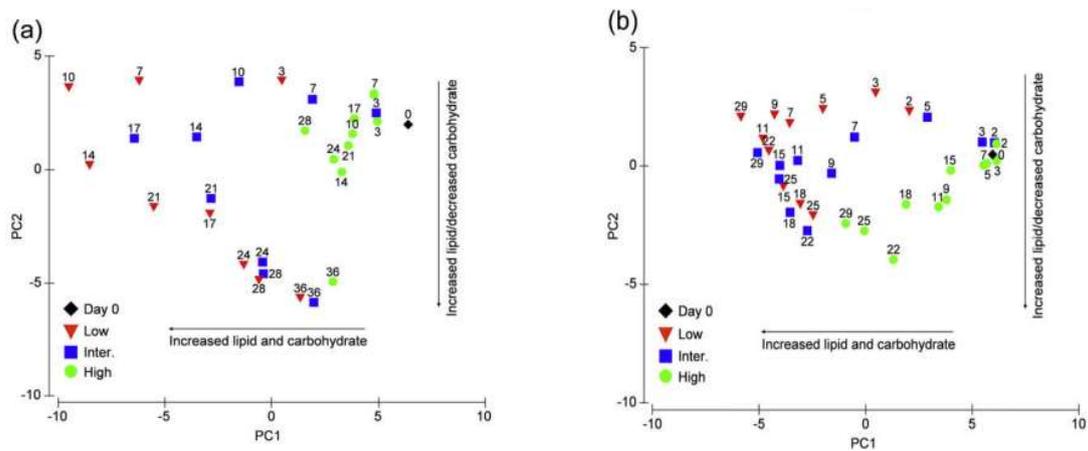


Fig. 21: São mostrados os dados obtidos das duas principais componentes (PC1 e PC2) do PCA de diferentes espécies de microalgas. Os espectros de células com alto conteúdo de nitrogênio (N), N intermediário e N baixo são representados pelos símbolos indicados. O número ao lado de cada símbolo indica o dia do crescimento. Fonte: [78]

# Capítulo 3

## Materiais e métodos

### 3.1. Cultivo das microalgas

Foram usadas três espécies de algas: *Chlorella sokoriana* (CO), *Chlamydomonas* (CA) e a *Nannochloropsis oceanica* (NN). As três espécies de microalgas foram cultivadas por um período de 7 dias em recipientes apropriados para a oxigenação e a iluminação. As microalgas CO e CA foram obtidas do catálogo de microalgas da empresa Embrapa, LBA39 e LBA40, respectivamente. Por sua vez, a microalga NN foi submetida à análise de sequenciamento do protocolo de extração de DNA de brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) e foi atribuída uma certeza da sua espécie de 98% [105]. As três cepas foram cultivadas em 20 ml de meio BG11 (Tabela 1) [106], em frascos com capacidade de 40 ml. As microalgas foram mantidas sob iluminação em fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro e submetidas a agitação de 180 rpm (com frequência de ligado/desligado cada 15 minutos). A temperatura de colheita das microalgas foi de  $27\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ . O erro na temperatura foi estimado com a oscilação diurna da temperatura no laboratório e a transferência de calor da lâmpada no período de ativação. Como *Nannochloropsis oceanica* é uma alga marinha, foi adicionado sal marinho (próprio da aquicultura de algas) na concentração de 15 g/L para adequar o meio ao cultivo da espécie. As três espécies de microalgas foram cultivadas nas mesmas condições por 7 dias. Todo o processo de criação e coleta foi desenvolvido no laboratório de fotobioreatores do professor Luiz Roncaratti, IF, UnB.

Tabela 1: Composição do meio de cultura utilizado no cultivo das s três espécies de microalgas.

Materiais	Quantidade (ml)	Concentração ( $\frac{g}{L}$ )
Sulfato de magnésio heptaidrato ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	10,0	7,5
Citrato de amônio férrico verde ( $C_6H_8FeNO_7$ )	10,0	0,6
Nitrato de sódio ( $NaNO_3$ )	20,0	75,0
Cloreto de cálcio di-hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	10,0	3,6
Ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ )	10,0	0,6
Carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ )	10,0	2,0
Dissodico di-hidratado do ácido etilenodiaminotetracético ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ )	10,0	0,1
Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ )	10,0	4,0
Elementos traços	1,0	

## 3.2. Aquisição dos Espectros Raman

### 3.2.1. Preparação das amostras

Para evitar o problema característico da fluorescência nos experimentos de Raman [40], foi desenvolvido um método de lavagens seriada que resulta na formação de uma massa concisa de algas. Além do mais, esse protocolo evita o acúmulo de cristais de sal usado no cultivo da amostra NN.

No processo de lavagem seriada as espécies CO, CA e NN foram depositadas cada uma em um frasco 1,5 ml (Eppendorf) e centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e ao conteúdo foi adicionado 1,4 ml de água destilada e a centrifugação foi retomada. O processo foi repetido 04 vezes. Essas lavagens permitem a formação de um biofilme uniforme que deixa uma leve umidade na amostra. Isso é crucial

para eliminar a fluorescência do espectro Raman [14], permitindo espectros mais reprodutivos. Depois da lavagem, a massa de microalgas foi gotejada em uma lamina de microscópio que foi seca em estufa a 50 °C por 4 minutos. Após todo esse processo, os espectros Raman foram imediatamente coletados.

### 3.2.2. Instrumentação

Para a realização dos espectros foi usado o espectrômetro LabRAM HR Evolution da Horiba equipado com grade de 1800 linhas/mm e com detector CCD [Syncerity OE]. Os espectros foram obtidos com um laser semiconductor sintonizado na linha 405 nm (0,4 mW) focalizados nas amostras com uma objetiva de 50 x (Fig. O foco foi escolhido de tal modo que o sinal de Raman fosse o máximo, isso implicou que o foco estivesse sobre as microalgas com uma profundidade aproximada de 1 micrometro. Os espectros foram registrados no intervalo espectral entre 750-1750  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 0,5  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos por meio de 5 acumulações de 12 segundos cada. A remoção da radiação de fundo foi feita pelo software LabRAM6. Foram adquiridos entre 13 a 15 espectros por espécie de microalgas.

### 3.2.3 Processamento dos dados

Os espectros Raman inicialmente adquiridos foram processados por meio da remoção da linha de base devido a eventuais fluorescências, suavizados e normalizados segundo suas áreas espectrais integradas no intervalo de 850 – 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Para isso, foi usado uma subrotina computacional em PYTHON (Python Software Foundation) que usa um filtro Savitzky-Golay (windows=51, grau polinomial=7), mínimos quadrados assimétricos [107], e as subrotinas numpy/scipy, respectivamente. Com os espectros pré-tratados foi construída a matriz de variância e submetida à análise PCA em relação à covariância. As atribuições dos picos Raman foram realizadas após deconvoluções usando funções gaussianos + lorentzianas por meio do software PEAKFIT. Para comparar a concentração relativa entre carotenoides e clorofila nas espécies, foi obtida a razão entre as áreas integradas dos modos vibracionais típicos dos mesmos.

### 3.3 Aquisição dos espectros de FTIR

#### 3.3.1 Preparação das amostras

A preparação das amostras para a aquisição dos espectros de FTIR foram os mesmos adotados no experimento de espectroscopia Raman. Contudo, após a remoção do líquido sobrenadante na última etapa, uma gota a massa de microalga foi depositada no cristal de diamante do módulo de ATR do espectrômetro de FTIR. A decréscimo do excesso de água na massa de microalga foi acompanhada por meio dos espectros de FTIR.

#### 3.3.2 Instrumentação

As experiências de FTIR foram realizadas usando um espectrômetro Bruker (modelo Vertex 70). A análise foi realizada usando o módulo de refletância total atenuada – ATR. A média das medidas foi de 96 varreduras, aos quais foram realizadas em uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  no intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.3 Processamento dos dados

Foram utilizados vários softwares para fazer a normalização e a linha de base dos espectros de FTIR. O espectro de todas as microalgas mostrou bandas de absorção semelhantes na faixa de 900 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos foram atribuídos a diferentes grupos moleculares com base em padrões bioquímicos e estudos anteriores [4,24,25,53,112]. Para minimizar a flutuação da absorção da banda devido à espessura não homogênea da amostra, a banda na região ao redor de 1650  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I), atribuída às vibrações de estiramento típicos da proteína  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , foi escolhida como pico de referência interno para a avaliação do conteúdo de lipídios e de carboidratos em relação à proteína. Foram identificadas bandas de absorção a 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas à vibração de estiramento  $\nu(\text{C-H})$  nas cadeias acyl. Esta banda, típica dos lipídeos, foi usada para quantificar o conteúdo lipídico relativo à Amida I. A banda ao redor de 1000 – 1190  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizada como vibrações típicas de estiramento polissacarídeos  $\nu(\text{C-O-C})$ , foi usada para quantificar o teor relativo de carboidratos.

### **3.4 Aquisição dos espectros de UV-VIS**

#### **3.4.1 Preparação das Amostras - Extração de pigmentos em acetona**

Antes do processo de extração, o meio de cultura contendo as diferentes espécies de microalgas foram diluídas em BG11 de modo a atingirem a mesma concentração de microalgas. Para a aferição da concentração, um feixe de luz de um LED vermelho (635nm) foi incidido sobre a amostra e a intensidade da luz transmitida foi medida. A extração de pigmentos em acetona 100% [108-111] foi realizada da seguinte forma: as microalgas foram centrifugadas em um frasco Eppendorf de 1,5 mL a 10000 rpm durante 5 minutos. Após esse período o sobrenadante foi removido e substituído por 1,5 ml de acetona pura. Em seguida, os Eppendorf com a mistura de algas e acetona foram submetidas a agitação constante em um banho ultrassônico por de 30 minutos [108-111]. Após essa etapa, o conteúdo foi novamente centrifugado nas mesmas condições descritas na primeira etapa. O líquido verdoso obtido para cada microalga foi submetido ao espectrofotômetro UV-VIS em uma cubeta de quartzo. Para remover a linha de base espectral do solvente, foi utilizado como referência uma cubeta contendo acetona pura.

#### **3.4.2 Instrumentação**

Os espectros de absorção óptica foram obtidos à temperatura ambiente usando um espectrofotômetro UV-Vis-NIR de duplo feixe (Shimadzu UV 2600), operado no intervalo de de 400 – 900 nm.

### **3.5 Método gravimétrico (conteúdo lipídico total)**

O conteúdo lipídico foi determinado pelo método tradicional gravimétrico [104]: Nesse processo, 30 ml de meio de cultura contendo microalgas de cada espécie foi centrifugados, secado e pesado. A massa seca foi misturada com 1mol/L de HCL e aquecida em banho-maria a 80 °C por 30 min, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Finalmente, a extração lipídica foi realizada pelo método de Bligh-Dyer [113].

Nesse processo, uma solução mista contendo 6 ml de metanol: clorofórmio 2:1 foi adicionada a massa de contendo microalgas que em seguida foi submetida a um oscilador de vórtice até que o resíduo se tornasse branco. Após 4 horas de decantação, a camada de metanol (superior) foi descartada, a camada de clorofórmio (inferior) com o conteúdo de lipídios foi seca, pesada e comparada com o peso da massa seca para obter a porcentagem de concentração dos lipídeos.

# Capítulo 4

## Resultados e Discussões

### 4.1. Espectroscopia Raman

A Fig. 22 (a) mostra os espectros Raman Ressonante médios (excitadas com a linha 405 nm) de três diferentes espécies de microalgas (CO, CA e NN). Os espectros Raman da microalga NN, excitados com as linhas 405 e 532 nm, são mostrados na Fig. 22 (b). É importante ressaltar que, em ambas as linhas de excitação, os espectros Raman das microalgas CO e CA seguem o mesmo comportamento observado para a microalga NN. Para comparação, o espectro de clorofila *a*, obtido com a linha de 405 nm, também é mostrado na Fig. 22 (b). Observe que os espectros Raman das três diferentes espécies de microalgas são dominados por picos Raman característicos dos carotenoides, com os modos de deformação fora do plano da ligação C-H em torno de  $962\text{ cm}^{-1}$  ( $(CH)_{wagging}$ ), balanço do grupo metil (C-CH<sub>3</sub>) em  $\sim 1005\text{ cm}^{-1}$  e estiramentos das ligações C=C e C-C em  $\sim 1157$  e  $1527\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Comparando os espectros Raman obtidos com as linhas 405 e 532 nm (Fig. 22 (b)) verifica-se que, de modo geral, os espectros Raman apresentam as mesmas características. Contudo, algumas importantes modificações são observadas, como, por exemplo, o surgimento de picos em  $985$ ,  $1553$  e  $1610\text{ cm}^{-1}$  e o aprimoramento das bandas localizadas na região de  $1250 - 1500\text{ cm}^{-1}$ . Uma comparação entre os espectros Raman das microalgas e o espectro Raman da clorofila *a*, quando obtidos com a linha 405 nm (excitação na condição de pré-ressonantes com a banda de absorção Soret, localizada em torno de 420 nm),

demonstra que o aprimoramento dos sinais Raman da clorofila presentes nas microalgas são os responsáveis pelas mudanças observadas [114]. Um resumo das principais atribuições dos picos Raman para as três microalgas pode ser encontrado na Tabela 2.

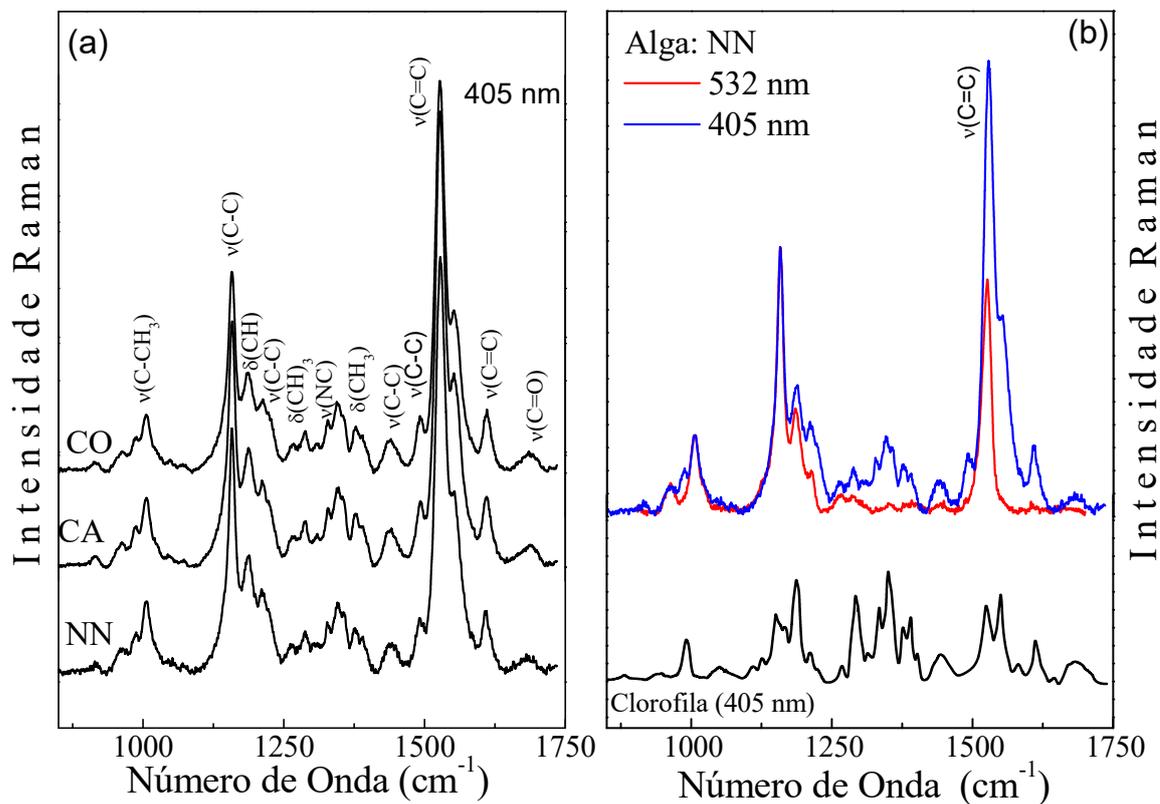


Fig. 22: (a) Espectros Raman das microalgas CO, CA e NN obtidos com a linha de excitação 405 nm. (b) Espectros Raman da microalga NN obtido com as linhas de excitação 405 e 532 nm. O espectro da clorofila, obtido com a linha 405 nm também é mostrado.

Tabela 2. Atribuições dos modos vibracionais Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) das microalgas CO, CA e NN obtidos com a linha de excitação 405 nm.

Microalgas			Atribuições	Biomoléculas
CO	CA	NN		
913	914	907	$\nu(\text{N}-\text{C}-\text{C})$ , $\delta(\text{C}-\text{C}-2\text{C})$	Cl <i>a</i>
962	962	962	$(\text{CH})_{\text{wagging}}$	
986	986	986	$\delta(\text{CH})$ , $\delta(\text{C}-\text{C}-\text{C})$	Chl <i>a</i>
1006	1006	1006	$\delta(\text{C}-\text{CH}_3)$ , $\nu(\text{C}-\text{C})$	Carot.
1158	1158	1158	$\nu(\text{C}-\text{C})$ , $\delta(\text{CH})$	Carot.
1187	1188	1187	$\delta(\text{CH})$ , $\delta(\text{CH})$	Carot.
1213	1213	1212	$\nu(\text{C}-\text{C})$ ; $\delta(\text{CH})$	Carot.
1227	1227	1226		
1266	1267	1264		Carot.
1287	1287	1287	$\delta(\text{CH}_3)$ , $\delta(\text{CH})$ , $\nu(\text{C}-\text{N})$	Carot./Cl <i>a</i>
1328	1328	1328	$\nu(\text{N}-\text{C})$	Cl <i>a</i>
1345	1345	1345	$\delta(\text{CH}_3)$ , $\delta(\text{CH})$ , $\nu(\text{N}-\text{C})$	Cl <i>a</i>
1357	1357	1358		Cl <i>a</i>
1378	1378	1377		
1389	1389	1390	$\delta(\text{CH})$ ; $\delta(\text{CH}_3)$ ; $\nu(\text{N}-\text{C})$	Cl <i>a</i>
1437	1437	1437	$\nu(\text{C}-\text{C})$ , $\delta(\text{CH}_3)$	Cl <i>a</i>
1491	1491	1491	$\nu(\text{C}-\text{C})$ , $\delta(\text{CH}_3)$	Cl <i>a</i>
1528	1528	1528	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Carot.
1555	1555	1554	$\nu(\text{C}-\text{C})$	Cl <i>a</i>
1611	1611	1609	$\nu(\text{C}=\text{C})$	Cl <i>a</i>
1681	1675	1677	$\nu(\text{C}=\text{C})$	

Com base na discussão acima pode se concluir que os espectros Raman das microalgas de diferentes espécies são sensíveis ao comprimento de onda de excitação e sua composição e, por essa razão, podem ser úteis na diferenciação e caracterização das mesmas. Contudo, devido à grande similaridade entre os espectros Raman das três diferentes espécies de microalgas (ver Fig 23), deve-se primeiramente determinar se os espectros Raman podem ser, de fato, utilizados para a diferenciação das mesmas. Para tanto, foram empregadas no estudo dos espectros Raman, ferramentas de análise estatística multivariacional. Por permitir apresentar as principais informações espectrais em um conjunto de componentes principais (PC's) a técnica escolhida foi a PCA (Análise de Componentes Principais). Na análise das PC's, o agrupamento de pontos e as características dos picos Raman, associados aos

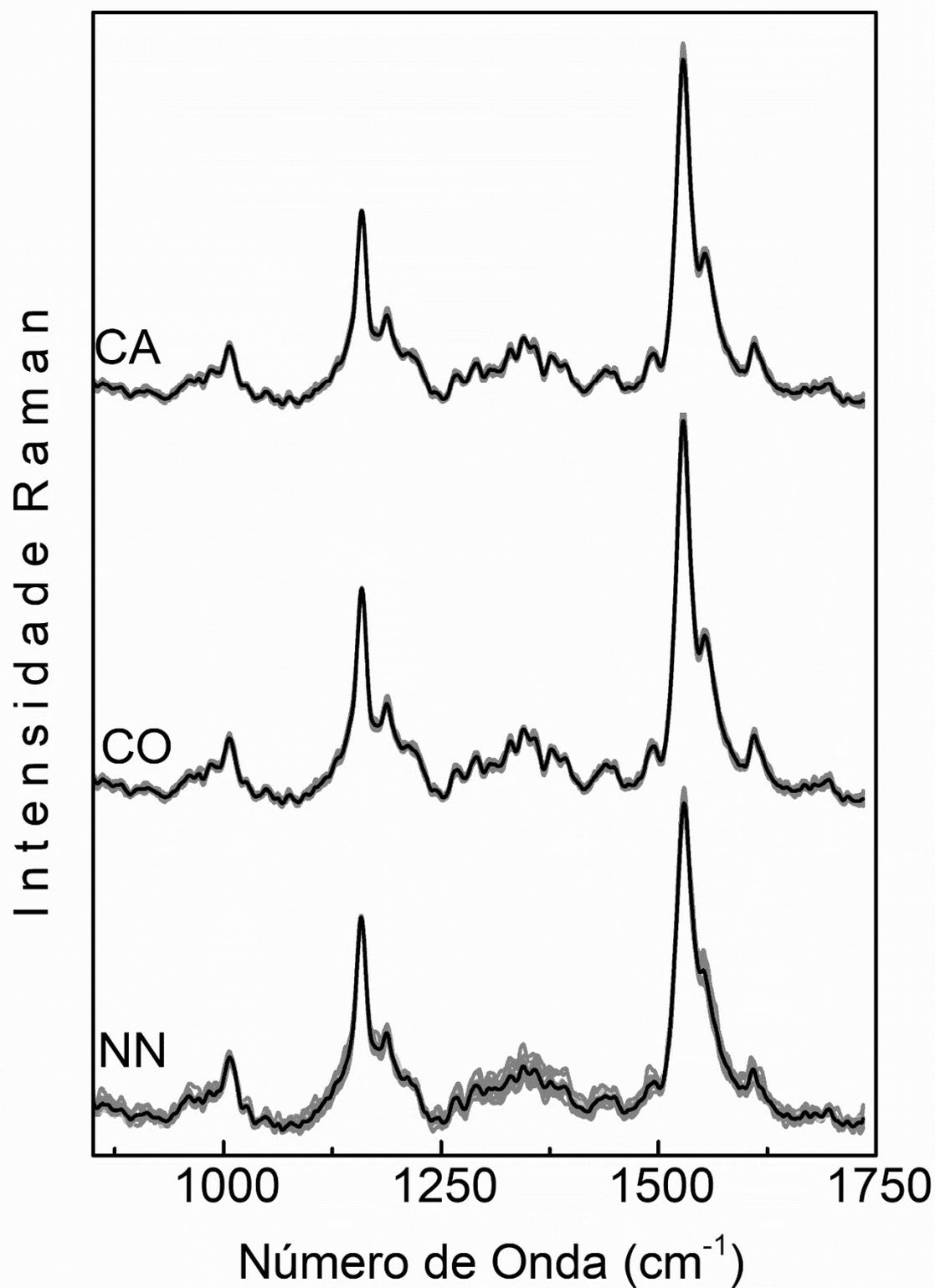


Fig. 23: Espectros Raman das três espécies de microalgas (CO, CA e NN), obtidos com a linha 405 nm. As linhas em preto mostram as médias espectrais

diferentes conjuntos de dados, é visualizado como escores de PCA e gráficos de pesos de carregamento (*loading weights - LW*), respectivamente. Mais detalhes da técnica de PCA podem ser encontrados na seção 2.9. Os espectros Raman foram modelados para determinar os escores das PCA's e os pesos de carregamento das três diferentes espécies de microalgas. Os escores obtidos nas PC1, PC2 e PC3 foram usadas para classificar as diferentes espécies de microalgas (ver Fig. 24). Ao mesmo tempo, algumas características espectrais Raman provenientes das diferenças entre três células de algas, foram obtidas com por meio *LW* 1, 2 e 3 do modelo PCA (ver Fig. 25).

A matriz de covariância foi construída a partir de espectros Raman obtidos em triplicata. Sendo que cada conjunto de dados foi obtido em 3 diferentes experimentos (onde um experimento é definido como sendo o período de cultivo das microalgas – 7 dias). Cada conjunto de dados é constituído por 39 espectros Raman (13 espectros para cada espécie de microalgas), gerando assim 117 espectros Raman (39 para cada espécie de microalgas). Todos os espectros foram normalizados segundo suas áreas espectrais integradas no intervalo de  $850 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ . Um exemplo típico da variância espectral é mostrado na Fig. 23. As linhas em preto mostram as médias espectrais.

A Fig. 24 (a) – (c) mostra as dispersões de pontos utilizando as três primeiras PC's para 3 diferentes experimentos (1 semanas de cultivo para cada experimento), as quais apresentam variância superior a 98 %. Verifica-se na Fig. 24(a) – (d), que independentemente do conjunto de dados obtido (1º (a), 2º (b), 3º (c) semanas ou todas as semanas em conjuntos (d)), há a formação de grupo de pontos bem definidos no espaço das PC's correspondendo às microalgas CO, CA e NN. Esse resultado permitiu afirma que a análise não supervisionada, usando as três primeiras PC's, permitiu discriminar a espécie NN das espécies CA e CO com precisão superior a 99% e discriminar a espécie CO da CA com precisão superior a 98 %.

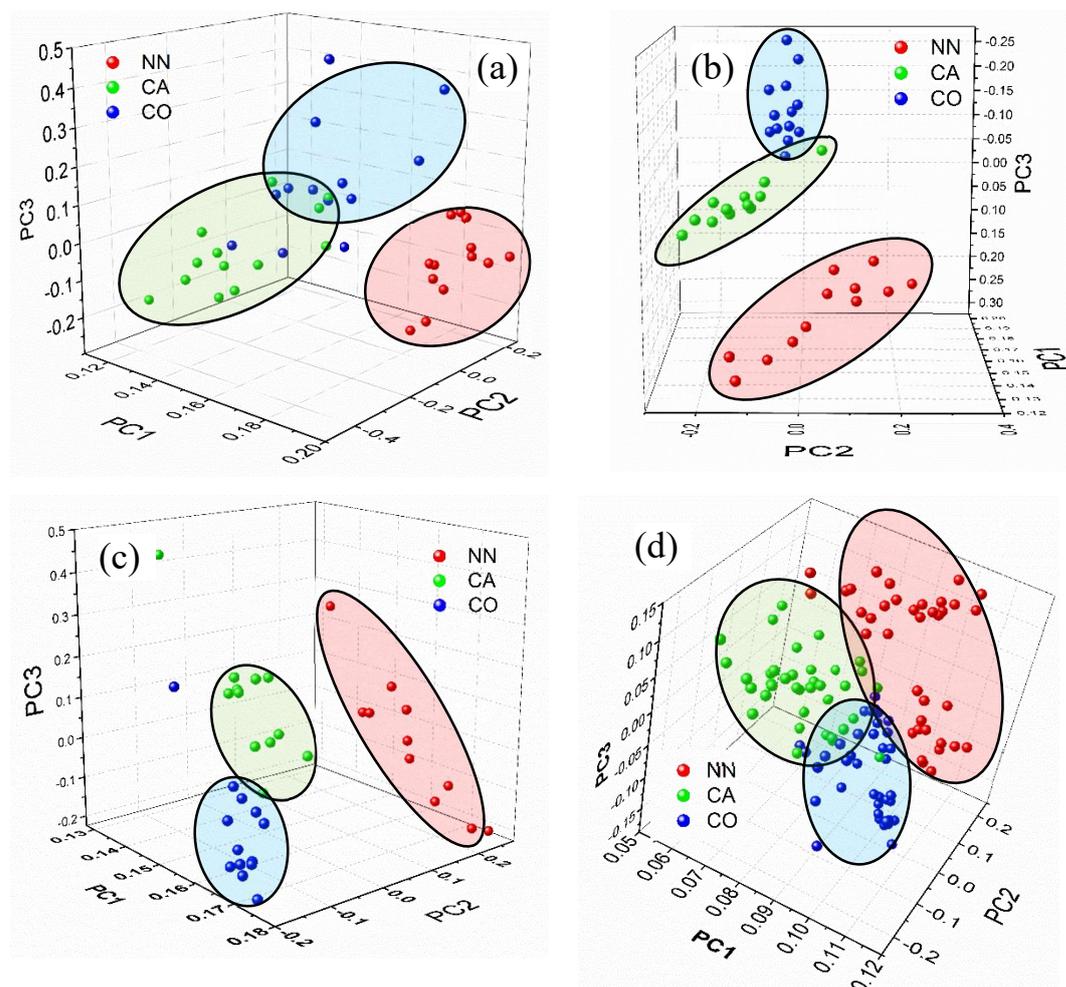


Fig. 24: PCA dos 3 grupos de microalgas (NN: pontos vermelhos, CA: pontos verdes e CO: pontos azuis) obtidos em três diferentes semanas ((a)-(c)). Em (d) é mostrado os dados obtidos para as 3 semanas.

Os espectros Raman normalizados das diferentes espécies de microalgas evidenciam pequenas diferenças. As variações espectrais podem claramente ser observadas nos espectros médios (Fig. 22 e 23) e no gráfico de pesos de carregamento ( $LW$ ) (Fig 25). As projeções máximas de  $LW$  dos espectros Raman, mostrada na Fig. 25 (i), evidencia que as maiores variações espectrais se concentram nas energias vibracionais em torno de 1006, 1150 – 1190 e 1520 – 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Como pode ser observado na Tabela 2, todas essas regiões são atribuídas às vibrações provenientes das moléculas de carotenoides. Em complemento, praticamente não se verifica alterações de intensidades na região da clorofila (1250 – 1450  $\text{cm}^{-1}$ ). Dessa forma, é possível estimar o teor relativo de carotenoides com relação ao teor de clorofilas presentes nas três diferentes espécies de microalgas, por meio da razão entre as intensidades

integradas dos modos vibracionais típicos dos carotenoides e das clorofilas. No cálculo dessa razão, a intensidade espectral integrada dos diferentes picos Raman associados aos carotenoides foi dividida pela intensidade integrada do pico em  $1328\text{ cm}^{-1}$ , atribuído a vibração  $\nu(\text{N-C})$  da clorofila (Fig 25 (ii)). Esses resultados são mostrados no topo da Fig 25 (iii). Tomando a média sobre as razões das intensidades integradas dos picos Raman provenientes dos carotenoides e da banda  $\nu(\text{N-C})$  da clorofila (Fig. 25 (b)) foi possível inferir que o teor de carotenoides com relação ao teor de clorofila é 53 % maior na microalga NN, quando comparada com a microalga CO e 37 % superior com a observada na microalga CA.

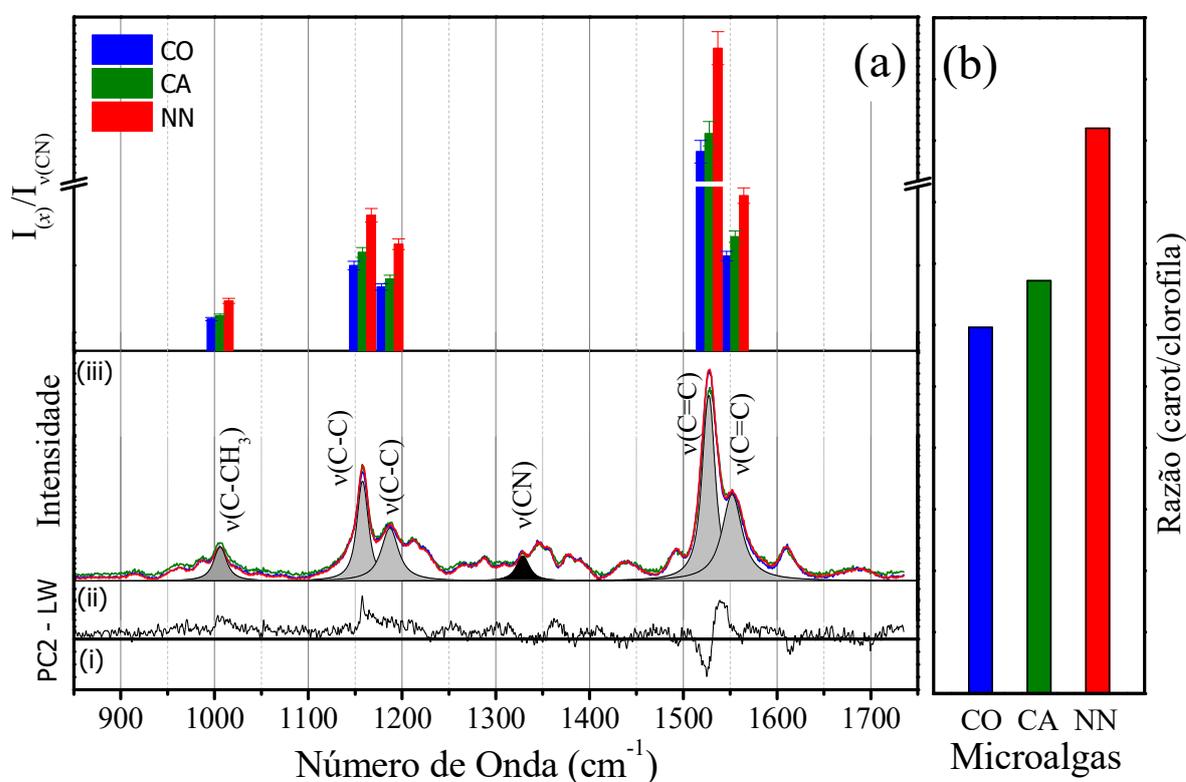


Figura 25: (a) (i) Gráfico de carregamento de peso obtido na região de  $850\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$  gerado a partir dos espectros Raman (117 espectros) das três diferentes espécies de microalgas (NN, CO e CA) (i). Sobreposição dos espectros Raman da microalga CO, CA e NN (ii) e Razão entre as intensidades integradas de cinco diferentes bandas Raman associadas aos modos vibracionais dos carotenoides e a banda Raman da vibração  $\nu(\text{C} - \text{N})$  associada a clorofila. (b) Razão entre as áreas integradas  $A_{\text{carot}}/A_{\nu(\text{CN})}$

## 4.2. Espectroscopia UV-VIS

Com o objetivo de aferir a confiabilidade dos teores relativos de carotenoides e clorofilas, obtidos por espectroscopia Raman ressonante, medidas de absorção de luz na região UV-VIS foram realizadas nos pigmentos extraídos das diferentes espécies de microalgas. Detalhes do procedimento de extração podem ser encontrados na seção 3.4.1.

A determinação quantitativa dos teores de carotenoides e clorofilas *a* e *b* em pigmentos extraídos de algas e plantas verdes pela técnica de absorção de luz UV-VIS não é simples, pois depende de diversos parâmetros tais como: preparação das amostras, solvente utilizado para a extração dos pigmentos e da instrumentação utilizada [115]. Dessa forma, alguns trabalhos propõem diferentes equações empíricas, as quais dependem do solvente empregado ou da resolução do espectrômetro utilizado [115,116]. Além do mais, dependendo do sistema selecionado, os vários pigmentos absorvem a luz em regiões espectrais sobrepostas, dificultando assim a análise [115]. Apesar dessas dificuldades, existem na literatura vários trabalhos determinando os teores de carotenoides e clorofilas em diferentes sistemas utilizando a técnica de absorção óptica [115, 117-119]. Assim, tomando como base esses trabalhos, a absorção de luz UV-VIS foi utilizada para estimar os teores de carotenoides e clorofilas *a* e *b* nas diferentes espécies de microalgas aqui estudadas.

Espectros de absorção óptica, normalizados pela intensidade da banda em 432 nm, característica das amostras de pigmentos extraídos das três diferentes espécies de microalgas são mostrados na Fig. 26 (a). Para comparação, os espectros de absorção óptica, provenientes dos carotenoides e das clorofilas *a* e *b* isolados, também são mostrados. É importante ressaltar que esses espectros foram recuperados a partir da adaptação de espectros de absorção óptica apresentados na literatura [115,117,119-122].

Observa-se da Fig. 26 (a) que os espectros de absorção dos pigmentos extraídos das microalgas CO e CA, quando comparados com o espectro da microalga NN exibem pequenas, mais notáveis diferenças. As principais diferenças são o decréscimo da absorbância e a ausência de assimetria das bandas em torno de 450 e 660 nm, respectivamente. Esse comportamento é explicado levando-se em conta que a microalga *Nannochloropsis oceanica* (NN) não possui em seu conteúdo a clorofila *b*, portando, parte da absorção dessas regiões são suprimidas [118].

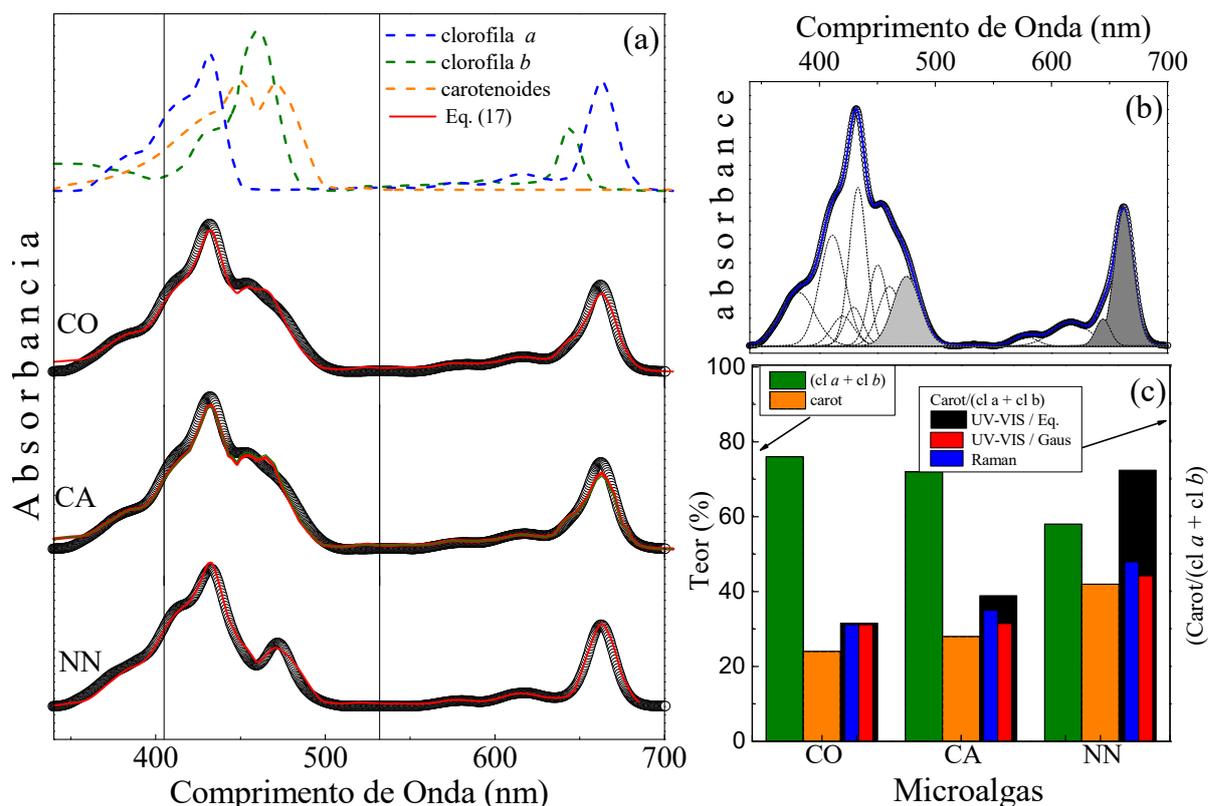


Fig. 26. (a) Espectros de absorção óptica dos pigmentos extraídos das microalgas CO, CA e NN. As linhas tracejadas no topo do painel representam aos componentes espectrais de absorção dos carotenoides e das clorofilas *a* e *b*, usados na Eq. 17 (linhas vermelhas). Esses espectros foram adaptados das referências [115,117,119-122]. As linhas verticais em 405 e 532 nm marcam os comprimentos de onda de excitação utilizados nos experimentos de espectroscopia Raman ressonante. Em (b) é mostrado o espectro de absorção óptica da microalga CO ajustado com curvas gaussianas. Em (c) são mostradas comparações entre os teores de carotenoides (Carot – barras laranjas) e clorofila ((Cl *a* + Cl *b*) - barras verdes) e as razões (Teor Carot/(Cl *a* + Cl *b*) – barras pretas) obtidos a partir dos ajustes. Para comparação, as razões  $A_{\text{carot}}/A_{V(\text{CN})}$ , obtidas por espectroscopia Raman é mostrado pelas barras em azuis.

Com o objetivo de estimar os teores relativos entre as diferentes componentes dos pigmentos extraídos das três espécies de microalgas, inicialmente fez-se uso do procedimento adotada nas referências 119 e 122. Para isso, foi considerado que os espectros de absorção dos pigmentos extraídos das microalgas CO, CA e NN são descritos pela soma das diferentes bandas de absorção relativas aos componentes isoladas (carotenoides (Carot), clorofila *a* (Cl *a*) e clorofila *b* (Cl *b*)), mediadas sobre seus teores relativos (Eq. 17)

$$\text{Abs.} = A \cdot \text{Carot} + B \cdot \text{Cl } a + C \cdot \text{Cl } b \quad (17)$$

Os resultados desses ajustes são mostrados pelas linhas vermelhas na Fig. 26 (a), enquanto os parâmetros A, B e C, os quais representam os teores absolutos de Carotenoides e Clorofilas *a* e *b*, bem como a razão Carot/(Cl *a* + Cl *b*), são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Estimativas dos teores de carotenoides relativos aos teores de clorofila, obtidos por três diferentes metodologias. Dois deles, a partir dos espectros de absorção UV-VIS: 1) Soma dos espectros de absorção óptica das componentes individuais de carotenoides e clorofilas *a* e *b*. Linhas vermelhas na Fig 26 (a). 2) Ajuste dos espectros de absorção óptica usando equações gaussianas. 3) A terceira estimativa foi baseada na Razão entre as áreas integradas  $A_{\text{carot}}/A_{\text{v(CN)}}$  obtidas dos espectros Raman.

Amostras	UV - VIS				Ajuste gaussiano	Raman
	A*Carot+ B*Cl <i>a</i> + C*Cl <i>b</i>					Carot/(CN)
	A	B	C	Carot/(Cl <i>a</i> + Cl <i>b</i> )		
CO	0,51	0,25	0,24	0,31	0,31	0,31
CA	0,47	0,25	0,28	0,39	0,35	0,32
NN	0,58	0	0,42	0,72	0,48	0,44

Pode-se verificar da Fig. 26 (a) que os ajustes, utilizando as Equação 17, e seus respectivos parâmetros (Tabela 3) descrevem relativamente bem os espectros de absorção óptica provenientes dos pigmentos extraídos das microalgas CO, CA e NN. Por meio desses ajustes foi possível estimar o teor de carotenoides e clorofilas *a* e *b*, presentes nas microalgas. Esses resultados são mostrados na Tabela 3 (colunas 2 – 4) e na Fig. 26 (b) (barras verdes para (cl *a* + cl *b*) e barras laranjas para os carotenoides). As barras em preto mostram as razões entre os teores de carotenoides e soma dos teores das clorofilas *a* e *b* (carot/(cl *a* + cl *b*)). Para comparação, as razões ( $A_{\text{Carot}}/A_{\text{(Cl } a + \text{Cl } b)}$ ), obtidas por espectroscopia Raman, é mostrado pelas barras azuis. Por questão de comparação os valores de ambas as razões foram normalizados pelo valor encontrado para a microalga CO. Note que, embora a Eq. 17 descreva bem os espectros de absorção óptica (linhas vermelhas na Fig 26 (a)), os valores obtidos para as razões carot/(cl *a* + cl *b*), por meio dessa equação não concordam muito bem com os valores obtidos por espectroscopia Raman. Assim sendo, um procedimento análogo ao utilizado na discussão dos espectros Raman foi empregado. Nesse caso os espectros UV-VIS foram ajustados usando curvas gaussianas (Ver Fig 26 (b)) e as intensidades integradas da banda associado aos carotenoides (cinza claro) foi dividida pela intensidade integrada das bandas associadas às clorofilas *a* e *b* (cinza escuro). Os resultados desse procedimento são mostrados na Tabela 3 e na Fig. 26 (c) (barras em vermelho). Dessa forma, uma comparação entre os valores obtidos para a razão carot/(cl *a* + cl *b*) pelas técnicas de UV-VIS (barras vermelhas) e Raman (barras azuis) apresentam excelente concordância. Portanto, levando-se em conta as incertezas e as dificuldade de se determinar pela técnica de absorção óptica os

teores relativos dos diferentes pigmentos presentes nas microalgas a espectroscopia Raman pode ser uma boa alternativa para se fazer comparações simples e rápidas entre diferentes espécies de microalga ou diferentes condições de crescimento para uma mesma espécie de microalga.

### 4.3. Espectroscopia de FTIR

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é, assim como a espectroscopia Raman, uma espectroscopia vibracional molecular capaz avaliar os grupos funcionais químicos e, conseqüentemente, a composição molecular de uma determinada substância. Assim, os grupos moleculares específicos podem ser identificados por suas bandas de absorção, permitindo quantificar macromoléculas (incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos, etc.). Contudo, devido às diferentes energias de excitação as respostas espectroscópicas dos constituintes podem ser diferentes. Como demonstrado anteriormente, os espectros Raman de microalgas são dominados por modos vibracionais provenientes dos pigmentos (carotenoides e clorofilas) presentes nas microalgas. No entanto, diferentemente das espectroscopia Raman, os espectros de infravermelho das mesmas microalgas são dominados por grupos funcionais provenientes dos lipídios, proteínas e carboidratos, as quais possuem energias de absorção característicos em diferentes regiões de frequência do espectro infravermelho médio, oferecendo ao FTIR o potencial de ser uma ferramenta eficaz para o monitoramento de composições bioquímicas de microalgas [24] Assim, nessa seção, a espectroscopia de FTIR foi utilizada para determinar o teor de lipídios e carboidratos com relação ao teor das proteínas em três diferentes espécies de microalgas (CO, CA e NN).

A Fig. 27 mostra os espectros de FTIR das três diferentes espécies de microalgas aqui estudadas (CO CA e NN). As proteínas são caracterizadas por duas fortes bandas em torno de 1645 e 1540  $\text{cm}^{-1}$ . Essas bandas são associadas o modo de estiramento da ligação C=O e uma combinação da deformação da ligação N-H e estiramento C-N das vibrações do complexo amida, respectivamente. Os lipídios são caracterizados por dois conjuntos de fortes bandas, estiramentos das ligações CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> na região de 2850–3000  $\text{cm}^{-1}$  e modos do C=O associados à cadeia lateral do grupo éster carbonil em 1740  $\text{cm}^{-1}$ . Por último, as bandas

localizadas na região de 1000–1250  $\text{cm}^{-1}$  correspondem às vibrações dos carboidratos e fosfolipídios. A Tabela 4 mostra uma tentativa de atribuição das principais bandas de absorção. As atribuições estão de acordo as referências [53,123,124].

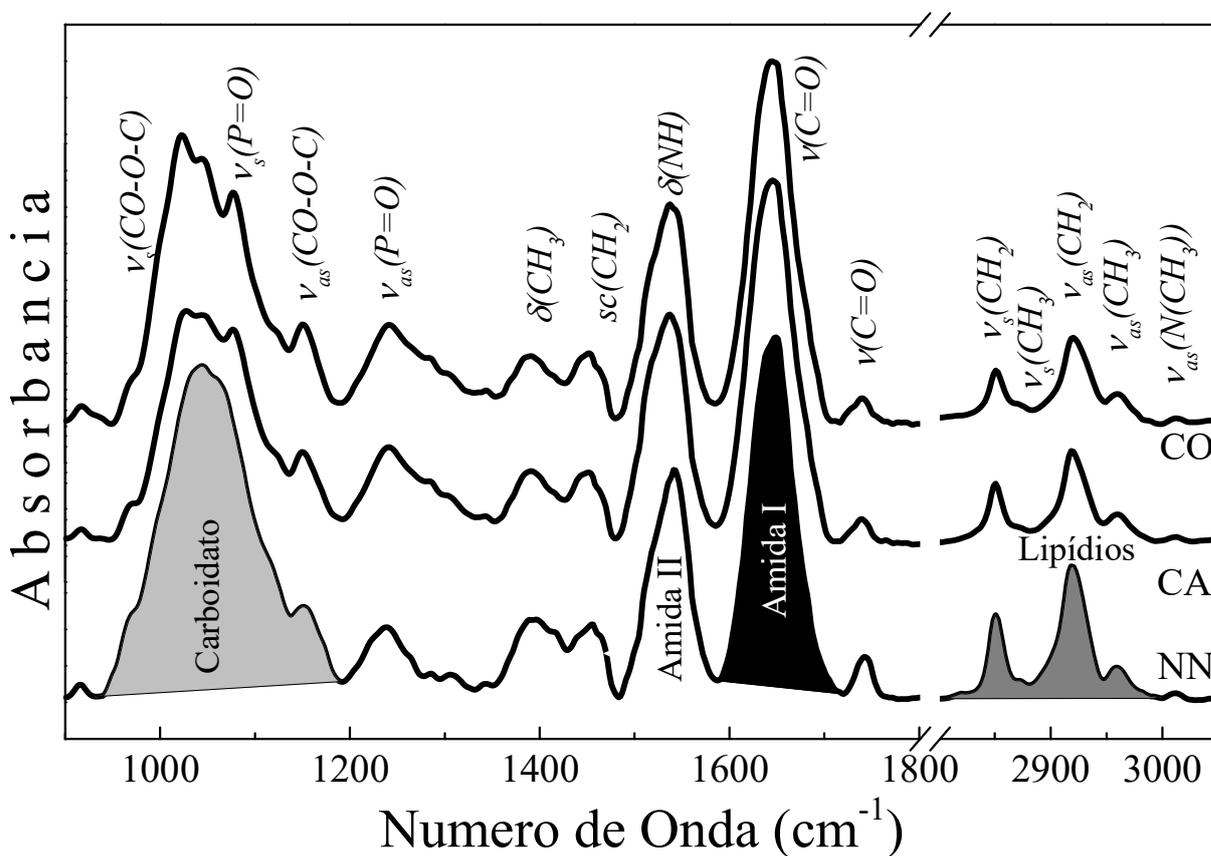


Figura 27: Espectro de FTIR das três espécies de microalgas (CA, CO e NN). A banda atribuída à Amida I (em preto) foi escolhida como um pico de referência interno para a avaliação do conteúdo relativo de lipídios e carboidratos. As bandas de absorção nas regiões 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  (em cinza escuro) e 1000 – 1190  $\text{cm}^{-1}$  (em cinza claro) foram usadas para estimar os teores relativos de lipídios e carboidratos.

Tabela 4. Atribuições dos modos vibracionais ( $\text{cm}^{-1}$ ) das microalgas CO, CA e NN obtidos por FTIR

Microalgas			Atribuições	biomoléculas
CO	CA	NN		
966	966	965	$\nu(\text{N}(\text{CH}_3))$	fosfolípido
1024	1029	1017	$\nu_s(\text{C-O-C})$	Carboidratos
1051	1053	1036	$\nu_s(\text{P=O})$	fosfolípido
1154	1155	1156	$\nu_{as}(\text{C-O-C})$	Carboidratos
1241	1241	1238	$\nu_{as}(\text{P=O})$	fosfolípido
1392	1393	1397	$\delta(\text{CH}_3), \delta(\text{CH}_2)$	lipídios/proteínas
1451	1450	1455	$\nu_{sc}(\text{CH}_2)$	alifáticos
1542	1541	1543	$\nu(\text{CN}),$ amida II	proteínas
1645	1644	1645	$\nu(\text{C=O}),$ amida I	proteínas
1740	1740	1740	$\nu(\text{C=O})$	lipídios
2851	2851	2851	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	lipídios
2873	2875	2880	$\nu_s(\text{CH}_3)$	lipídios
2922	2922	2921	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$	lipídios
2960	2960	2960	$\nu_{as}(\text{CH}_3)$	lipídios
3010	3010	3010	$\nu(=\text{CH})$	lipídios

Assim como ocorreu no estudo por espectroscopia Raman, os espectros de FTIR apresentam características semelhantes. Portanto, para determinar se esses espectros possuem as características necessárias para a diferenciação e caracterização das microalgas, análise por componentes principais foi utilizada. Nesse estudo, para a construção da matriz de covariância foram adquiridos espectros de FTIR de 9 amostras para cada uma das espécies de microalga. Os resultados dessa análise são mostrados na Fig. 28. A variância espectral obtida foi superior a 96 %.

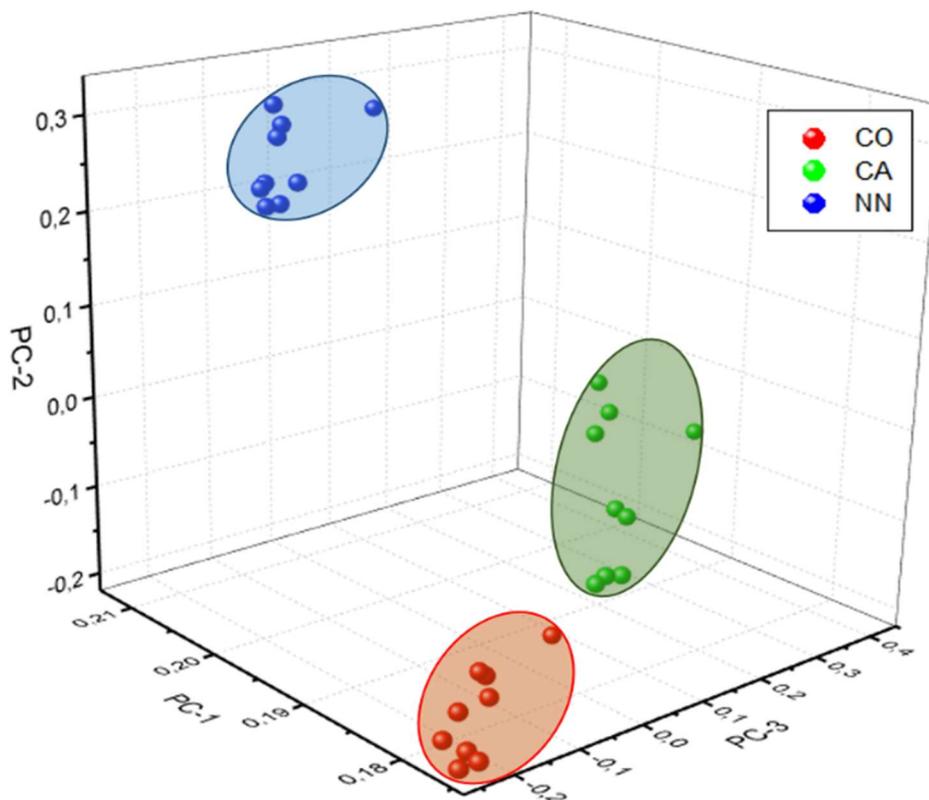


Fig. 28: PCA dos 3 grupos de microalgas (NN: pontos em azul, CA: pontos em verde e CO: pontos em vermelho).

O teor lipídico relativo foi determinado, usando a mesma metodologia adotada nas referências 24 e 78. Nesse procedimento, a banda de absorção da amida I é usada como um pico de referência interno para a avaliação do conteúdo de lipídios e de carboidratos em relação ao teor de proteínas. Uma comparação entre as intensidades integradas da banda de absorção da amida I, provenientes dos espectros de FTIR obtidas para as três espécies de microalgas, mostrou que as áreas da banda de amida I não varia mais que 3 % entre elas, justificando assim a escolha dessa banda. Assim, os teores lipídicos relativos foram determinados por meio da razão entre as intensidades integradas das bandas de absorção lipídica (2800 - 3000  $\text{cm}^{-1}$ ) com relação a intensidade integrada da banda de amida I (1580 – 1710  $\text{cm}^{-1}$ ) ( $A_{\text{lipídio}}/A_{\text{amida I}}$ ). Por sua vez, os teores relativos de carboidratos foram determinados por meio da razão entre as áreas integradas das bandas de absorção na faixa dos carboidratos (1000 – 1190  $\text{cm}^{-1}$ ) com relação a banda de amida I ( $A_{\text{carb}}/A_{\text{amida I}}$ ). Note que nessa região espectral também se encontram as bandas dos fosfolipídios. Contudo, por

questão coerência, foram seguidos os mesmos procedimentos descritos nas referências 24 e 78. Cálculos envolvendo somente as bandas dos carboidratos ( $1024$  e  $1154\text{ cm}^{-1}$ ) mostraram comportamento semelhante. Os resultados desses cálculos são mostrados na Fig. 29. Para os cálculos, foram considerados as médias espectrais dos 9 espectros adquiridos para cada espécie de microalga.

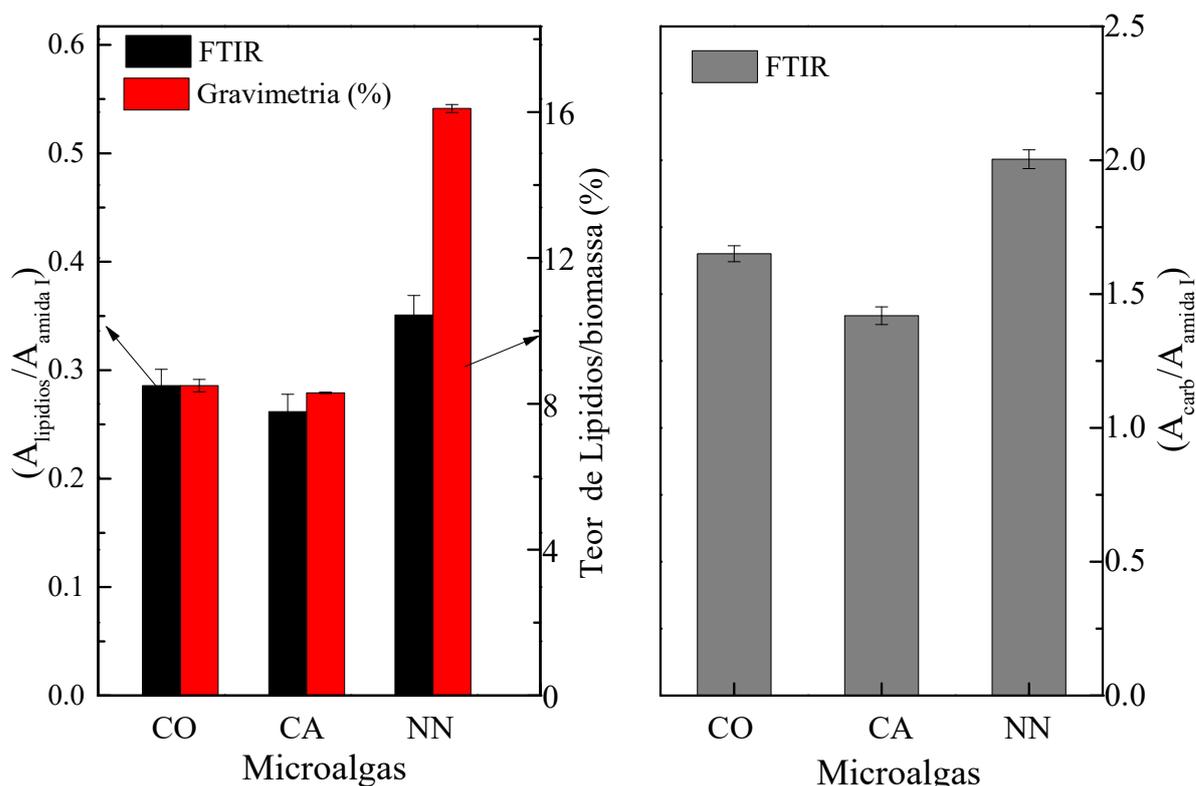


Fig. 29: (a) Teor lipídico relativo obtidos para as microalgas CO, CA e NN, por meio dos espectros de FTIR (razão  $A_{\text{lipídios}}/A_{\text{amida I}}$  -barras pretas) e pelo método gravimétrico (barras vermelhas). Os valores foram normalizados com relação ao teor lipídico da microalga CO. (b) Teor relativo de carboidratos obtidos para as microalgas CO, CA e NN, por meio dos espectros de FTIR.

A razão  $(A_{\text{lipídios}}/A_{\text{amida I}})$  forneceu valores de 0,28, 0,26 e 0,35, enquanto a razão  $(A_{\text{carb}}/A_{\text{amida I}})$  forneceu valores de 1,65, 1,42 e 2,00 para as microalgas CO, CA e NN, respectivamente. Assim, os espectros de absorção de FTIR mostrou que a espécie NN apresentou o maior teor lipídico relativo, seguido pela espécie CO. O menor teor lipídico foi observado para a espécie CA. A fim de aferir a consistência desses dados, o conteúdo lipídico foi avaliado pelo método gravimétrico (ver procedimento na seção 3.5). A análise gravimétrica mostrou um teor de 16,1%, do total de biomassa seca, para a microalga NN, e

de 8,5 % e 8,3% para as microalgas CA e CO, respectivamente. Uma comparação entre os teores lipídicos obtidos por FTIR e gravimetria é mostrada na Fig.29 (a).

Embora os valores obtidos pela razão lipídios/amida I tenha subestimado o teor de lipídios da amostra NN, o teor relativo de lipídios obtido pela espectroscopia de FTIR apresenta o mesmo comportamento do obtido por gravimetria. Esse resultado indica que a espectroscopia de FTIR pode ser usada para comparar de forma simples e rápida o teor de lipídios de diferentes espécies e microalgas ou de diferentes formas de cultivo. O resultado apresentado na Fig. 29 (a) estão de acordo com estudos prévios da literatura [125], onde foi constatado que microalgas de água salgada produzem um maior teor de lipídios que microalgas de água doce, mesmo quando são cultivadas nas mesmas condições. Um comportamento semelhante foi observado para o teor de carboidratos (Fig. 29 (b)), onde foi verificado que as microalgas de água salgada produzem relativamente um maior teor de carboidratos que as algas de água doce. Esse resultado também está de acordo com o descrito na literatura [24].

# Capítulo 5

## 5.1 Conclusões

Nesse trabalho as técnicas de espectroscopias Raman, infravermelho (FTIR) e UV-VIS foram utilizadas com sucesso na diferenciação e caracterização de três diferentes espécies de microalgas ((*Chlamydomonas sp.* (CA), *Chlorella sorokiniana* (CO) e *Nannochloropsis oceânica* (NN)). Os dados de espectroscopia Raman e de FTIR em conjunto com análise multivariacional evidenciaram que as três diferentes espécies de microalgas apresentam variações significativas de seus teores de carotenoides, lipídios e carboidratos. Por meio das variações espectrais, foi possível diferenciar e quantificar os teores relativos de carotenoides, lipídios e carboidratos. A análise por componentes principais dos dados Raman e de FTIR permitiu discriminar a espécie NN das espécies CA e CO com precisão superior a 99% e discriminar a espécie CO da CA com precisão superior a 98 %. Em complemento, as médias espectrais, tomadas sobre as razões das intensidades integradas dos picos Raman provenientes dos carotenoides e da banda  $\nu(\text{N-C})$  da clorofila permitiu inferir que o teor de carotenoides com relação ao teor de clorofila é 53 % maior na microalga NN, quando comparada com a microalga CO e 37 % superior com a observada na microalga CA. Esse resultado apresentou uma boa concordância com os valores obtidos por absorção óptica UV VIS. Em complemento a espectroscopia Raman, a espectroscopia de FTIR também apresentou sensibilidade para a diferenciação e caracterização das microalgas aqui estudadas. A análise por componentes principais dos espectros de FTIR permitiu diferenciar os espectros com precisão superior a 96 %. Além do mais, por meio da espectroscopia FTIR foi possível comparar os teores relativos de lipídios e carboidratos em relação às proteínas presentes nas microalgas CO, CA e NN. Os dados mostraram que a espécie NN apresentou o maior teor lipídico relativo, seguido pela espécie CO. O menor teor lipídico foi observado para a espécie CA. Um comportamento semelhante foi observado para os teores relativos de carboidratos.

## 5.2 Perspectiva de trabalhos futuros

Considerando a experiência obtida a partir do cultivo das microalgas e da caracterização bioquímica utilizando técnicas espectroscópicas, cabe ressaltar que em trabalhos futuros seria interessante fazer as medições em diferentes dias de cultivo. Isso com a finalidade de obter curvas de crescimento para cada uma das microalgas e assim determinar se as microalgas desenvolvem os teores de lipídios e carotenoides de uma forma contínua. Também, a partir desse estudo poderia se saber se é possível diferenciar entre os espectros obtidos ao longo dos diferentes dias do cultivo.

Também, no sentido de saber os limites de concentração das biomoléculas, seria importante cultivar as microalgas com diferentes concentrações de nitrogênio para induzir o aumento de biomoléculas e determinar seus teores. Deste modo, se for possível, estabelecer uma relação entre concentração nitrogênio de biomoléculas para cada espécie.

Quantificar os carotenoides por outras técnicas químicas tradicionais como maceração, etc. para se ter uma forma de comparação diferente às técnicas espectroscópicas.

Finalmente, é de extrema importância avaliar outras espécies de microalgas de água doce e salgada para ter mais evidência da hipótese que as microalgas de água salgada produzem maior quantidade de ácidos graxos.

## Bibliografia

- [1] N. Parab, and V. Tomar, Raman spectroscopy of algae: a review. *J. Nanomed. Nanotechnol*, v.3, n. 24, p. 131-137, 2012.
- [2] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in biotechnology*, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- [3] J. Harwood and I. Guschina, The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 679-684, 2009.
- [4] A. Guedes, H. Amaro, and F. Malcata, Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, v. 9, n. 4, p. 625-644, 2011.
- [5] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, n.3, p. 294-306, 2007.
- [6] M. Griffiths, and S. Harrison, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.
- [7] J. Sheehan, *et al.*, A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. *National Renewable Energy Laboratory*, v. 328, p. 580-611, 1998.
- [8] A. Widjaja, C. Chien, and Y. Ju, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, n. 1, p.13-20, 2009.
- [9] M. Borowitzka, and L. Borowitzka, *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, 1988.
- [10] M. Borowitzka, Algal biotechnology products and processes matching science and economics. *Journal of applied phycology*, v. 4, n. 3, p. 267-279, 1992.
- [11] A. Richmond, Large scale microalgal culture and applications. *Progress in phycological research*, v. 7, p. 1-62, 1990.
- [12] L. LeMarchand, et al., Intake of specific carotenoids and lung cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, v. 2, n. 3, p. 183-187, 1993.
- [13] R. Ziegler, et al., Importance of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 88, n. 9, p. 612-615, 1996.
- [14] S. Villamizar, *Caracterização de carotenóides e lipídeos de microalgas in vivo utilizando espectroscopia Raman*. 2013. 74f. Dissertação de mestrado-Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2013.

- [15] R. Abou-Shanab, et al., Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass and bioenergy*, v. 35, n. 7, 3079-3085, 2011.
- [16] W. Farooq, et al., Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. *Bioresource technology*, v. 184, p. 73-81, 2015.
- [17] J. Hill, Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of sciences*, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.
- [18] S. Ríos, et al., Microalgae-based biodiesel: economic analysis of downstream process realistic scenarios. *Bioresource technology*, v. 136, p. 617-625, 2013.
- [19] E. Danielle, et al. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, v. 68, n. 3, p. 639-642, 2007.
- [20] K. Cooksey, 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.
- [21] J. Murdock, and D. Wetzel, FT-IR microspectroscopy enhances biological and ecological analysis of algae. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 44, n. 4, p. 335-361, 2009.
- [22] W. Huang, et al., Shining light on the microbial world: the application of Raman microspectroscopy. In *Advances in applied microbiology*. v. 70, p. 153-186, 2010.
- [23] V. Raman, and K. Krishnan, A new type of secondary radiation. *Nature*, v. 121, n. 3048, p. 501-502, 1928.
- [24] Y. Meng, et al., Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource technology*, v. 151, p. 347-354, 2014.
- [25] K. Stehfest, J. Toepel and C. Wilhelm. The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 43, n. 7, p. 717-726, 2005.
- [26] H. Wagner, et al., The use of FTIR spectroscopy to assess quantitative changes in the biochemical composition of microalgae. *Journal of biophotonics*, v. 3, n. 8-9, p. 557-566, 2010.
- [27] K. Stehfest, et al., Fourier transform infrared spectroscopy as a new tool to determine rosmarinic acid in situ." *Journal of plant physiology* v. 161, n. 2, p. 151-156, 2004.

- [28] Q. Tu, and C. Chang, Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 8, n. 5, p. 545-558, 2012.
- [29] J. Shlens, A tutorial on principal component analysis. *arXiv preprint arXiv*, 2014.
- [30] J. Cadoret, and O. Bernard, Lipid biofuel production with microalgae: potential and challenges. *Journal de la Société de Biologie*, v. 202, n. 3, p. 201-211, 2008.
- [31] V. Pasquet, et al., Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, v. 46, n.1, p. 59-67, 2011.
- [32] G. Boeuf, and J. Kornprobst, Biodiversite et chimiodiversite marines. *Biofutur*, v. 301, p. 28-32, 2009.
- [33] M. Bourguet-Kondracki, and J. Kornprobst, Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer's disease. *Marine Biotechnology II*, p. 105-131, 2005.
- [34] K. Cardozo, et al., Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.
- [35] L. Wang, and C. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.
- [36] Y. Ji, et al., Raman spectroscopy provides a rapid, non-invasive method for quantitation of starch in live, unicellular microalgae. *Biotechnology journal*, v. 9, n. 2, p. 1512-1518, 2014.
- [37] L. Tsung, J. Chang, and H. Wang, Rapid and in vivo quantification of cellular lipids in *Chlorella vulgaris* using near-infrared Raman spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 85, n. 4, p. 2155-2160, 2013.
- [38] M. Derrick, et al., *Infrared spectroscopy in conservation science*. Getty Publications, 2000.
- [39] O. Sala, *Fundamentos da espectroscopia raman no infravermelho*, Editora fundação para o desenvolvimento Unesp, 1996.
- [40] E. Smith, and G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*, Wiley, 2019.
- [41] *Measuring the size of a Molecule*. Disponível em <http://kaffee.50webs.com/Science/labs/Chem/Lab-Size.of.Molecule.html>. Acesso em: 15 dez. 2019.

- [42] *Explicacion de los espectros raman*. Disponível em <https://www.renishaw.es/es/explicacion-de-los-espectros-raman--25807>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- [43] J. Ferraro, *Introductory raman spectroscopy*, Elsevier, 2003.
- [44] R. Feynman, *The Character of Physical Law*, Cox and Wyman Ltd, 1965.
- [45] G. King, *Spectroscopy and Molecular Structure*, Rinehart and Winston, 1964.
- [46] H. Eyring, J. Walter, and G. Kimball, *Quantum chemistry*, 1944.
- [47] B. Robert, Resonance Raman spectroscopy. *Photosynthesis research*, v. 101, n. 2-3, p. 147-155, 2009.
- [48] A. Ruban, et al., Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, p. 450-465, 2007.
- [49] A. Albrecht, On the theory of Raman intensities. *The Journal of chemical physics*, v. 34, n. 5, p.1476-1484, 1961.
- [50] M. Ceccarelli, M. Lutz, and M. Marchi, A density functional normal mode calculation of a bacteriochlorophyll a derivative. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 14, p. 3532-3533, 2000.
- [51] A. Dokter, M. vanHemert and K. Hoef, Resonance Raman Spectrum of a ll-trans-Spheroidene. DFT Analysis and Isotope Labeling. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 106, n. 41, p. 9463-9469, 2002.
- [52] A. Wirtz, et al., Two stereoisomers of spheroidene in the Rhodobacter sphaeroides R26 reaction center: a DFT analysis of resonance Raman spectra. *Biophysical journal*, v. 93, n. 3, p. 981-991, 2007.
- [53] M. Giordano, et al., Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, v. 37, n. 2, p. 271-279, 2001.
- [54] Heraud, Philip, and Mark J. Tobin. The emergence of biospectroscopy in stem cell research. *Stem cell research* , v. 3, n. 1, p. 12-14, 2009.
- [55] A. Dean, et al., Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to differing concentrations of phosphorus: A combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. *Phycological research*, v. 56, n. 3, p. 193-201, 2008.
- [56] D. Sigee, et al., The influence of phosphorus availability on carbon allocation and P quota in *Scenedesmus subspicatus*: a synchrotron-based FTIR analysis. *Phycologia*, v. 46, n. 5, p. 583-592, 2007.

- [57] P. Heraud, et al., Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, v. 249, n. 2, p. 219-225, 2005.
- [58] P. Helmut, *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*, 1992.
- [59] A. Lordello, Espectroscopia I. Disponível em: <http://www.quimica.ufpr.br/paginas/ana-lordello/wp-content/uploads/sites/7/2017/08/aula-01-Introdu%C3%A7%C3%A3o-a-M%C3%A9todos-Espectrosc%C3%B3picos.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2019.
- [60] Espectroscopia ultravioleta-visible (*UV-Vis*). Disponível em: <https://www.jove.com/science-education/10204/espectroscopia-ultravioleta-visible-uv-vis?language=Spanish>. Acesso em: 22 nov. 2019.
- [61] J. Silva, Espectrofotometria UV-Vis. Disponível em: <http://www.ufjf.br/baccan/files/2010/10/Aula-2-UV-Vis-1o-Sem-2018-parte-1.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2019.
- [62] H. Perkampus, *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [63] I. Franceschini, et al., *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Artmed Editora, 2009.
- [64] J. Graham, M. Graham, and L. Wilcos, *Algae*, Benjamin Cummings, 2008.
- [65] R. Andersen, *Algal Culture Techniques*. Elsevier, 2005.
- [66] L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, 2006.
- [67] T. saloglou, *Microalgae*. Caister Academic Press, 2016.
- [68] K. Hennenberg, et al., Aquatic biomass: sustainable bioenergy from algae. *Issue Paper*, v. 1, p.1-46, 2009.
- [69] X. Meng, et al., M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable energy*, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.
- [70] K. H. Cardoso. et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, v. 146, p. 60-67, 2007.
- [71] *National alliance for advanced biofuels and bioproducts*, tech. rep., U.S. Department of Energy, 2014.
- [72] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ.* vol. 14, p. 217-225, 2010.

- [73] H. Greenwell, et al., Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenge. *J. R. Soc. Interface*, v. 7, p. 703-715, 2010.
- [74] S. Scott, et al., Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Curr. Opinion Biotech.*, v. 21, p. 277, 2010.
- [75] S. Oncel. Microalgae for a macroenergy world. *Renew. Sustainable Energy*, v. 26, p. 241-255, 2013.
- [76] G. Possa, Desenvolvimento de fotobiorreator automatizado e dinâmica de crescimento de microalgas, 2017. Tese de doutorado. 93f. Universidade de Brasília, Brasília 2017.
- [77] El uso de probióticos en acuicultura. Disponível em: [https://web.archive.org/web/20090411064555/http://www.mapa.es/pesca/pags/jacumar/innovacion\\_tecnologica/primer\\_boletin\\_vigilancia\\_tecnologica\\_sector\\_acuicola.pdf](https://web.archive.org/web/20090411064555/http://www.mapa.es/pesca/pags/jacumar/innovacion_tecnologica/primer_boletin_vigilancia_tecnologica_sector_acuicola.pdf). Acesso em: 18 out. 2019.
- [78] A. Dean, *et al.*, Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource technology*, v. 101, n. 12, p. 4499-4507, 2010.
- [79] D. Adams, and W. Adams, Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2149-2153, 2002.
- [80] O. Fennema, S. Damodaran, and K. Parkin, Introduction to food chemistry. *Fennema's Food Chemistry*, v. 1, p. 1-16, 2017.
- [81] B. Halliwell, and J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, 2015.
- [82] H. El-Baky, F. I-Baz, and G. El-Baroty, Spirulina species as a source of carotenoids and a-tocopherol and its anticarcinoma factors. *Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 222-240, 2003.
- [83] R. Lorenz, and G. Cysewski, Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*, v. 18, n. 4, p. 160-167, 2000.
- [84] M. Guerin, M. Huntley, and M. Olaizola, Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, v. 21, n. 5, p. 210-216, 2003.
- [85] P. Lamers, et al., Exploring and exploiting carotenoid accumulation in Dunaliella salina for cell-factory applications. *Trends in biotechnology*, v. 26, n. 11, pag. 631-638, 2008.
- [86] M. Plaza, et al., Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 16, p. 7159-7170, 2009.

- [87] P. Spolaore, et al., Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- [88] N. Krinsky, and E. Johnson, Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, v. 26, n. 6, p. 459-516, 2005.
- [89] A. Murthy, et al., In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*, a green microalga. *Life Sciences*, v. 76, n. 12, p. 1381-1390, 2005.
- [90] A. Miron, et al., Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 249-270, 1999.
- [91] H. Amaro, Â. Macedo and F. Malcata, Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels?. *Energy*, v. 44, n. 1, p. 158-166, 2012.
- [92] J. Del Campo, et al., Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(Chlorophyta). *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 51-59, 2000.
- [93] G. Smith, Principal component analysis: an introduction. In *Analytical proceedings*, v. 28, n. 5, p. 150-151, 1991.
- [94] A. Rencher, and M. Schimek, Methods of multivariate analysis. *Computational Statistics*, v. 12, n. 4, p. 412-422, 1997.
- [95] P. Crow, et al., The use of Raman spectroscopy to differentiate between different prostatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*, v. 92, p. 2166-2170, 2005.
- [96] M. Chowdary, et al., Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. *Biopolymers*, v. 83, p. 556-69, 2006.
- [97] C. Krishna, et al., Raman spectroscopy studies for diagnosis of cancers in human uterine cervix. *Vib Spectrosc*, v. 41, p. 136-141, 2006.
- [98] M. Vidyasagar, et al., Prediction of radiotherapy response in cervix cancer by Raman spectroscopy: a pilot study. *Biopolymers*, v. 89, p. 530-537, 2008.
- [99] S. Teh, et al., Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. *Br J Cancer*, v.98, p. 457-465, 2008.
- [100] P. Jess, et l., Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy. *Int J Cancer*, v. 121, p. 2723-2728, 2007.
- [101] S. Schlücker , et al., Immuno-Raman microspectroscopy: in situ detection of antigens in tissue specimens by surface-enhanced Raman scattering. *J Raman Spectrosc*, v. 37, p.719-721, 2006.

- [102] Y. Chung, et al., Raman spectroscopy detects cardiac allograft rejection with molecular specificity. *Clinical and translational science*, v. 2, n. 3, p. 206-210, 2009.
- [103] Z. Pilát, et al., Raman microspectroscopy of algal lipid bodies:  $\beta$ -carotene quantification. *Journal of applied phycology*, v. 24, n. 3, p. 541-546, 2012.
- [104] Y. Shao, et al., Y. Detection and imaging of lipids of *Scenedesmus obliquus* based on confocal Raman microspectroscopy. *Biotechnology for biofuels*, v. 10, n. 1, p. 300-307, 2017.
- [105] G. Possa, et al., Diel oscillation in the optical activity of carotenoids in the absorption spectrum of *Nannochloropsis*. *Journal of molecular modeling*, v. 23, n. 3, p. 95-110, 2017.
- [106] R. Andersen, *Algal culturing techniques*. Elsevier, 2005.
- [107] P. Eilers and H. Boelens. Baseline correction with asymmetric least squares smoothing. *Leiden University Medical Centre Report*, v. 1, n. 1, p. 5-21, 2005.
- [108] R. Saini, and K. Young, Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry*, v. 240, p. 90-103, 2018.
- [109] M. Henriques, A. Silva, and J. Rocha. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex*, v. 2, p. 586-593, 2007.
- [110] A. Solovchenko, et al., Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids. *Marine biotechnology*, v.13, n. 3, p. 527-535, 2011.
- [111] K. Lichtenthaler and A. Wellburn, Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents, p. 591-592, 1983.
- [112] A. Pistorius, J. Willem and A. Tatjana, Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. *Biotechnology and bioengineering*, v. 103, n. 1, p. 123-129, 2009.
- [113] E. Bligh, and W. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- [114] B. Wood, et al., A portable Raman acoustic levitation spectroscopic system for the identification and environmental monitoring of algal cells. *Analytical chemistry*, v. 77, n. 15, p. 4955-4961, 2005.

- [115] H. Lichtenthaler, and C. Buschmann, Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001.
- [116] R. Wellburn, The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- [117] C. Uragami, et al., Light-dependent conformational change of neoxanthin in a siphonous green alga, *Codium intricatum*, revealed by Raman spectroscopy. *Photosynthesis research*, v. 121, n. 1, p. 69-77, 2014.
- [118] M. Henriques, A. Silva, and J. Rocha, Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology Formatex*, 2, 586-593, 2007.
- [119] L. Premvardhan, et al., Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins from resonance Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.113, n. 37, p. 12565-12574, 2009.
- [120] C, Marshall, et al., Carotenoid analysis of halophilic archaea by resonance Raman spectroscopy. *Astrobiology*, v. 7, n. 4, p. 631-643, 2007.
- [121] A. Meléndez., et al., Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, v.10, n. 3, p. 1145-1150, 2007.
- [122] L. Premvardhan, et al., Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v. 1797, n. 9, p. 1647-1656, 2010.
- [123] A. Ferreira, et al., Evaluation of thermochemical properties of raw and extracted microalgae. *Energy*, v. 92, p. 365-372, 2015.
- [124] A. Bartošová, B. Lenka, and K. Gerulová, Characterisation of polysaccharides and lipids from selected green algae species by FTIR-ATR spectroscopy. *Research Papers Faculty of Materials Science and Technology Slovak University of Technology*, v. 23, n. 36, p. 97-102, 2015.
- [125] N. Yin, et al., Characterization of various microalgae for biodiesel fuel production. *Journal of Materials Science and Engineering*, v. 1, n. 1A, p. 80-89, 2011.
- [126] J. Sakurai, *Advanced quantum mechanics*. Pearson Education, 1967.

## Apêndice A

### Emissão ou absorção de um quantum de luz por uma partícula carregada é equivalente ao potencial vetorial não quantificado

Para entender a profundidade o conceito de efeito Raman, e sua explicação no contexto quântico, publicada por Sakurai [126], primeiro define-se o sistema com o hamiltoniano de interação entre a radiação de campo e um elétron atômico como (assumindo  $\mathbf{p} \rightarrow \mathbf{p}_i - \frac{e\mathbf{A}(x_i,t)}{c}$ ):

$$H_{int} = \frac{1}{2m} \left( \mathbf{p}_i - \frac{e}{c} \mathbf{A}(x_i, t) \right)^2 + V(x) \quad (1)$$

O termo  $\mathbf{A}(x_i, t)$  representa o operador de campo que interatua com os fótons de estado, onde  $x_i$  é a coordenada do  $i$ -ésimo elétron. Também, sabemos que  $\mathbf{p} = -i\hbar \nabla$ . Resolvendo os termos do parêntese

$$H_{int} = \frac{e^2}{2mc^2} \mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{A}(x_i, t) - \frac{e}{2mc} (\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{A}(x_i, t) + \mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{p}_i) \quad (2)$$

Considerando uma somatória devida a todos átomos que participam em uma interação

$$H_{int} = \sum_i \left( -\frac{e}{2mc} (\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{A}(x_i, t) + \mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{p}_i) + \frac{e^2}{2mc^2} (\mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{A}(x_i, t)) \right) \quad (3)$$

O operador  $\mathbf{p}_i$  da expressão  $\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{A}(x_i, t)$  é o operador diferencial que atua sobre tudo o que fica à direita, assim, transversalizando a condição  $\nabla \cdot \mathbf{A} = 0$ , é possível estabelecer que  $(\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{A}(x_i, t) = \mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{p}_i)$ . Agora, considerando que a absorção de um quantum de luz seja caracterizada por  $k, \alpha$  e que haja uma transição radioativa do átomo do estado A para B, então, há no estado inicial  $n_{k,\alpha}$  fótons e no estado final  $n_{k,\alpha} - 1$  fótons. Com tudo, este problema pode ser tratado a partir da teoria da perturbação dependente do tempo. Nesse sentido, considerando os termos de primeira ordem e ignorando a contribuição do spin, temos que:

$$\begin{aligned} & \langle B; n_{k,\alpha} - 1 | H_{int} | A; n_{k,\alpha} \rangle \\ &= -\frac{e}{mc} \langle B; n_{k,\alpha} - 1 | \sum_i (\mathbf{p}_i \cdot \mathbf{A}(x_i, t)) - \frac{e}{2c} (\mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{A}(x_i, t)) | A; n_{k,\alpha} \rangle \end{aligned} \quad (4)$$

Resolvendo a partir do operador de campo quantizado e os operadores de aniquilação e criação obtemos

$$\begin{aligned} & \langle B; n_{k,\alpha} - 1 | H_{int} | A; n_{k,\alpha} \rangle \\ &= -\frac{e}{mc} \langle B; n_{k,\alpha} - 1 | \sum_i c \sqrt{\frac{\hbar}{2\omega V}} a_{k,\alpha}(0) e^{i(k \cdot x_i - \omega t)} \mathbf{p}_i \cdot \boldsymbol{\epsilon}^\alpha | A; n_{k,\alpha} \rangle \\ &= -\frac{e}{m} \sqrt{\frac{n_{k,\alpha} \hbar}{2\omega V}} \sum_i \langle B | e^{i(k \cdot x_i)} \mathbf{p}_i \cdot \boldsymbol{\epsilon}^\alpha | A \rangle e^{-i\omega t} \end{aligned} \quad (5)$$

Assim, com o resultado da equação 5, é possível concluir que a emissão ou absorção de um quantum de luz por uma partícula carregada é completamente equivalente a uma interação da partícula carregada com o potencial vetorial não quantificado, como pode ser verificado pela seguinte equação do potencial vetorial [126]:

$$\langle B; n_{k,\alpha} + 1 | H_{int} | A; n_{k,\alpha} \rangle = -\frac{e}{m} \sqrt{\frac{(n_{k,\alpha} + 1) \hbar}{2\omega V}} \sum_i \langle B | e^{i(k \cdot x_i)} \mathbf{p}_i \cdot \boldsymbol{\epsilon}^\alpha | A \rangle e^{i\omega t} \quad (6)$$

Esse resultado será de utilidade em futuros tratamentos. Por outro lado, também resulta importante definir os potenciais apropriados para o processo de absorção

$$A^{\text{absorção}} = A_0^{\text{absorção}} e^{ik \cdot x - \omega t}$$

$$A_0^{\text{absorção}} = c \sqrt{\frac{n_{k,\alpha} \hbar}{2\omega V \epsilon^{(\alpha)}}} \quad (7)$$

$$A_0^{\text{absorção}} = c \sqrt{\frac{n_{k,\alpha} \hbar}{2\omega V}} \epsilon^{(\alpha)} e^{ik \cdot x - \omega t} \quad (8)$$

E de emissão

$$A^{\text{emissão}} = A_0^{\text{emissão}} e^{-ik \cdot x + \omega t}$$

$$A_0^{\text{emissão}} = c \sqrt{(n_{k,\alpha} + 1) \frac{\hbar}{2\omega V \epsilon^{(\alpha)}}} \quad (7)$$

$$A_0^{\text{emissão}} = c \sqrt{\frac{(n_{k,\alpha} + 1) \hbar}{2\omega V}} \epsilon^{(\alpha)} e^{-ik \cdot x + \omega t} \quad (8)$$

onde  $n_{k,\alpha}$  é o número de ocupação do fóton no estado inicial [126]. Esses operadores obtidos vão ser de utilidade nos seguintes tratamentos.

### Equação de Heisenberg-Kramers

Para o tratamento teórico de campo da dispersão de fótons por elétrons atômicos se estabelece que antes da dispersão o átomo está no estado A e o fóton incidente é caracterizado por  $k$ ,  $\epsilon^{(\alpha)}$ . Após a dispersão, o átomo é deixado no estado B e o fóton de saída é caracterizado por  $k'$ ,  $\epsilon^{(\alpha')}$  [126]. Por simplicidade, é considerada interação entre um átomo e um elétron, também, é desprezada a interação spin-momento magnético.

A interação hamiltoniana para todos os átomos que participam na interação (equação 3) é composta de um termo linear ( $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$ ) e um termo quadrático ( $\mathbf{A} \cdot \mathbf{A}$ ). Como  $\mathbf{A}$  altera o número de fótons por um, ( $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$ ) não contribui em primeira ordem para um processo de espalhamento no qual não há alteração neta no número de fótons [126]. Assim, temos para a interação

$$\langle B; k', \epsilon^{(\alpha')} | H_{int} | A; k, \epsilon^{(\alpha)} \rangle = \langle B; k', \epsilon^{(\alpha')} | \frac{e^2}{2mc^2} \mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{A}(x_i, t) | A; k, \epsilon^{(\alpha)} \rangle \quad (11)$$

O termo  $\mathbf{A}(x_i, t) \cdot \mathbf{A}(x_i, t)$  contém  $aa^\dagger$ ,  $a^\dagger a$ ,  $aa$  e  $a^\dagger a^\dagger$ . Considerando que  $a^\dagger$  represente o operador de criação de  $(k', \alpha')$  e  $a$  o operador de aniquilação de  $(k, \alpha)$ , unicamente  $aa^\dagger$ ,  $a^\dagger a$  darão contribuições úteis [126]. Como exemplo,  $\langle k', \alpha' | a_{k,\alpha} a_{k',\alpha'}^\dagger | k, \alpha \rangle = 1$ , deste modo

$$\begin{aligned} & \langle B; k', \epsilon^{(\alpha')} | H_{int} | A; k, \epsilon^{(\alpha)} \rangle \\ &= \langle B; k', \epsilon^{(\alpha')} | \frac{e^2}{2mc^2} (a_{k,\alpha} a_{k',\alpha'}^\dagger + a_{k',\alpha'}^\dagger a_{k,\alpha}) \frac{c^2 \hbar}{2V\sqrt{\omega\omega'}} \epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} \quad (12) \\ & \times \exp[i(k - k') \cdot x - i(\omega - \omega')t] | A; k, \epsilon^{(\alpha)} \rangle \end{aligned}$$

Substituindo  $e^{ik \cdot x}$  e  $e^{-ik \cdot x}$  por 1, uma vez que na aproximação de ondas longas pode-se presumir que o elétron atômico esteja situado no origem, obtemos

$$= \frac{e^2}{2mc^2} \frac{c^2 \hbar}{2V\sqrt{\omega\omega'}} 2\epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} \exp[-i(\omega - \omega')t] \langle B | A \rangle \quad (13)$$

Para a amplitude de transição de primeira ordem  $c^{(1)}(t)$ ,

$$\begin{aligned} c^{(1)}(t) &= \frac{1}{i\hbar} \frac{e^2}{2mc^2} \frac{c^2 \hbar}{2V\sqrt{\omega\omega'}} 2\delta_{AB} \epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} \int_0^t \exp[-i(\hbar\omega' + E_B - \hbar\omega \\ & - E_A) \frac{t_1}{\hbar}] dt_1 \quad (14) \end{aligned}$$

Com  $\omega = |k|c$  e  $\omega' = |k'|c$

Embora o termo  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$  não contribua em primeira ordem, o termo  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$  tomado duas vezes é da mesma ordem que o termo  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{A}$ , no que se refere às potências de  $e$ . Portanto, deve-se tratar uma interação  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$  dupla e uma única interação  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{A}$  simultaneamente. A interação  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$  atuando em  $t_1$  pode aniquilar o fóton incidente  $(k, \alpha)$  ou criar o fóton de saída  $(k', \alpha')$  [126]. Quando a interação  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$  age novamente em um momento  $t_2$  posterior a  $t_1$ , ela deve necessariamente criar o fóton de saída  $(k', \alpha')$  se o fóton de saída ainda não tiver sido criado. Caso contrário, acabaríamos com um elemento de matriz zero. Por outro lado, se o fóton de saída já foi criado, mas o fóton de entrada ainda não foi aniquilado, a interação  $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}$

atuando em  $t_2 > t_1$  deve aniquilar o fóton de entrada ( $k, \alpha$ ). Entre  $t_1$  e  $t_2$ , o átomo está no estado I, que é, em geral, diferente de A e B [126]. Para resumir, dois tipos de estados intermediários são possíveis. No primeiro tipo, o átomo está no estado I e nenhum fóton está presente. No segundo tipo, o átomo está no estado I e o fóton incidente e o fóton de saída estão presentes.

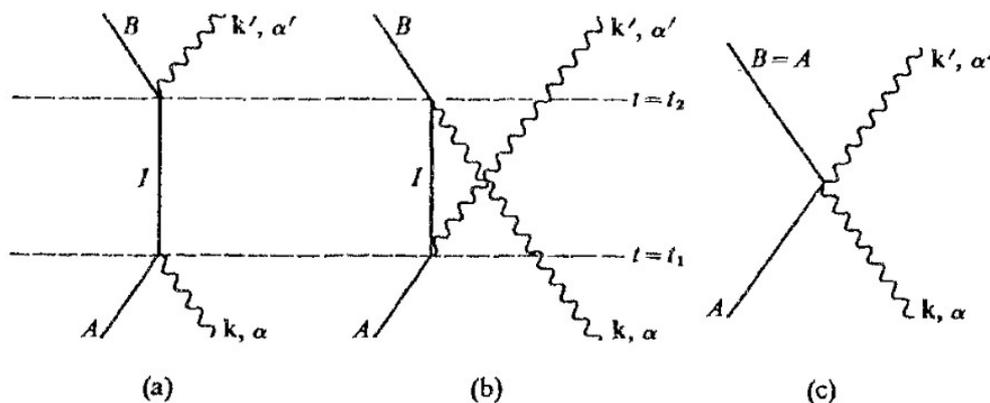


Figura 1.1 Diagrama de espaço tempo para a dispersão da luz. Fonte: [126]

Essas interações podem ser expressadas através de um diagrama de espaço-tempo (diagrama de Feynman), no qual uma linha sólida representa o átomo e uma linha ondulada representa um fóton [126]. Convencionalmente o tempo corre para cima (Fig. 1.1). Para um processo do tipo I, representado pela Fig. 1.1 (a), o estado atômico A absorve primeiro o fóton incidente em  $t_1$  e passa a ser o estado I; subsequentemente em  $t_2$  o estado atômico I emite o fóton de saída e muda para o estado B [126]. Para um processo do tipo II representado pela Fig. 1.1(b), o estado A emite primeiro o fóton de saída em  $t_1$  e muda para o estado I; subsequentemente em  $t_2$  o estado I absorve o fóton incidente (que ainda não foi aniquilado) e se torna o estado B. Em contraste, a interação de **A.A** de menor ordem, discutida anteriormente, é representada pela Fig.1.1(c)

A emissão e absorção de um fóton por um elétron atômico são equivalentes às interações do elétron atômico com os potenciais dependentes do tempo (Absorção e emissão). Usando esta regra, é possível escrever a amplitude de transição de segunda ordem  $c^2(t)$  da seguinte maneira;

$$\begin{aligned}
c^2(t) = & \frac{1}{(i\hbar)^2} \frac{c^2 \hbar}{2V\sqrt{\omega\omega'}} \left(-\frac{e}{mc}\right)^2 \int_0^t dt_2 \int_0^{t_2} dt_1 \\
& \times \left[ \sum_I \langle B | \mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')} | I \rangle \exp \left[ i(E_B - E_I + \hbar\omega') \frac{t_2}{\hbar} \right] \right. \\
& \times \langle I | \mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)} | A \rangle \exp \left[ i(E_I - E_A + \hbar\omega) \frac{t_1}{\hbar} \right] \\
& + \left[ \sum_I \langle B | \mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)} | I \rangle \exp \left[ i(E_B - E_I + \hbar\omega) \frac{t_2}{\hbar} \right] \right. \\
& \times \langle I | \mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')} | A \rangle \exp \left[ i(E_I - E_A + \hbar\omega') \frac{t_1}{\hbar} \right] \left. \right] \quad (15)
\end{aligned}$$

Agora se usamos a aproximação dipolar e ignorando um termo que depende da emissão repentina artificial da perturbação (que é desprezível se a conservação de energia,  $E_B - E_A + \hbar\omega' - \hbar\omega = 0$ , estiver satisfeita), obtemos

$$\begin{aligned}
= & -\frac{c^2 \hbar}{i\hbar 2V\sqrt{\omega\omega'}} \left(\frac{e}{mc}\right)^2 \sum_I \left( \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega)} + \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega')} \right) \\
& \times \int_0^t dt_2 \exp \left[ i(E_B - E_A + \hbar\omega' - \hbar\omega) \frac{t_2}{\hbar} \right] \quad (16)
\end{aligned}$$

Combinando  $c^1(t)$  e  $c^2(t)$ , obtemos a probabilidade de transição

$$\begin{aligned}
w_{d\Omega} = & \int \left( \frac{|c^{(1)} + c^{(2)}|^2}{t} \right) p_{E,d\Omega} dE \quad (17) \\
= & \frac{2\pi}{\hbar} \left( \frac{c^2 \hbar}{2V\sqrt{\omega\omega'}} \right)^2 \left( \frac{e^2}{mc^2} \right)^2 \frac{V}{(2\pi)^3} \frac{\omega'^2}{\hbar c^3} d\Omega \\
& \times \left| \delta_{AB} \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')} \right. \\
& \left. - \frac{1}{m} \sum_I \left( \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega)} + \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega')} \right) \right|^2 \quad (18)
\end{aligned}$$

Para obter a seção transversal diferencial, devemos dividir essa probabilidade de transição pela densidade do fluxo, que é  $\frac{c}{V}$ , pois, inicialmente, existe um fóton na caixa de normalização do volume  $V$ [126]. Finalmente, tem-se a seção transversal diferencial

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \left( \frac{\omega'}{\omega} \right) \left| \delta_{AB} \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')} - \frac{1}{m} \sum_I \left( \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega)} + \frac{(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{BI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{IA}}{(E_I - E_A + \hbar\omega')} \right) \right|^2 \quad (19)$$

Uma equação equivalente à Eq. 19 foi obtida pela primeira vez por H. A. Kramers e W. Heisenberg usando o princípio da correspondência em 1925; portanto, é chamada a fórmula de Kramers-Heisenberg [126].

A fórmula de Kramers-Heisenberg descreve satisfatoriamente o efeito Raman. Tecnicamente falando essa fórmula é aplicável à dispersão inelástica da luz na qual  $\omega \neq \omega'$  e  $A \neq B$ . Na física atômica, esse fenômeno é chamado de efeito Raman [23]. Se o estado atômico inicial  $A$  for o estado fundamental, a energia do fóton final  $\hbar\omega'$  não poderá ser maior que a energia incidente do fóton  $\hbar\omega$  porque  $\hbar\omega + E_A = \hbar\omega' + E_B$  (Fig. 1.2(a)). Isso explica a presença de uma linha de Stokes em espectros atômicos, uma linha espectral mais avermelhada que a radiação incidente [126]. Por outro lado, se o átomo estiver excitado,  $\omega'$  pode ser maior que  $\omega$  (Fig. 1.2(b)). Isso leva a uma linha anti-Stokes, que é mais violeta que a linha espectral da radiação incidente.

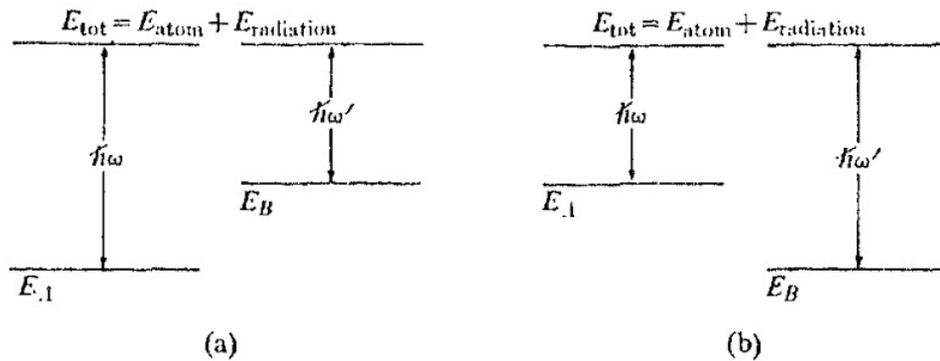


Figura 1.2 (a) linha Stokes (b) linha anti-Stokes. obtido de [126]

## Dispersão de Rayleigh

Existem certos casos especiais da equação (19) que podem ser aplicados a diferentes tipos de dispersão. Assim, resulta interessante discutir o caso em que  $A = B$ ,  $\omega = \omega'$ . Ou seja, na dispersão elástica da luz, também chamado de espalhamento Rayleigh. Inicialmente, esse problema foi tratado classicamente por Lord Rayleigh [126]. Primeiro, para simplificar a equação obtida (19), se reescreve cada termo usando a relação de comutação entre  $x$  e  $p$ , a completude dos estados intermediários  $I$  e a matriz de emissão espontânea, equação 2.124 de [126]:

$$\epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} = \frac{1}{i\hbar} \sum_I [(\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA} - (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA}] \quad (20)$$

$$\epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} = \frac{1}{m\hbar} \sum_I \frac{1}{\omega_{IA}} [(\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA} - (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{IA}] \quad (21)$$

Onde  $\omega_{IA} = \frac{(E_I - E_A)}{\hbar}$ . Agora combinando os três termos na equação de Kramer-Heisenberg obtemos

$$\delta_{AA} \epsilon^{(\alpha)} \cdot \epsilon^{(\alpha')} = \frac{1}{m\hbar} \sum_I \frac{1}{\omega_{IA}} \left[ \frac{(\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{IA}}{\omega_{IA} - \omega} + \frac{(\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA}}{\omega_{IA} + \omega} \right] \quad (22)$$

$$= -\frac{1}{m\hbar} \sum_I \left[ \frac{\omega (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{IA}}{\omega_{IA} (\omega_{IA} - \omega)} - \frac{\omega (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA}}{\omega_{IA} (\omega_{IA} + \omega)} \right] \quad (23)$$

Usando a expansão  $\frac{1}{\omega_{IA} \mp \omega} \approx \left( \frac{1 \pm \frac{\omega}{\omega_{IA}}}{\omega_{IA}} \right)$  para valores pequenos de  $\omega$

$$\sum_I \frac{1}{\omega_{IA}^2} [(\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{IA} - (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA}] \quad (24)$$

$$= m^2 \sum_I [(\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{IA} - (\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha')})_{IA}] \quad (25)$$

$$= m^2 ( [\mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha')}, \mathbf{x} \cdot \epsilon^{(\alpha)}] )_{AA} \quad (26)$$

$$= 0$$

Para obter a seção transversal de Rayleigh é usada a aproximação  $\omega \ll \omega_{IA}$ , assim

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{r_0^2}{m\hbar^2} \omega^4 \left| \sum_I \frac{1}{\omega_{IA}^2} [(\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{IA} + (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{p} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{IA}] \right|^2 \quad (27)$$

$$= \frac{(r_0 m)^2}{\hbar^2} \omega^4 \left| \sum_I \frac{1}{\omega_{IA}} [(\mathbf{x} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{AI} (\mathbf{x} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{IA} + (\mathbf{x} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha)})_{AI} (\mathbf{x} \cdot \boldsymbol{\epsilon}^{(\alpha')})_{IA}] \right|^2 \quad (28)$$

Assim, é notável que a seção transversal de espalhamento em comprimentos de onda longos varia conforme a quarta potência inversa do comprimento de onda (lei de Rayleigh). Para átomos em gases incolores comuns, a onda de luz correspondente a um típico  $\omega_{IA}$  que está na região ultravioleta. Com tudo, é possível afirmar que a aproximação  $\omega \ll \omega_{IA}$  determina  $\omega$  na região óptica visível [126]. Essa teoria explica por que o céu é azul e o pôr do sol é vermelho.