

ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA DA BIOMASSA DA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* – BMAK D16 COM FOCO BIOTECNOLÓGICO ODS - 09

ODS N° 9 – Meta 9.5. Fortalecer a pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico.

Ângelo Paggi Matos (Universidade Estadual Paulista - UNESP)
Bianca Sereda Jacinto (Universidade Estadual Paulista - UNESP)
Eduardo do Valle Ricardo (Universidade Estadual Paulista - UNESP)
Diogo Chernieski (Universidade Estadual Paulista - UNESP)
Flávia Saldanha-Corrêa (Universidade de São Paulo – USP)
Gabriela Ramos Hurtado (Universidade Estadual Paulista - UNESP)

Resumo

As microalgas são micro-organismos versáteis capazes de sintetizar uma ampla gama de biomoléculas. O objetivo desta pesquisa foi fazer uma análise minuciosa da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* – BMAK D16 com o intuito de avaliar a dinâmica de síntese de compostos intracelulares tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos graxos, clorofila e carotenoides da biomassa algal. A microalga foi cultivada em fotobiorreator de 5L por até 30 dias e obteve um rendimento celular de 65 mg/L. Imagens de microscopia óptica indicaram coloração esverdeada típica da célula microalgal, enquanto que a análise de citometria de fluxo do cultivo *in vivo* indicou um tamanho celular de 10 a 15 μm condizente com a imagem de microscopia eletrônica de varredura. Com a biomassa microalgal foram feitas análises de extração de óleo obtendo um rendimento de 10,3 mg/g, bem como extração de pigmentos com rendimento de 2,04 mg/g para a clorofila e 1,39 mg/g para os carotenoides totais. Usando a espectrofotometria UV-Vis, foi possível, ainda, identificar os picos de absorção da clorofila confirmada, também, no gráfico de histograma gerado pela citometria de fluxo. A análise termogravimétrica para determinar a perda de biomassa (%) em função da temperatura apresentou uma queda abrupta da biomassa nos valores entre 200-300°C até valores de 500-600°C onde, enfim, a curva da biomassa decai de maneira mais suave até o valor de 900°C. A análise de espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) identificou as principais bandas em comprimento de onda das biomoléculas de lipídeos (3000 cm^{-1}), proteínas (1650 cm^{-1}), e carboidratos (1200 cm^{-1}) enquanto a espectrometria de Raman evidenciou os picos dos compostos lipofílicos da biomassa microalgal tais como o carotenoide astaxantina (1524 cm^{-1}) e ácidos graxos saturados (1446 cm^{-1}) e insaturados (1278 cm^{-1}). Em suma, esta pesquisa deseja contribuir com o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) número 9 onde enfatiza o fortalecimento da pesquisa científica através do uso de equipamentos ultramodernos de análises químicas, além de contribuir com o desenvolvimento tecnológico por meio dos estudos da biotecnologia das microalgas tais como a espécie *Haematococcus pluvialis*.

Palavras-chave: Cultivo microalgal. Biomassa. Microscopia. Espectrofotometria. Biotecnologia.

Introdução

As microalgas despontam como um novo recurso renovável com potencialidades diversas em termos de biomassa, bioprodutos e biocombustíveis (MATOS, 2017a). O crescente interesse no estudo de micro-organismos como as microalgas deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade de aplicação comercial em distintas áreas como nutrição, saúde humana e animal (TIBBETTS; MILLEY; LALL, 2015), tratamento de águas residuais e reciclagem de matéria orgânica (MATOS; VADIVELLOO; BAHRI; MOHEIMANI, 2021), produção e criação de bioenergia (MOHEIMANI; MCHENRY; DE BOER; BAHRI, 2015) e obtenção de compostos de interesse nas indústrias alimentar, química e farmacêutica (BOROWITZKA, 2013).

O sistema convencional de produção de microalgas consiste no cultivo de microalgas tanto em fotobiorreatores quanto em lagoas do tipo raceway, separação ou colheita da biomassa, seguido de etapas de processamento adicionais tais como secagem, ruptura celular, extração de compostos e purificação do produto final. Algumas das principais microalgas amplamente produzidas e comercializadas são as espécies *Arthrospira platensis*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* (KUMAR; MISHRA; SHRIVASTAV; PARK *et al.*, 2015).

Devido à sua composição bioquímica, as microalgas produzem uma ampla variedade de compostos naturais que incluem proteínas (aminoácidos, polipeptídeos, enzimas), polissacarídeos (β -1,3-glucanas, amido, celulose), lipídeos (ácidos graxos poli-insaturados, hidrocarbonetos), pigmentos (clorofilas, carotenóides, ficobilinas), vitaminas (complexo B e E), minerais e diversos compostos bioativos (terpenos, esqualeno, anti-virais, anti-fúngicos, anti-bacterianos) úteis para aplicação na nutrição humana e/ou animal, tecnologia de alimentos, produtos da química fina, farmacêutica e medicina (MATOS, 2017b; OLIVEIRA; JACOB; NADER; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

O Banco de Micro-organismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) foi criado na década de 1970 e, até hoje, constitui o maior acervo de microalgas do Brasil, representando importante reserva do patrimônio genético, disponível para estudos de taxonomia, fisiologia, ecologia, ecotoxicologia, biotecnologia entre outras áreas da pesquisa.

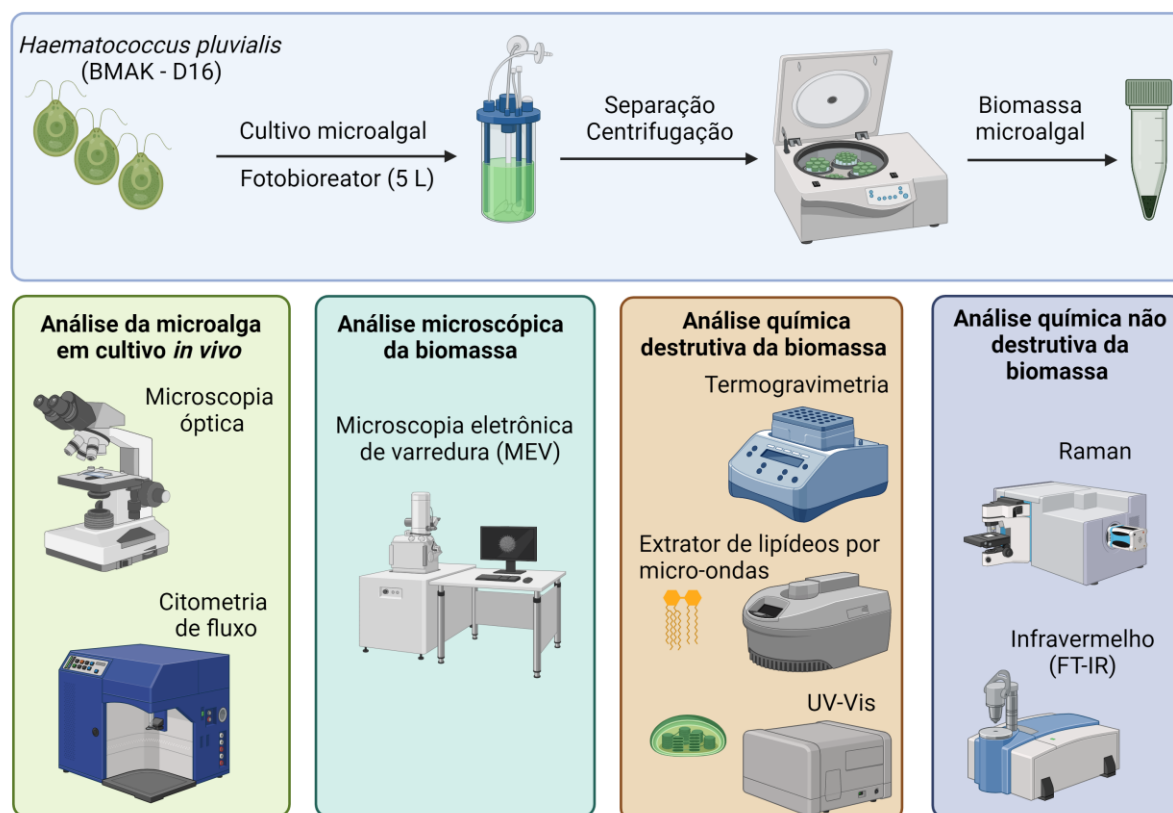
Contando com mais de 230 cepas catalogadas de microalgas de água doce, marinhas e estuárias isoladas em águas brasileiras por pesquisadores do IOUSP, o BMAK disponibiliza sua infraestrutura para realização de experimentos, capacitação e treinamentos de estudantes, além de doação de inóculos de microalgas para instituições públicas e privadas (<https://www.io.usp.br/index.php/infraestrutura/banco-de-microorganismos>).

As pesquisas mais recentes desenvolvidas no BMAK incluem i) cultivo de microalgas em águas residuais diversas, ii) produção de biomassa microalgal para uso na aquicultura como alimento vivo (OLIVEIRA; ABREU; SANTOS; MATOS *et al.*, 2022), iii) prospecção de microalgas para a produção de biodiesel e etanol (MATOS; TEIXEIRA; CORRÊA; MACHADO *et al.*, 2020), iv) produção de toxinas, enzimas e polímeros, v) produção de substâncias antitumorais, além da tradicional aplicação em estudos taxonômicos (KUTNER; BOWMAN; SALDANHA-CORRÊA; CHUQUI *et al.*, 2023). Em função disso tudo, o BMAK é referência nacional no que se refere a cultivo e produção de microalgas.

O Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMar) da Universidade Estadual Paulista foi criado em 2010 como uma unidade complementar da UNESP. O instituto hoje é formado por seis polos localizados nas cidades de Bauru, Presidente Prudente, Registro, Rio Claro, São José dos Campos e São Vicente onde fica a sede do instituto. Com investimento massivo pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), o IEAMar tem o intuito de se tornar um centro de excelência com estudos da biodiversidade marinha e conta com um parque de equipamentos no valor de mercado de aproximadamente 200 milhões de reais, permitindo conduzir uma pesquisa rápida e avançada por meio do uso de equipamentos ultramodernos e de perfil multiusuários (<https://www2.unesp.br/portal#!/ieamar>).

Considerando o amplo acervo de cepas de microalgas do BMAK e a infraestrutura do IEAMar com equipamentos ultramodernos de microscopia e espectrofotometria, esta pesquisa teve por objetivo fazer uma varredura da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* – BMAK D16 com o intuito de avaliar a dinâmica de compostos intracelulares tais como proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos graxos, clorofila e carotenoides da biomassa algal. Uma visão geral das análises conduzidas neste trabalho está descrito na Figura 1.

Figura 1 - Etapas das análises químicas da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis*.



Fonte: Matos, 2023.

Métodos

Cultivo da microalga. A cepa da microalga de água doce *H. pluvialis* (clone D16) é proveniente do Banco de Micro-organismos Aida & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP). A microalga foi cultivada em *Bold Basal Medium* (BBM) durante 30 dias de cultivo sob iluminação de 1000 lux, fotoperíodo de 12:12h dia/escuro e injeção de ar CO₂ atmosférico. A biomassa foi separada do meio líquido usando uma centrífuga (Thermo Scientific, Sorval RC6+, EUA) por 20 min. a 7000 rpm, sendo em seguida liofilizada em equipamento liofilizador (LIOTOP L101, Liobras, Brasil) e, posteriormente, mantida em tubos Falcon para análises químicas.

Determinação da biomassa (g/L) em peso seco. Para determinação da biomassa, o peso seco foi obtido por filtração de 20 mL do cultivo microalgal em membrana de acetato de celulose com porosidade de 45 µm e seca em estufa a 110°C por 24h (LOURENÇO, 2006).

Microscopia óptica. Uma alíquota do cultivo *in vivo* da microalga foi coletada com uso de pipeta Pasteur e depositada sobre uma lâmina transparente recoberta por uma lamínula. A amostra foi visualizada em um microscópio óptico binocular da marca Leica (Wetzlar, Alemanha) modelo ICC50 W com aumento de até 100x fazendo uso de um óleo de imersão (*Immersal* 518N) da marca Zeiss (Jena, Alemanha). As imagens coloridas foram capturadas com uma câmera de 5.0 megapixels e processadas no computador usando o software Leica Application Suite LAS EZ versão 3.4.0.

Microscopia eletrônica de varredura. Uma pequena quantidade de biomassa microalgal foi acondicionada sobre uma fita de carbono em *stubs*, metalizada com partículas de ouro em metalizador marca Emitech, modelo SC7620 Sputter Coater (Laughton, East Sussex, Inglaterra), e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura marca FEI, modelo Quanta 250 (Hillsboro, Oregon, EUA) usando um software XT microscope.

Análise de citometria de fluxo. Uma alíquota de 2,0 mL do cultivo *in vivo* da espécie foi inserida em Eppendorf para análise de citometria de fluxo em equipamento da marca Accuri Cytometers, modelo BD Accuri – C6 Flow cytometer (Ann Arbor, Michigan, EUA), com um volume de injeção de 5,0 μ L e escaneamento de imagens de 10.000 eventos de acordo com a metodologia descrita em BARKER; CATTOLICO e GATZA (2012). As imagens foram processadas no software BD Accuri® C6 versão 1.0.264.21.

Análise de clorofila e carotenoides totais. Aproximadamente 2,0 mg de biomassa algal foi pesada e transferida para tubos falcon adicionados de 5 mL de acetona. Os tubos contendo as amostras foram colocados em um sonificador (marca Unique, modelo UltraSonic Clean 1400A, São Paulo, Brasil) por 20 min. a 40 kHz, para rompimento da parede celular (MOHEIMANI; BOROWITZKA; ISDEPSKY; SING, 2013). Após isso, as amostras foram centrifugadas e o espectro UV do sobrenadante foi medido em espectrofotômetro (marca Shimadzu, modelo UV 1800 series, Quioto, Japão) com absorbância de luz no comprimento de onda entre 400 a 800 nm. Com os dados de absorbância foi possível fazer os cálculos de clorofila a e b, bem como a quantidade de carotenoides totais encontrado na amostra estudada. Os cálculos estão descritos em FELLER; MATOS; MAZZUTTI; MOECKE *et al.* (2018):

Clorofila *a* = 11,93 Abs₆₆₄ – 1,93 Abs₆₄₇

Clorofila *b* = 20,36 Abs₆₄₇ – 5,50 Abs₆₆₄

Carotenoides totais (1000 x Abs₄₇₀ – 1,63 x *Clorofila*_a – 104,96 x *Clorofila*_b) / 221

Termogravimetria da biomassa algal. Uma quantidade entre 6 a 10 mg de amostra algal foi acondicionada em cadinho de alumina no equipamento marca TA Instruments, modelo SDT-Q6000 (New Castle, Delaware, Estados Unidos) para análise de termogravimetria. Para esta análise e de acordo com a metodologia descrita em BATISTA; GOUVEIA; BANDARRA; FRANCO *et al.* (2013), a amostra sofreu aquecimento em uma rampa iniciando em 35°C até a temperatura final de 900°C com uma razão de 20°C por min. Termogramas foram analisados em termos de temperatura inicial (*T*_{inicial}, °C), temperatura máxima para degradação (*T*_{max}, °C) e resíduo produzido em 900 °C, usando o software *Universal Analysis 2000* versão V4.5A.

Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) para detecção das bandas de lipídeos, proteínas e carboidratos. Aproximadamente 1,0 mg de amostra liofilizada foi submetida a análise de infravermelho usando um equipamento marca Shimadzu, modelo IR-Prestige-21 (Quioto, Japão) acoplado ao acessório com janela de diamante da marca PIKE Technologies MIRacle Universal ATR (Madison, WI, Estados Unidos). Com o software Lab Solutions IR-Shimadzu foi possível identificar as bandas do comprimento de onda lipídeos (2800-3000 cm⁻¹) proteínas (1500-1700 cm⁻¹) e carboidratos (1000-1200 cm⁻¹) com seus respectivos picos de absorção (MENG; YAO; XUE; YANG, 2014).

Espectrometria de Raman. Utilizando uma pequena quantidade de amostra acondicionada em um frasco de vidro transparente foi medido o espectro Raman pelo equipamento modelo CORA 5001 Dual da marca Anton Paar (Graz, Austria), utilizando um laser na frequência de 1064 nm e potência de 149 mW. Os espectros foram gravados em uma variação espectral de 200 – 2200 cm⁻¹ com uma resolução de 10 – 15 cm⁻¹ em um intervalo de 5 s para cada 10 escaneamentos (GRACE; LAKSHMI; MEENAKSHI; VAIDYANATHAN *et al.*, 2020). Como detector dos espectros usou-se arseneto de índio e gálio (Indium gallium arsenide, InGaAs). A aquisição dos espectros foi feita no software Cora 5001 versão 1.2.6.

Extração dos lipídeos intracelulares pelo processo de micro-ondas. Aproximadamente 50 mg da amostra liofilizada foi transferida para um cartucho vial

de carbeto de silício preto C10 e submetida à extração com *n*-hexano em equipamento do tipo reator de síntese por micro-ondas modelo monowave 400R (Anton Paar GmbH, Graz, Áustria), com as seguintes condições de trabalho: tempo de reação = 30 min, temperatura = 150°C, agitação = 600 rpm, pressão = 10 bar e potência = 10W (DAI; CHEN; CHEN, 2014). Após o período de extração, as amostras foram rotaevaporadas em balão de vidro e pesadas para obtenção do rendimento do extrato que foram calculados de acordo com a seguinte equação $R = (\text{mg extrato} / \text{mg biomassa liofilizada}) / 100$.

Análise de dados e estatística. A análise de dados gráficos foi realizada por meio do uso do software OriginPro 8.5 que permite gerar gráficos e analisar simultaneamente os dados coletados.

Resultados e Discussão

Os métodos tradicionais de extração de compostos intracelulares requerem uma quantidade relativa (>5 g) de biomassa microalgal, reagentes analíticos de alto custo com tempo de reação que duram dias para alcançar uma determinação precisa (MATOS; MORIOKA; SANT'ANNA; FRANÇA, 2014). Por outro lado, métodos químicos ultra-analíticos, tem possibilitado aos pesquisadores estimar a composição química das microalgas necessitando de quantidades mínimas de biomassa (<1g), além de serem métodos rápidos e eficientes (MENG; YAO; XUE; YANG, 2014). Assim, este trabalho teve por objetivo cultivar a microalga *H. pluvialis*, caracterizar suas células por microscopia óptica e citometria de fluxo, bem como analisar a biomassa através de microscopia eletrônica de varredura e análises químicas onde ocorre a destruição/consumo da biomassa (termogravimetria, extração de lipídeos por micro-ondas, extração de pigmentos clorofila e carotenoides), e análises químicas não destrutivas da biomassa tais como espectroscopia de Raman e espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Análise de microscopia, biomassa, lipídeos, pigmentos e termogravimetria

Os parâmetros quantificáveis da biomassa de *H. pluvialis* estão apresentados na Tabela 1, enquanto que na Figura 2 é possível visualizar imagens do cultivo microalgal em fotobiorreator (Figura 2A), com rendimento celular em peso seco de

65 mg/L e após 30 dias de cultivo obteve-se um rendimento final de 280 mg de biomassa para ser usada nas análises químicas posteriores (Tabela 1).

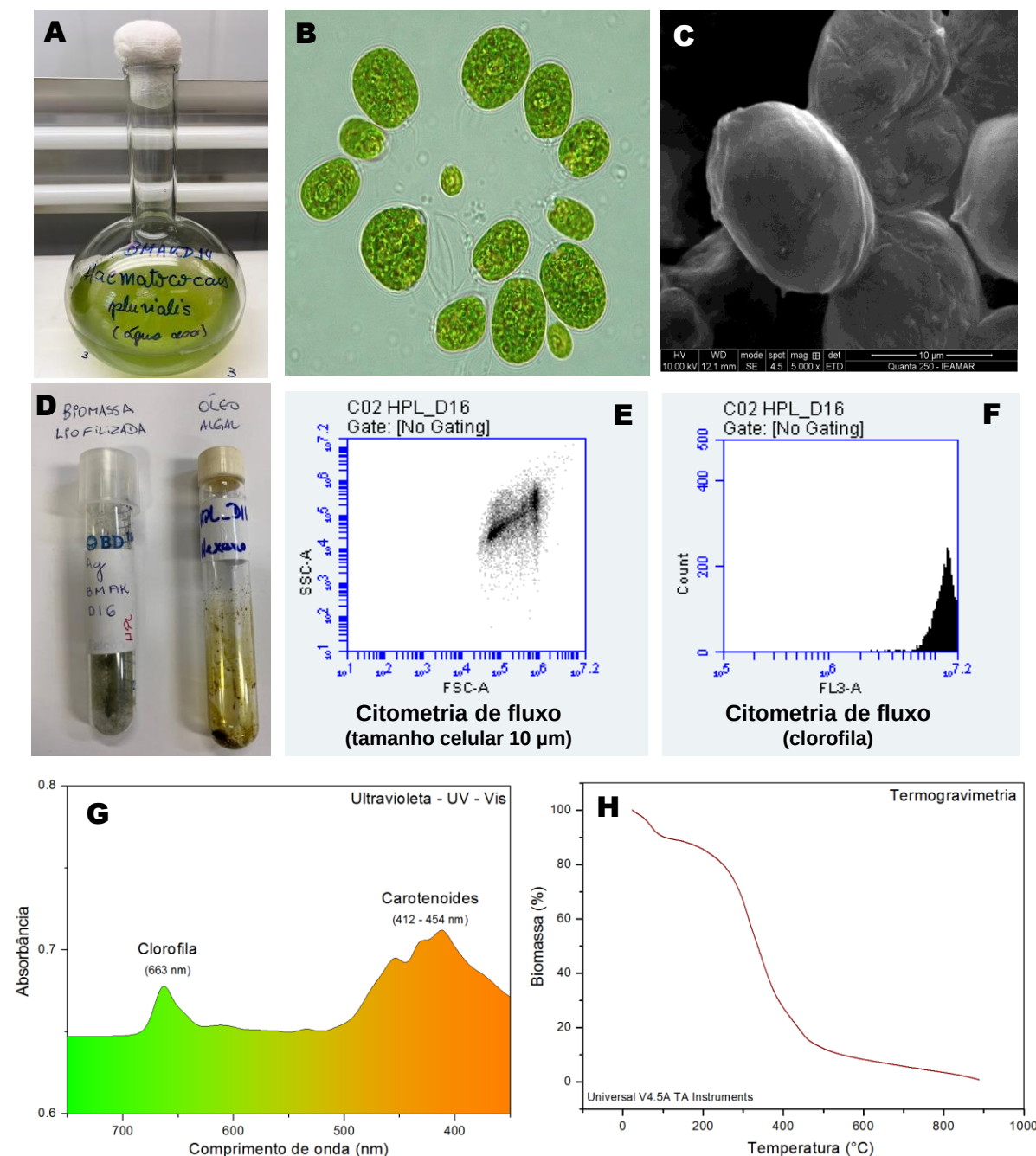
Nas Figuras 2B e C, respectivamente, estão às micrografias da microalga por microscopia óptica indicando coloração esverdeada e microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando formato cilíndrico-oval com tamanho celular variável de 10-15 μm .

Após o cultivo, a biomassa foi liofilizada e mantida em tubos Falcon (Figura 2D), sendo que posteriormente foi extraído com *n*-hexano via micro-ondas o óleo que rendeu um valor aproximado de 10,3 mg/g. A biomassa também foi submetida à extração com acetona para quantificação via espectrofotometria de UV-Vis de pigmentos tais como clorofila (2,04 mg/g) e carotenoides totais (1,39 mg/g) (Figura 3A e Tabela 1). Entre os carotenoides presentes na microalga estudada incluem a presença de astaxantina, zeaxantina, fucoxantina, e luteína (DARWESH; MAHMOUD; ABDU; MARREZ, 2022), que tem sido estudado em uma série de pesquisas científicas, tais como incorporação dos pigmentos como corante de alimentos em biscoitos (BATISTA; NICCOLAI; FRADINHO; FRAGOSO *et al.*, 2017), aditivo em ração para peixes como salmão (ALFES; GUTTORMSEN; STEINE; KOLSTAD, 2006), efeitos terapêuticos e nutracêuticos dos pigmentos na alimentação humana e animal (MANIVASAGAN; BHARATHIRAJA; SANTHA MOORTHY; MONDAL *et al.*, 2018), bem como efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antivirais e antiprotzoária (JÚNIOR; DA SILVA; OLIVEIRA; MOREIRA *et al.*, 2023; LOURENÇO-LOPES; FRAGA-CORRAL; JIMENEZ-LOPEZ; CARPENA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Parâmetros estudados na biomassa da microalga *H. pluvialis* - BMAK D16.

Componente estudado	Quantidade determinada
Tamanho celular	10 – 15 μm
Biomassa em peso seco	65 mg/L
Rendimento total da biomassa	280 mg em 5 litros de cultivo
Rendimento extrato com hexano	10,3 mg/g
Clorofila	2,04 mg/g
Carotenoides totais	1,39 mg/g
Resíduo a 900°C	26,2 %

Figura 2 – Detalhes gerais da microalga *H. pluvialis* – BMAK D16. A – Cultivo em fotobiorreator com volume de trabalho de 5L; B – Coloração esverdeada da microalga visualizada por microscopia óptica; C – Microestrutura celular da microalga por MEV; D – Amostras da biomassa liofilizada armazenada em tubo Falcon e frasco de vidro contendo óleo extraído com hexano; E – Gráfico de dispersão de luz gerado pela citometria de fluxo que está associado ao tamanho celular da alga; F – Gráfico de histograma indicando a intensidade da autofluorescência da clorofila presente na célula microalgal; G – Gráfico indicando a intensidade da clorofila e de carotenoides da microalga; (H) - Decaimento da biomassa de *H. pluvialis* quando submetida ao aquecimento de até 900°C.



Fonte: Matos, 2023.

Uma análise complementar feita no cultivo *in vivo* da microalga foi a citometria de fluxo (Figuras 2E e F). A citometria de fluxo é um método de triagem rápida e dinâmica que quando aplicado nas culturas de microalgas, as partículas ou células suspensas em um fluxo de líquido com foco hidrodinâmico passam por um feixe de luz. Os detectores ópticos coletam a luz dispersa bem como emissões fluorescentes e são eletronicamente digitalizados para gerar sinais em uma análise computacional. Os dados de dispersão de luz fornecem informações básicas sobre as células, como tamanho e formato celular e características superficiais das células. Os dados de fluorescência permitem medir a fluorescência intrínseca das células tais como clorofila de microalgas (STAUBER; FRANKLIN; ADAMS, 2002). Existe ainda, a possibilidade de corar organelas intracelulares das microalgas com marcadores fluorescentes lipofílicos, tais como o vermelho de Nilo, permitindo a visualização e quantificação dos glóbulos lipídicos (BARKER; CATTOLICO; GATZA, 2012).

O gráfico de dispersão de luz em escala logarítmica (Figura 2E) onde o eixo 'x' encontra-se a variável FSC-A (*forward scatter angle*) que significa a dispersão de luz no ângulo frontal e está relacionado ao tamanho celular (largura e comprimento) das microalgas, e no eixo 'y' encontra-se o SSC-A (*side scatter angle*) que está relacionado ao formato celular (cilíndrica, ovalada, elipsoide) da microalga, indicou um tamanho celular microalgal de aproximadamente 10 μm condizente com as imagens feitas por MEV. Na Figura 2F, por sua vez, encontra-se o gráfico de histograma plotado de acordo com a intensidade de autofluorescência da clorofila da microalga *H. pluvialis*. No eixo 'x' encontra-se o FL3-A (*fluorescence-3 angle*) que significa o módulo de excitação de luz de 488 nm e filtro de emissão de 670 nm plotados na escala logarítmica, e no eixo 'y' encontra-se o *count* (contagem) de células emitidas em escala linear.

Por fim, a biomassa de *H. pluvialis* foi submetida ao aquecimento até 900°C usando um equipamento de termogravimetria (TGA). A termogravimetria é uma técnica destrutiva no ramo de análises térmicas, na qual se monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. No caso da TGA aplicada à biomassa, esta análise pode ser útil considerando aplicações da biomassa na indústria de alimentos, uma vez que operação de cozimento, secagem, troca de calor no processamento de alimentos são frequentemente empregados. Assim, o traço da

análise termogravimétrica indica a sequência única de reações físico-químicas induzidas termicamente que ocorrem em diferentes faixas de temperatura. O termograma resultante, expressando a perda de peso em biomassa (%) em função da temperatura está apresentado na Figura 2H, onde se observa uma queda abrupta da biomassa nos valores entre 200-300°C até valores de 500-600°C onde, enfim, a curva da biomassa decai de maneira mais suave até o valor de 900°C. Estes diferentes estágios de decaimento da biomassa refere-se à complexa mistura de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) presentes na célula microalgal com perfil de estabilidade térmica diferenciada (BATISTA; GOUVEIA; BANDARRA; FRANCO *et al.*, 2013). Ao final da análise, calculou-se a matéria resultante com valor de 26,2% (Tabela 1), que está relacionado à matéria inorgânica e compostos minerais presentes na biomassa.

Espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de Raman

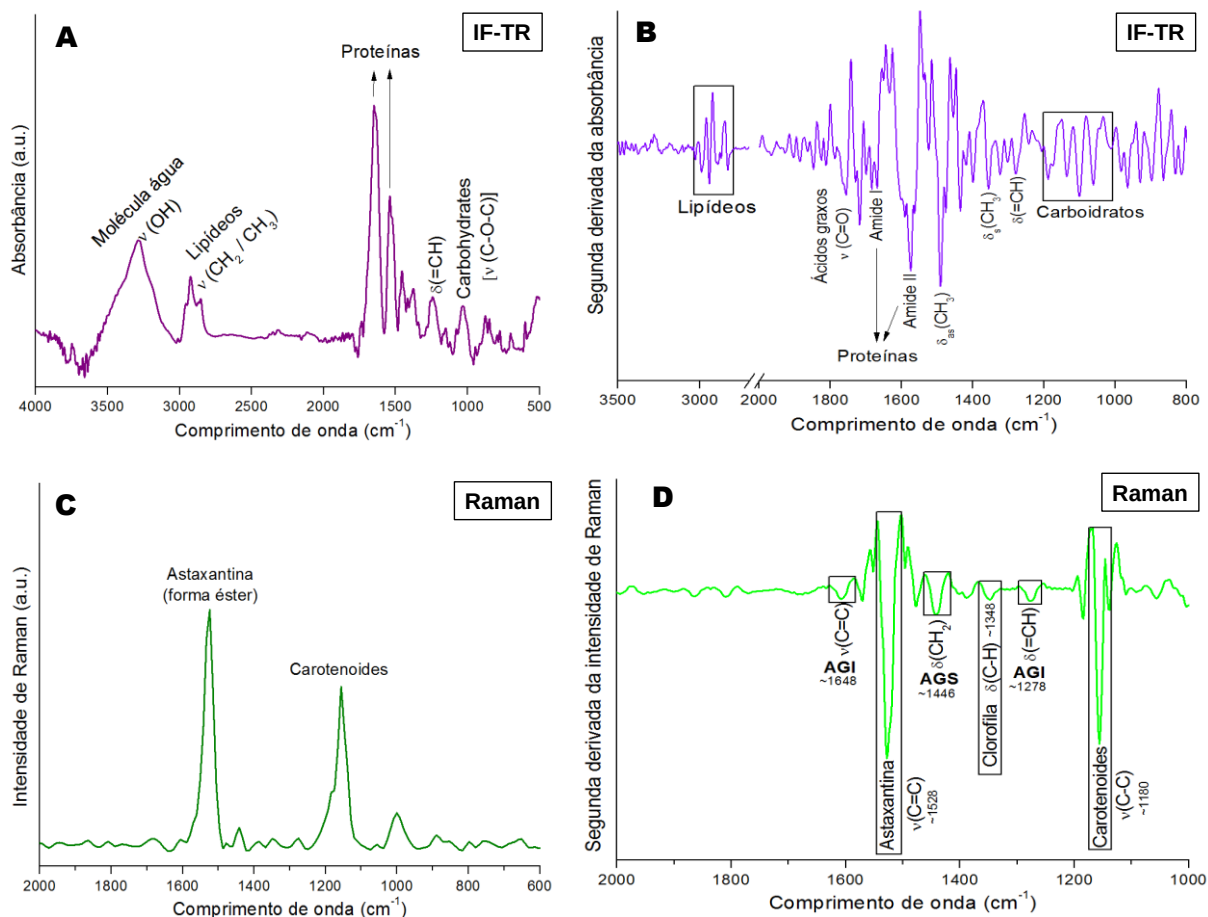
Métodos ópticos envolvem medidas baseadas na luz onde ocorre a interação da radiação com a matéria. Métodos espectrométricos tais como espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de Raman analisam a intensidade da radiação emitida ou absorvida por moléculas, íons e átomos de interesse. Estes métodos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvido na medida. O maior apelo para uso destes métodos espectrométricos se deve ao fato de: *i*) técnicas rápidas com resultados em poucos minutos, *ii*) baixa necessidade de quantidade de amostra e, *iii*) técnicas analíticas não destrutivas da biomassa (COUGO, 2017).

A espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) é uma análise que fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de uma substância ou amostra, sendo utilizada na identificação de um composto químico tais como lipídeos, proteínas e carboidratos presentes na biomassa de microalgas (Figura 3).

A espectrometria Raman, por sua vez, é uma técnica fotônica de alta resolução que proporciona em poucos segundos informações químicas e estruturais de um material, tal como a biomassa de microalgas. Esta análise se baseia no espalhamento de luz frente às rápidas mudanças de frequência de uma

fonte de laser. Na área da biotecnologia de microalgas, a análise de Raman é utilizada na informação vibracional específica para ligações químicas e simetria de moléculas, incluindo pigmentos microalgais (OSTERROTHOVÁ; CULKA; NĚMEČKOVÁ; KAFTAN *et al.*, 2019).

Figura 3 - Espectros de infravermelho e Raman da biomassa de *H. pluvialis*. A - Análise de infravermelho da microalga com identificação dos picos de absorção entre 4000 a 500 cm^{-1} ; B – Segunda derivada da absorção do infravermelho indicando o pico 3000 cm^{-1} condizente com os lipídeos [$\nu(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$], $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ relacionado às proteínas ($\delta\text{N-H}$), e 1000-1200 cm^{-1} relacionado aos carboidratos [$\delta(\text{C-O-H})$]; C – Análise de Raman indicando os picos dos carotenoides em especial a astaxantina detectada no comprimento de onda 1554 cm^{-1} ; e D – Segunda derivada de Raman indicando os picos dos ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos insaturados (AGI), pigmento astaxantina, clorofila e carotenoides.



Fonte: Matos, 2023.

Tabela 2 - Picos de absorção no infravermelho e Raman para compostos orgânicos observados na microalga *Haematococcus pluvialis* – BMAK – D16.

Infravermelho	Raman	Atribuições químicas
Comprimento de onda (cm ⁻¹)		
3600		$\nu(\text{O-H})$ relacionado a moléculas de água
3020	3008	$\nu(\text{C=CH})$ alongamentos assimétricos dos lipídeos
	2948	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ alongamentos assimétricos dos lipídeos
2900		$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ assimétrico, $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ simétrico moléculas de hidrocarbonetos
1745		$\nu(\text{C=O})$ relacionado às ligações ésteres de grupos funcionais de lipídeos e ácidos graxos
1655	1654	Associado às proteínas (IF), cis $\nu(\text{C=C})$ dos lipídeos insaturados (Raman)
1545		$\delta(\text{N-H})$ associado a aminas (NH_2) de proteínas
	1515	$\nu(\text{C=C})$ associado aos carotenoides
1470		$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ assimetria das bandas de lipídeos
	1445	$\delta(\text{CH}_2)$ deformação angular dos lipídeos saturados
1377		$\delta_{\text{a}}(\text{CH}_3)$ simetria de ligações de lipídeos e proteínas
	1331	$\delta(\text{CH}_2)$ deformação e $\nu(\text{C-N})$ alongamentos dos carboidratos, $\delta(\text{CH}_2)$ deformação da clorofila <i>a</i>
1270	1270	$\delta(=\text{CH})$ deformação dos lipídeos insaturados
1239		$\nu_{\text{as}}(\text{P=O})$ assimetria de ligações de ácidos nucleicos
	1218	$\delta(\text{C-H})$ ligação angular dos ácidos nucleicos
1154	1153	$\nu(\text{C-O-C})$ ligações de carboidratos (IF), carotenoides (Raman)
1082		$\delta(\text{C-O-H})$ deformação de polissacarídeos, $\nu_{\text{s}}(\text{P=O})$
1052		simetria das ligações de ácidos nucleicos

Referências da tabela: (GRACE; LAKSHMI; MEENAKSHI; VAIDYANATHAN *et al.*, 2020; OSTERROTHOVÁ; CULKA; NĚMEČKOVÁ; KAFTAN *et al.*, 2019).

Quando o FTIR foi aplicado na amostra de *H. pluvialis*, esta indicou a presença de moléculas de água [$\nu(\text{OH})$] no comprimento de onda de 3600 cm⁻¹, ligações químicas com estiramento assimétrico do tipo [$\nu(\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3)$] no

comprimento de onda $3020 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ que se referem aos lipídeos, bem como ligações químicas do tipo $[\nu(\text{C}=\text{O})]$ no comprimento de onda em 1745 cm^{-1} , relacionados às ligações ésteres de grupos funcionais de lipídeos e ácidos graxos. No comprimento de onda 1655 cm^{-1} se caracteriza pelas ligações químicas da vibração de estiramento da carbonila ligada à amida, enquanto que em 1545 cm^{-1} está associado às ligações do tipo $[\delta(\text{N-H})]$ de amina simples das proteínas. Por fim, as vibrações no comprimento de onda 1154 cm^{-1} estão presentes às ligações químicas $[\nu(\text{C-O-C})]$ dos carboidratos (Figuras 3A e B). Estes detalhes dos comprimentos de onda vinculados às ligações químicas estão apresentados na Tabela 2.

De acordo com a Figura 3C é possível visualizar um pico no comprimento de onda 1156 cm^{-1} relacionado aos carotenoides de menor proporção na biomassa de *H. pluvialis* que incluem neoxantina, violaxantina, luteína e β -caroteno (OSTERROTHOVÁ; CULKA; NĚMEČKOVÁ; KAFTAN *et al.*, 2019). Já no comprimento de onda de 1524 cm^{-1} ocorre um pico elevado que se refere ao pigmento astaxantina na forma esterificada. A microalga *H. pluvialis* é de fato notadamente produtora do pigmento astaxantina, sendo evidenciado pela análise de Raman. A astaxantina tem sido amplamente utilizada nas indústrias de alimentos, rações, cosméticos, aquicultura, nutracêuticos e farmacêuticos (MATOS, 2017b). A astaxantina natural já foi aprovada como um aditivo de cor nas rações de peixes (salmão) e como um ingrediente suplemento-alimentar para consumo humano nos EUA, Ásia e países europeus. Além disso, a astaxantina extraída de *H. pluvialis* possui o selo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (HAQUE; DUTTA; THIMMANAGARI; CHIANG, 2016).

Na Figura 3D, por sua vez, é apresentada a segunda derivada da intensidade de Raman que tem por objetivo selecionar o número e a posição dos picos de Raman (GRACE; LAKSHMI; MEENAKSHI; VAIDYANATHAN *et al.*, 2020). Quando a biomassa de *H. pluvialis* foi submetida a esta análise de derivada, a mesma apresentou novamente picos elevados da astaxantina condizente com as ligações $[\nu(\text{C} = \text{C})]$ e carotenoides $[\nu(\text{C} - \text{C})]$. Além disso, foi verificado um pico em 1348 cm^{-1} relacionado à clorofila com ligações $[\delta(\text{CH}_2)]$ e alguns picos em 1648, 1446 e 1278 cm^{-1} relacionados às ligações químicas dos ácidos graxos saturados $[\nu(\text{C}=\text{C})]$ e $[\delta(\text{CH}_2)]$ e insaturados $[\delta(=\text{CH})]$, respectivamente. Diferentemente do

FTIR, a espectrometria de Raman quando aplicada na biomassa de *H. pluvialis* detectou compostos de perfil lipofílicos, tais como pigmentos da classe dos carotenoides e ácidos graxos saturados e insaturados. Esta conclusão é comparável com as observações feitas por GRACE; LAKSHMI; MEENAKSHI; VAIDYANATHAN *et al.* (2020) quando avaliou o monitoramento de biomoléculas de algas verdes (*Monoraphidium contortum*, *Pseudomuriella* sp. e *Chlamydomonas* sp.) analisados por FTIR e Raman.

Conclusão

Os objetivos deste estudo foram os seguintes: i) cultivar a microalga *Haematococcus pluvialis* – BMAK D16 por 30 dias em fotobiorreator com volume de trabalho de 5L; ii) determinar o peso seco da biomassa que foi de 65 mg/L; iii) visualizar as células esverdeadas da microalga através de microscopia óptica; iv) fazer uma triagem rápida da cultura microalgal *in vivo* usando a citometria de fluxo, onde os gráfico de dispersão de luz identificou o tamanho celular enquanto que o gráfico de histograma mostrou a presença de clorofila; v) visualizar a biomassa através de microscopia eletrônica de varredura onde foi possível confirmar o tamanho celular da microalga variável em 10 a 15 μm ; vi) quantificar o teor de óleo (10,3 mg/g), clorofila (2,04 mg/g) e carotenoides totais (1,39 mg/g) da célula microalgal; vii) monitorar a variação da biomassa em função da temperatura por meio da termogravimetria que indica os diferentes estágios de decaimento da biomassa devido a uma complexa mistura de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) presentes na célula; viii) identificar através da espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) as principais bandas de comprimento de onda dos lipídeos ($2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) das proteínas ($1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) e carboidratos ($1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) com suas respectivas áreas de absorção; e ix) identificar através da espectrometria de Raman os picos absorção dos carotenoides (1156 cm^{-1}) em especial a astaxantina (1524 cm^{-1}), bem como a clorofila (1348 cm^{-1}) e os ácidos graxos saturados (1446 cm^{-1}) e insaturados (1278 cm^{-1}).

Por fim, este trabalho de pesquisa quer, ainda, contribuir com os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS 09. Indústria, inovação e infraestrutura), principalmente relacionado à meta 9.5 que menciona ‘fortalecer a pesquisa científica, incentivando a inovação e aumentando substancialmente o número de trabalhadores

na pesquisa e desenvolvimento tecnológico'. Portanto, com este trabalho de pesquisa foi possível ampliar o conhecimento da biotecnologia de microalgas utilizando equipamentos ultramodernos de microscopia e espectrofotometria.

Agradecimentos

O autor AP Matos agradece a UNESP pela bolsa de pós-doutorado (Projeto N° 4280/2022).

Referências

- ALFNES, F.; GUTTORMSEN, A. G.; STEINE, G.; KOLSTAD, K. Consumers' willingness to pay for the color of salmon: a choice experiment with real economic incentives. **American Journal of Agricultural Economics**, 88, n. 4, p. 1050-1061, 2006.
- BARKER, J.; CATTOLICO, R.; GATZA, E. Multiparametric analysis of microalgae for biofuels using flow cytometry. **White Paper, BD Biosciences**, p. 1-11, 2012.
- BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M. *et al.* Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, 2, n. 2, p. 164-173, 2013/03/01/ 2013.
- BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S. *et al.* Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility. **Algal Research**, 26, p. 161-171, 2017/09/01/ 2017.
- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, 25, n. 3, p. 743-756, 2013/06/01 2013.
- COUGO, C. D. G. **Utilização da técnica infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para estimativa das concentrações de carboidratos e de lipídeos em *Scenedesmus* sp.** 2017, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (URRGs), 99p.
- DAI, Y.-M.; CHEN, K.-T.; CHEN, C.-C. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, 250, p. 267-273, 2014.
- DARWESH, O. M.; MAHMOUD, R. H.; ABDO, S. M.; MARREZ, D. A. Isolation of *Haematococcus lacustris* as source of novel anti-multi-antibiotic resistant microbes agents; fractionation and identification of bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, 35, p. e00753, 2022.

FELLER, R.; MATOS, Â. P.; MAZZUTTI, S.; MOECKE, E. H. *et al.* Polyunsaturated ω -3 and ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical *n*-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, 133, p. 437-443, 2018.

GRACE, C. E. E.; LAKSHMI, P. K.; MEENAKSHI, S.; VAIDYANATHAN, S. *et al.* Biomolecular transitions and lipid accumulation in green microalgae monitored by FTIR and Raman analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 224, p. 117382, 2020.

HAQUE, F.; DUTTA, A.; THIMMANAGARI, M.; CHIANG, Y. W. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food and Bioprocess Processing**, 99, p. 1-11, 2016.

JÚNIOR, J. N. D. S.; DA SILVA, A. C.; OLIVEIRA, K. K. D. S.; MOREIRA, L. R. *et al.* Green microalgae as a potential source of trypanocide compounds. **Natural Product Research**, p. 1-7, 2023.

KUMAR, K.; MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S. *et al.* Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 51, p. 875-885, 2015.

KUTNER, D. S.; BOWMAN, J. S.; SALDANHA-CORRÊA, F. M.; CHUQUI, M. G. *et al.* Inorganic carbon assimilation by planktonic community in Santos Basin, Southwestern Atlantic Ocean. **Ocean and Coastal Research**, 71, p. e23006, 2023.

LOURENÇO-LOPES, C.; FRAGA-CORRAL, M.; JIMENEZ-LOPEZ, C.; CARPENA, M. *et al.* Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. **Trends in Food Science & Technology**, 2021/03/20/ 2021.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. RiMa São Carlos, 2006.

MANIVASAGAN, P.; BHARATHIRAJA, S.; SANTHA MOORTHY, M.; MONDAL, S. *et al.* Marine natural pigments as potential sources for therapeutic applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 38, n. 5, p. 745-761, 2018.

MATOS, Â. P. **Algal Cultivation, Characterization and Processing Techniques**. 2017a., Federal University of Santa Catarina.

MATOS, Â. P. The impact of microalgae in food science and technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 94, n. 11, p. 1333-1350, 2017b.

MATOS, Â. P.; MORIOKA, L. R. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, 2014.

MATOS, Â. P.; TEIXEIRA, M. S.; CORRÊA, F. M.; MACHADO, M. M. *et al.* Disruption of *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) rigid cell wall by non-

thermal plasma prior to lipid extraction and its effect on fatty acid composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 36, p. 1419-1428, 2020.

MATOS, Â. P.; VADIVELLOO, A.; BAHRI, P. A.; MOHEIMANI, N. R. Anaerobic digestate abattoir effluent (ADAE), a suitable source of nutrients for *Arthrospira platensis* cultivation. **Algal Research**, 54, p. 102216, 2021/04/01/ 2021.

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

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A.; ISDEPSKY, A.; SING, S. F. Standard methods for measuring growth of algae and their composition. *In: Algae for Biofuels and Energy*: Springer, 2013. p. 265-284.

MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P.; DE BOER, K.; BAHRI, P. A. Biomass and biofuels from microalgae. **Biofuel and Biorefinery Technologies. Springer-Verlag GmbH**, 2015.

OLIVEIRA, C. Y. B.; ABREU, J. L.; SANTOS, E. P.; MATOS, Â. P. *et al.* Light induces peridinin and docosahexaenoic acid accumulation in the dinoflagellate *Durusdinium glynnii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 106, n. 18, p. 6263-6276, 2022.

OLIVEIRA, C. Y. B.; JACOB, A.; NADER, C.; OLIVEIRA, C. D. L. *et al.* An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. **Journal of Environmental Management**, 320, p. 115897, 2022/10/15/ 2022.

OSTERROTHOVÁ, K.; CULKA, A.; NĚMEČKOVÁ, K.; KAFTAN, D. *et al.* Analyzing carotenoids of snow algae by Raman microspectroscopy and high-performance liquid chromatography. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 212, p. 262-271, 2019.

STAUBER, J. L.; FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. **Trends in Biotechnology**, 20, n. 4, p. 141-143, 2002.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, 27, n. 3, p. 1109-1119, 2015/06/01 2015.