

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

**FTIR – ATR aplicado à discriminação de microalgas
planctônicas verdes cocóides**

Guilherme Pavan de Moraes

São Carlos
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

**FTIR – ATR aplicado à discriminação de microalgas
planctônicas verdes cocóides**

Guilherme Pavan de Moraes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais

São Carlos
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M827fa Moraes, Guilherme Pavan de.
FTIR – ATR aplicado à discriminação de microalgas
planctônicas verdes cocóides / Guilherme Pavan de Moraes.
-- São Carlos : UFSCar, 2014.
62 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Ficologia. 2. Chlorophyceae. 3. Discriminação. 4.
Espectroscopia de infravermelho. 5. Quimiometria. I. Título.

CDD: 589.3 (20^a)

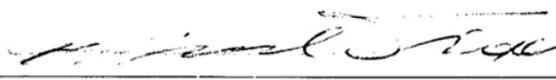
Guilherme Pavan de Moraes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 30 de maio de 2014

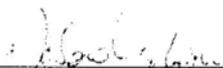
BANCA EXAMINADORA

Presidente



Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
(Orientador)

1º Examinador



Profa. Dra. Débora Marcondes Bastos P. Milori
EMBRAPA

2º Examinador



Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna
USP/São Paulo-SP

Agradecimentos

À UFSCar por formar grande parte do que hoje sou, muito além da mera titulação acadêmica, sendo de fato um ambiente transformador.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN), por toda a estrutura de aprendizado disponibilizada.

Ao professor Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, por todos os ensinamentos, orientações, conversas, paciência e a confiança depositada em mim, além de disponibilizar um laboratório com estrutura espetacular. Este trabalho não seria de forma alguma possível sem sua orientação.

À professora Dra. Lucimara Aparecida Forato da Embrapa – Instrumentação São Carlos, que mesmo sem ter participado diretamente deste trabalho me ajudou bastante, tanto no início, quando eu ainda patinava para aprender sobre o FTIR, quanto no fim em sua ajuda para compor as bancas avaliadoras.

À Thaís Garcia da Silva, amiga e companheira de laboratório, pelas infindáveis discussões sobre taxonomia e classificações dos grupos de microalgas conforme obtinha meus resultados, além da identificação de grande parte das cepas que utilizei.

À prof. Dra. Célia Leite Sant'Anna e à prof. Dra. Andrea Tucci, que gentilmente ajudaram com a identificação de cepas para este trabalho.

À Inessa Lacativa Bagatini, também amiga e companheira de laboratório, pelas novamente infindáveis conversas sobre este trabalho, questionamentos e pedidos de opiniões e aquele eventual pedido de socorro desesperado.

À Helena Henriques Vieira, minha grande amiga, namorada e companheira de laboratório, pela enorme (mesmo) paciência em ouvir meus resmungos ranzinzas e reclamações. Também por me ajudar a entender muitas vezes meu próprio trabalho, pelas sucessivas leituras de pedaços do

meu texto e respostas ao questionamento “E aí, o que achou?” (às vezes muitas vezes ao dia) e pela cumplicidade no eventual desespero e nos alívios e alegrias, já que fizemos o mestrado no mesmo laboratório ao mesmo tempo.

Ao Fabrício Sebastiani Meccheri, pelas eventuais conversas e “trocas de figurinhas” no laboratório, mas principalmente pela diversão e leveza da convivência, tanto no trabalho quanto em nossa república. Minha sanidade agradece bastante.

A todo o pessoal do laboratório, Luís, Letícia, Ingritt, Cilene, Naiara, Rodrigo (Chico), Lucas, pela convivência tranquila, conversas, risadas, gordices em aniversários e, principalmente, pelo aprendizado mútuo e o contato com diferentes trabalhos.

Ao Rodrigo Pepino, que me apresentou e ensinou os rudimentos do FTIR, além da amizade e das diversas cervejas, pancetas e saídas.

Aos meus amigos de São Carlos de fora do laboratório, Isabela (Baratinha), Rafael (Kiki), ao Lucas, Marcel e João (além de amigos companheiros de banda), André (Cabeção), Aline, Pedro Rizzato e Camila Martins, Pedro Oliveira (que se mudou para longe), Fernanda, Vinícius (Vini), Carolina (Caips), que em maior ou menor grau e de diferentes formas deram seu apoio.

À minha família, em especial meus pais, que sempre acreditaram em mim e me estimularam a estudar, além de proporcionarem todas as condições para que eu me formasse e realizasse meu mestrado.

À minha segunda família - meus sogros que também deram muito apoio para a realização deste trabalho (e com quem compartilho o gosto por uma boa cerveja), além dos meus cunhados e cunhadas das duas famílias, que me ajudaram a lembrar de que existe vida fora do laboratório.

Também gostaria de agradecer a CAPES/CNPq pelo financiamento da bolsa de mestrado, e à FAPESP que financia o projeto temático no qual este trabalho se insere.

Lista de figuras:

Figura 1. Curvas de crescimentos das 13 cepas utilizadas, determinadas por quantidade de clorofila a (em mg/L, losângulo) e densidade ótica (quadrado) medida nos comprimentos de onda 680nm (*M. pinnatifida* (089), *A. densus* (128) e *S. bibraianum* (241) e 682nm (todas as restantes).

Figura 2. Composição dos 12 espectros brutos obtidos para cada uma das 13 cepas utilizadas. Aquisição espectral através da técnica de Attenuated Total Reflectance (ATR). A leitura de cada espectro foi feita com intervalo espectral de 4000 a 630 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , apodização por função triangular e média de 128 espectros co-adicionados.

Figura 3. Espectros das 13 cepas utilizadas processados pelo pré-tratamento da primeira derivada com janela de nove pontos. Intervalo espectral de 1800 a 630 cm^{-1} .

Figura 4. Efeito do pré-processamento de centralização pela média dos espectros brutos exemplificado pela espécie *A. densus* (003). Intervalo espectral de 1800 a 675 cm^{-1} .

Figura 5. Composição com todos os espectros das cepas utilizadas tratados com a primeira derivada com nove pontos, explicitando as janelas espectrais. WI – janela de 1800 – 1700 cm^{-1} ; WII – janela de 1700 – 1500 cm^{-1} ; WIII – janela de 1500 – 1200 cm^{-1} ; WIV – janela de 1200 – 900 cm^{-1} ; WV – janela de 900 – 675 cm^{-1} .

Figura 6. Composição de PCAs (Principal Components Analysis) utilizados para avaliar as separações obtidas com diferentes combinações de janelas espectrais. Os dados utilizados foram os obtidos pela aplicação da primeira derivada com nove pontos. Nem todas as combinações possíveis são mostradas. (a) janelas I, II, III, IV e V; (b) janelas III, IV e V; (c) janelas I, II, III e V; (d) janelas IV e V; (e) janelas III e V.

Figura 7. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V). As cepas estão individualizadas sem sobreposição e tem seus nomes ampliados na frente de seus respectivos clusters. Valores de bootstrap (1000 réplicas) são apresentados nos nós, omitidos para as réplicas de leitura de uma mesma cultura.

Figura 8. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais acrescida da janela dos carboidratos (janelas III, IV e V). Valores de bootstrap (1000 réplicas) são apresentados nos nós, omitidos para as réplicas de leitura de uma mesma cultura.

Figura 9. PCA dos dados de espectros brutos (a) e espectros brutos centralizados pela média (b) de todas as cepas utilizadas. Espécies não identificadas.

Figura 10. PCA com os dados dos espectros tratados com a primeira derivada com janela de 15 pontos (a) e segunda derivada com janela de 15 pontos (b) de todas as cepas utilizadas. Espécies não identificadas.

Figura 11. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a primeira derivada com 15 pontos.

Figura 12. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a segunda derivada com 15 pontos. As setas indicam os pontos com separações erradas, tanto entre réplicas de leitura quanto a separação de uma réplica de cultivo de suas outras duas réplicas.

Figura 13. PCA com os dados dos espectros tratados com a primeira derivada com 5 pontos. Espécies não identificadas.

Figura 14. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a primeira derivada com 5 pontos.

Figura 15. Representação das vibrações de alongamento simétricas e assimétricas.

Adaptado de Stuart (2004). Apêndice 1

Figura 16. Representação das vibrações de dobramento no plano e fora de plano.

Adaptado de Stuart (2004). Apêndice 1

Figura 17. Interferômetro de Michelson. Primeiro caminho da divisão do feixe inicial: t = feixe transmitido; rt = feixe t refletido; rdr_t = feixe rt refletido no divisor de feixe em direção ao detector; trt = feixe rt transmitido em direção à fonte; Segundo caminho da divisão do feixe inicial: rd = feixe refletido no divisor de feixe; rd_2 = feixe rd refletido no espelho móvel; trd_2 = feixe rd_2 transmitido em direção ao detector; $rdrd_2$ = feixe rd_2 refletido no divisor em direção à fonte. Notar que rdr_t e trd_2 são os feixes que interferem e são lidos no detector. Apêndice 1

Figura 18. Efeito do interferômetro sobre sinais de diferentes comprimentos de onda. Em comprimentos de onda maiores, a frequência do sinal é mais baixa (A). Comprimentos de onda menores geram interferômetros com frequências mais altas (B). Em interferômetros policromáticos ocorre a superposição das frequências dos sinais de todos os comprimentos de onda presentes, exemplificado com apenas dois sinais (C). Apêndice 1

Figura 19. Curvas de crescimento das réplicas individuais de cultivo, acompanhadas por clorofila a (mg/L, losângulos) e por densidade ótica (quadrados). As cepas estão identificadas apenas por seus códigos.

Resumo

Este trabalho propõe o uso da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) como parte de uma abordagem polifásica para ajudar na identificação e classificação de microalgas verdes cocóides. A técnica ATR (Attenuated Total Reflectance) foi testada quanto a sua capacidade de fornecer espectros altamente reprodutíveis, requerimento primário para obter boa discriminação entre cepas de microrganismos. Testou-se a seleção de janelas espectrais, em conjunção com pré-tratamentos dos espectros, para determinar o melhor método para realizar a separação das cepas. Os resultados foram avaliados quanto à reprodutibilidade do espectro e através de análises de quimiometria por análise de componentes principais (PCA) e análise de clusters hierárquicos (HCA), em termos da correta discriminação e classificação das cepas de microalgas clorofíceas cocóides proximamente relacionadas, comparadas com as classificações atualmente aceitas obtidas da literatura. A técnica de ATR forneceu a reprodutibilidade necessária, verificada pela excelente discriminação das cepas. Adicionalmente, as cepas foram posicionadas em clusters no HCA que se correlacionam corretamente com as classificações das ordens e famílias. No entanto, para obter estes resultados usamos janelas espectrais que diferem de estudos anteriores, 1500 – 1200 cm^{-1} e 900 – 675 cm^{-1} , excluindo regiões do espectro relativas a compostos de reservas, as quais influenciaram negativamente as análises. Concluimos que a técnica de FTIR – ATR tem grande potencial para ajudar as abordagens tradicionais de identificação e classificação de microalgas verdes cocóides, contanto que uma cuidadosa seleção de regiões espectrais seja realizada.

Abstract

This work proposes the use of the Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy as part of a polyphasic approach to assist the identification and classification of coccoid green microalgae. Attenuated Total Reflectance (ATR) technique was tested to determine if it can provide highly reproducible spectra, a primary requirement to achieve good discrimination between strains of microorganisms. It was also tested spectral window selection, in conjunction with spectra pre-treatments, to determine the best method to perform the strains discrimination. The results were evaluated by reproducibility of spectra and chemometrics analyses by principal components (PCA) and hierarchical clusters (HCA) analysis, in terms of correct discrimination and classification of closely related chlorophycean coccoid microalgae strains, compared to currently accepted classifications. ATR technique provided the reproducibility needed, verified by the excellent strains discrimination. Further, strains were positioned by HCA in clades correctly correlated to classification ranks orders and families. However, these results were obtained when using spectral windows that differ from previously reported studies, 1500 – 1200 cm^{-1} and 900 – 675 cm^{-1} , excluding spectrum regions relative to storage compounds, which was found to negatively impact the analyses. It was concluded that the ATR - FTIR technique has great potential to assist traditional approaches of coccoid green microalgae identification and classification, though a careful spectrum region selection is needed.

Sumário

Lista de figuras:.....	I
Resumo	IV
Abstract	V
1. Introdução	1
1.1. <i>Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR</i>	1
1.2. <i>Aplicação de FTIR para ajudar na identificação de espécimes microbiológicos</i>	4
1.3. <i>Organismos de estudo e delimitação do grupo estudado: Sphaeropleales – microalgas cocóides</i>	7
2. Materiais e métodos.....	12
3. Resultados	16
3.1. <i>Comprimentos de onda utilizados para acompanhamento da curva de crescimento por densidade ótica</i>	16
3.2. <i>Curvas de crescimento por densidade ótica e clorofila –a</i>	16
3.3. <i>Concentração das suspensões celulares usadas na obtenção dos filmes para análise espectroscópica</i>	18
3.4. <i>Reprodutibilidade espectral e testes de pré-tratamento dos espectros</i>	20
3.5. <i>Análises multivariadas: discriminação das cepas e congruência com classificação atualmente aceita</i>	24
4. Discussão	38
5. Conclusões.....	47
Bibliografia.....	48
Apêndice 1. <i>FTIR: Processos físicos que geram os espectros e princípio de funcionamento do equipamento</i>	52
Apêndice 2. <i>Curvas de crescimento individuais das culturas</i>	60

1. Introdução

1.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica vibracional que produz espectros que consistem de um grande número de bandas de absorção, onde cada banda – ou frequência fundamental de vibração – é influenciada pelo movimento de todos os átomos da molécula.

Vibrações nas moléculas e seus átomos são percebidas pelo aparelho, em nível quântico, pela formação e/ou variação de momentos de dipolo elétrico entre os átomos de uma dada ligação química. Como o momento dipolo é um vetor quantidade resultante dos momentos dipolos entre todos os átomos da molécula, entende-se porque a vibração de uma ligação é influenciada pelas vibrações de todas as outras ligações presentes na molécula.

Estas vibrações são induzidas pelo feixe de radiação infravermelha emitido pelo aparelho ao passar pelas moléculas analisadas, e quanto mais intenso a variação do momento dipolo (vibração), maior a absorção em uma dada banda. A absorção de uma banda é obtida determinando-se qual fração da energia infravermelha incidente é absorvida por uma ligação química específica (Stuart 2004), ou seja, a diferença de energia da radiação incidente entre antes e depois dela passar por uma ligação química da amostra.

Em profundidade, um *modo normal de vibração* molecular é uma onda sinusóide com frequência ν (letra grega *nu*) que representa as distâncias entre dois átomos de uma ligação química em um dado plano de movimentação ou o movimento rotacional ou translacional de uma molécula inteira em função do tempo.

Esta vibração é excitada quando uma molécula em seu estado fundamental (estado de menor energia) absorve um *quantum* com energia E correspondente exatamente à frequência de vibração de uma ligação química específica. Para entender melhor este mecanismo, é

necessário revisar alguns conceitos de radiação eletromagnética, aqui baseados no livro de (Stuart 2004).

O espectro eletromagnético é constituído por regiões de ondas de rádio, microondas, infravermelho, luz visível, ultravioleta, raio-x e raio-γ. Embora essas regiões interajam de diferentes formas com a matéria, todas tem a mesma velocidade de propagação no vácuo – velocidade da luz (c). Essa constante se relaciona com comprimento de onda (λ) e frequência (ν) como se segue (Eq. 1):

$$c = \lambda \times \nu \quad \text{(Equação 1)}$$

Por convenção, na espectroscopia de infravermelho a unidade que determina as diferentes bandas de absorção é chamada “número de onda” ($\bar{\nu}$), expressa em número de ondas contidas em 1 centímetro, com unidade denominada *centímetro inverso* (cm^{-1}) (Naumann 2000). Essa unidade é obtida através da seguinte relação (Eq. 2):

$$\bar{\nu} = 1/\lambda = \nu/c \quad \text{(Equação 2)}$$

Por conta da característica da radiação eletromagnética poder ser entendida como um fluxo de partículas, com massa e energia específicas (*quanta* ou fótons) e, portanto, sendo capaz de interagir com a matéria de forma não-contínua (discreta), Bohr desenvolveu a seguinte equação para calcular o energia de um *quantum* a partir da frequência associada ao seu comprimento de onda (λ) (Eq. 3):

$$E = h \times \nu, \quad \text{(Equação 3)}$$

onde h é a constante de Planck e ν é a frequência.

A unidade número de onda (cm^{-1}) apresenta a vantagem de ser linear com a energia por ser diretamente proporcional à frequência clássica, que pode ser obtida multiplicando o número de onda ($\bar{\nu}$) pela velocidade da luz (c) (Norris 1959).

$$\bar{\nu} = \nu/c \text{ e } \nu = E/h. \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{Logo } \bar{\nu} = \frac{E}{h/c} \quad (\text{Equação 5})$$

Como h e c são constantes, $\bar{\nu}$ é diretamente proporcional à energia (Eq. 4 e Eq. 5). Por ser linear com a energia, e *quanta* com energias específicas serem necessários para excitar vibrações de ligações atômicas específicas, fica evidente a preferência e a facilidade em se usar esta unidade.

Devido a esta interação em níveis específicos da matéria com a luz, as mudanças que esta causa na matéria são representadas por níveis discretos de energia – E_0, E_1, E_2 , etc – de forma que cada átomo ou molécula deve obrigatoriamente existir em um desses níveis, os quais são sempre múltiplos inteiros da energia do seu nível fundamental (E_0) (Stuart 2004).

Quando uma molécula interage com radiação, um *quantum* de energia é emitido ou absorvido, e a diferença de energia deve ser exatamente a diferença entre dois níveis de energia consecutivos. Portanto, assim como há um nível energético determinado para cada um desses estados, existe também uma frequência específica para cada um deles, sendo as frequências associadas a estes níveis energéticos múltiplos inteiros da frequência fundamental (Stuart 2004).

Cada número de onda, ou seja, cada valor de energia, corresponde a um tipo de vibração único (dos vários possíveis) em ligações entre átomos específicos. Esta vibração, quando excitada, gera um momento dipolo elétrico ou modifica um já existente, o qual será proporcional à intensidade da banda no espectro. Assim, quanto maior o dipolo elétrico gerado, seja por fornecer mais energia (*quanta* em níveis energéticos múltiplos da energia fundamental da ligação), seja por aumentar o número dessas ligações aumentando a quantidade de amostra, maior a quantidade de energia absorvida e mais intensa é a banda no espectro.

Para mais informações sobre a técnica e o princípio de funcionamento do aparelho de FTIR, veja o apêndice 1.

1.2. *Aplicação de FTIR para ajudar na identificação de espécimes microbiológicos*

Em outras áreas e com outros objetivos esta técnica é comum e utilizada há mais tempo, como na análise de polímeros (Buffeteau et al. 1996), análise de biopolímeros (Blokker et al. 1999), aplicações na área farmacêutica (Wartewig e Neubert 2005), resíduo de detergentes em reconstituição de membranas proteicas (Pistorius et al. 1994), controle de composição e qualidade de alimentos (Luinge et al. 1993; Tapp et al. 2003; Al-Jowder et al. 1999; Al-Jowder et al. 2002), entre outras diversas aplicações.

Para micro-organismos a técnica é relativamente recente. Embora a primeira menção do uso desta técnica para analisar materiais biológicos provavelmente tenha sido feita por W.W. Coblentz em 1911 (Naumann 2000), e existam alguns trabalhos com o objetivo de identificar e classificar bactérias na década de 1950 (Thomas e Greenstreet 1954; Norris 1959), a técnica era inviável para esta aplicação, já que computar todas as interações entre as bandas requer um poder computacional não disponível na época. De fato, esta técnica só voltou a ser utilizada com esta finalidade na década de 1970 (Mariey et al. 2001).

O primeiro grupo a ser sistematicamente estudado com esta técnica foi o das bactérias, com os estudos se iniciando no final da década de 1980 e começo da década de 1990, principalmente com Helm e colaboradores (Helm et al. 1991b; Helm et al. 1991a; Naumann 2000). Nestes estudos foi demonstrado que esta técnica é viável para a identificação de bactérias até o nível de cepas, e nosso trabalho é em parte baseado nestes trabalhos.

Sobre microalgas, existem poucos trabalhos utilizando esta técnica para discriminação de cepas (Kansiz et al. 1999; Domenighini e Giordano 2009), e muitos outros sobre o

monitoramento de uma dada biomassa produzida, normalmente com o objetivo de acompanhar a composição das células em diversas situações de nutrição e/ou estresses (Giordano et al. 2001; Beardall et al. 2001; Stehfest et al. 2005; Hirschmugl et al. 2006; Montechiaro et al. 2006; Dean et al. 2010).

Qualquer que seja o objetivo, o espectro obtido pelo FTIR é uma sobreposição/interação das absorbâncias de todas as ondas das frequências de infravermelho do intervalo utilizado, as quais são referentes a ligações químicas específicas. Como exposto por Naumann (2000), os espectros de infravermelho de amostras microbiológicas, no contexto de identificação de espécies, são uma mistura indecifrável de centenas ou mesmo milhares de bandas - referentes ao conteúdo total das células-, que não podem ser tomadas separadamente e estudadas de forma individual.

Para resolver este problema, técnicas de reconhecimento de padrões devem ser utilizadas. Estas técnicas consideram os espectros como *fingerprints* dos organismos e não apenas uma combinação de bandas com diferentes intensidades, frequências e larguras. Com isso, temos que os espectros resultantes são bastante espécie-específicos, especialmente na região do espectro especificamente conhecida como *fingerprint* verdadeira, entre aprox. 900 cm^{-1} até 630 cm^{-1} (Naumann 2000), embora outras regiões também foram reportadas como bastante espécie-específicas (Kansiz et al. 1999; Preisner et al. 2006; Domenighini e Giordano 2009).

Assim, a técnica consiste numa análise total da composição química da espécie naquele momento. Como essa composição depende da expressão genética, o espectro de FTIR mostra um *fingerprint* fenotípico e genotípico completo da célula estudada (Naumann 2000). Assim, questões como diferenças ecofisiológicas, composição celular e até mesmo a morfologia, afetada pelas duas primeiras, são levadas em conta, mesmo que indiretamente.

Portanto, esta técnica considera todo o genoma da microalga, com ênfase no que está sendo de fato expressado em um dado momento, para discriminar e, potencialmente, ajudar a estabelecer classificações desses organismos. Além disso, a técnica do FTIR é extremamente rápida, simples, com baixos custos de operação e não requer que qualquer solvente ou reagente seja usado, resultando em uma análise não destrutiva.

Kansiz et al. (1999) e Domenighini e Giordano (2009) testaram em seus trabalhos várias regiões e combinações de regiões do espectro para realizar a separação de cepas de Cyanobacteria e de diversas microalgas marinhas, respectivamente, chegando a boas separações de cepas de taxa superiores (divisões, classes, ordens e famílias). Eles usaram a técnica de deposição das amostras em janelas de materiais inativos para infravermelho, que não tem bandas de absorção no intervalo espectral usado na análise (KRS – 5 (tálio – brometo – iodeto) e janelas de silício, respectivamente), para suas aquisições espectrais.

Um problema que surge com esta técnica de aquisição espectral se relaciona à espessura do filme da amostra depositada. Variações na espessura dos filmes, comuns neste tipo de técnica, influenciam a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. O procedimento para lidar com este problema é dividir o espectro todo pela banda relativa à amida II das proteínas, depois de se determinar a quantidade mínima de biomassa requerida para produzir filmes homogêneos com boa razão sinal-ruído, sem que ocorra saturação de bandas (Domenighini e Giordano 2009).

Esta abordagem consiste essencialmente em normalizar os espectros em relação à biomassa presente no filme, em termos de proteínas, representadas pela banda de amida II, para compensar as variações na espessura dos filmes. É necessário fazer isso porque variações na espessura dos filmes introduzem diferenças nos espectros que não tem significância biológica.

Assim, nos propusemos a testar a técnica Attenuated Total Reflectance (ATR) – Reflectância Atenuada Total – para contornar esta dificuldade. Com o ATR, variações na espessura dos filmes não são uma preocupação contanto que uma espessura mínima de filmes seja atingida, embora a técnica perceba variações na biomassa. Nesta técnica, somente radiação atenuada interage com a amostra, sempre com a mesma profundidade de penetração, eliminando saturação de bandas e problemas com variações da espessura dos filmes.

1.3. Organismos de estudo e delimitação do grupo estudado: *Sphaeropleales* – microalgas cocóides

Microalgas é um termo não natural e não relacionado à taxonomia, que define um grupo grande de organismos fotossintetizantes oxigênicos, microscópicos, eucarióticos e procarióticos, que não possuem estruturas diferenciadas, como raízes, caule, folhas e sistemas vasculares, apresentando geralmente organização unicelular ou colonial, mas sem especialização de células para diferentes funções (Hoek 1995; Pulz e Gross 2004). Isso significa que cada célula pode sobreviver isoladamente já que é capaz de desempenhar todas as funções necessárias à sua sobrevivência.

Este grupo predomina no fitoplâncton, embora também existam espécies bentônicas e perifíticas, sendo que a quase totalidade de seus componentes realizam fotossíntese e vivem majoritariamente em ambientes aquáticos, embora existam espécies em ambientes terrestres, mas que ainda assim são dependentes da água para completar os seus ciclos de vida.

O conjunto de microalgas é usualmente distribuído através de divisões (=filos) de algas que possuem as características citadas, junto de organismos com outras organizações do talo (como filamentosa, palmelóide, talosa, sifonosa, etc). As divisões que contêm organismos com características de microalgas, de acordo com Hoek (1995) seriam: Cyanophyta e

Prochlorophyta (ambos procariotos, reino Eubacteria), Glaucophyta, várias classes de Heterokontophyta (maioria das Chrysophyceae, Xanthophyceae, Eustigmatophyceae, Bacillariophyceae), a maior parte de Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta e Chlorophyta.

As microalgas são os principais produtores primários de todos os ambientes aquáticos por conta da sua atividade fotossintética (Harwood e Guschina 2009), a qual é o principal meio de produzir carbono orgânico pela fixação de carbono inorgânico (Léveillé et al. 1997). Em ambientes de água doce tropicais e sub-tropicais a classe Chlorophyceae, é um dos mais abundantes grupos no fitoplâncton eucariótico, sendo, portanto, de grande importância ecológica.

A divisão Chlorophyta compreende as chamadas algas verdes, cuja cor característica é determinada pela presença de clorofilas a e b não mascaradas por pigmentos acessórios (Hoek 1995), embora estes ocorram e sejam compartilhados com as embriófitas (betacarotenos e xantofilas) (Lewis e McCourt 2004).

São organismos que possuem plastídios com duas membranas, produzem amido como material de reserva no estroma do cloroplasto e, quando possuem parede celular, esta é composta principalmente por celulose (Lewis e McCourt 2004), embora muitas possuam uma cobertura (teca) glicoproteica. Estas características também são divididas com Embryophyta (Gould et al. 2008).

A classe Chlorophyceae possui organismos que ocupam diversos habitats, desde águas doces, salobras e salgadas a ambientes terrestres, e possuem diversas organizações celulares, como cocóides e monoides unicelulares, coloniais de vários tipos (como cenóbios), flagelados ou não, palmelóides e filamentosos simples ou ramificados com diferenciação celular ou não (Hoek 1995; Lewis e McCourt 2004). Todas as espécies desta classe apresentam mitose fechada e citocinese através de ficoplasto, possuem dois, quatro ou múltiplos flagelos, e

espécies com dois ou quatro flagelos têm suas raízes dispostas em posição 1-7 (CW) ou 12-6 (DO) (Lewis e McCourt 2004). Quando possuem reprodução sexuada, esta ocorre por meiose zigótica (ciclo de vida haplobionte) (Lewis e McCourt 2004).

As ordens desta classe eram anteriormente definidas por sua morfologia vegetativa através de características como presença/ausência de pirenoides, a formação e organização de colônias, curvatura das células, incrustações na parede celular, envelopes mucilaginosos, e principalmente a forma de reprodução - se sua reprodução sexuada era através de isogamia, anisogamia ou oogamia, a forma de reprodução assexuada (autósporo ou zoósporo) - e, posteriormente, através de características ultraestruturais citológicas, como disposição das raízes flagelares, tipo de mitose e citocinese, cobertura celular e outras (Mattox e Stewart 1984; Krienitz et al. 2001; Lewis e McCourt 2004; Krienitz e Bock 2012).

Ultimamente, a utilização de marcadores moleculares genéticos está sendo empregada para a resolução de problemas comuns ao grupo, especialmente para as espécies que apresentam evolução convergente para redução de caracteres morfológicos (inclusive com ocorrência de espécies crípticas), como a perda de células móveis, comuns nas clorofíceas cocóides - mas também nas coloniais -, algo que não pode ser resolvido completamente com a utilização de características ultraestruturais, neste exemplo a comparação das raízes flagelares (Lewis e McCourt 2004).

A identificação e classificação das espécies de algas verdes cocóides tem mudado constantemente, acompanhando a obtenção de novas evidências. A biologia molecular tem revolucionado a identificação e classificação das espécies analisadas em praticamente todos os grupos de algas, e isso é especialmente verdadeiro para as algas verdes cocóides, dadas as dificuldades de identificação e classificação deste grupo.

Assim, a identificação de espécies de microalgas cocóides verdes, especialmente da ordem Sphaeropleales, foco deste trabalho, não é uma tarefa trivial. De início, a mera

delimitação de *o que* é uma espécie para esse grupo é complexa, e dado que a classificação depende da correta identificação percebe-se que esta tarefa fica bastante dificultada.

O conceito de espécies biológicas de Mayr (1942) diz que uma espécie se constitui de uma dada população isolada sexualmente capaz de se intercruciar. No entanto, a maior parte das Sphaeropleales podem manter suas populações por tempo indeterminado apenas com reprodução assexuada, e muitas de fato não apresentam qualquer reprodução sexuada, sendo estritamente autospóricas (Huss et al. 1999; Lewis e McCourt 2004; Krienitz e Bock 2012). Portanto, este conceito não serve para este grupo de clorofíceas cocóides de água-doce.

O conceito de espécie morfológica, explicado anteriormente, ainda continua sendo utilizado, por comodidade e ausência de outra definição mais efetiva, para o estabelecimento de clados taxonômicos neste grupo. No entanto, pelas evidências até agora acumuladas por estudos a partir de marcadores genéticos, como 18S rDNA, ITS2, rbcL entre outros (Yoshinaga et al. 1988; An et al. 1999; Krienitz et al. 2001; Fawley et al. 2006; Saunders e Kucera 2010; Hegewald et al. 2010; entre muitos outros), o conceito de espécie morfológica também não se correlaciona bem com a identificação das espécies.

Estes trabalhos com marcadores genéticos ora sugerem novos gêneros, ora sugerem fundir dois gêneros em um único, frequentemente mudando o posicionamento dos organismos para ordens e famílias diferentes das anteriormente utilizadas, demonstrando que o conceito morfológico de espécie não é adequado para estabelecer grupamentos naturais para este grupo. De fato, na melhor das situações de utilização deste conceito, a biologia molecular confirmou algumas das relações filogenéticas inferidas pelos estudos de ultraestrutura apenas para os grupos taxonômicos mais altos, como divisões, classes e ordens (Krienitz e Bock 2012).

Embora a biologia molecular tenha se mostrado uma ferramenta bastante poderosa na resolução destes problemas, ainda há um grande caminho a ser percorrido. Em primeiro lugar,

porque são poucos os estudos moleculares realizados com as microalgas, haja vista serem poucos os que pesquisam microalgas no mundo, em especial o grupo de microalgas verdes cocóides. Em segundo lugar, fica evidente que apenas um ou outro marcador molecular não é suficiente para resolver as classificações.

Quando comparamos os trabalhos de Krienitz et al. (2001) e Fawley et al. (2006), vemos que somente o uso do marcador 18S rDNA, o marcador mais amplamente utilizado, levou a conclusões divergentes sobre a identificação e delimitação de espécies e gêneros, embora este marcador funcione bem nos níveis de ordens e famílias (Krienitz e Bock 2012).

Por outro lado, marcadores como o ITS2, mais variáveis, são melhores para resolver a identificação nos níveis de gêneros e espécies, mas não são tão úteis para níveis hierárquicos superiores (veja Hegewald et al. 2010). Assim, Krienitz e Bock (2012) citando Pröschold e Leliaert (2007) sugerem que a abordagem polifásica, combinando aspectos morfológicos, ecofisiológicos e moleculares, seja a mais eficiente para a resolução destes problemas da sistemática moderna.

Em um trabalho polifásico, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) se constitui em uma ferramenta bastante interessante. As possibilidades de uso do FTIR são bastante amplas, dado que virtualmente qualquer amostra pode ser analisada através dessa técnica, desde que se escolha um método de aquisição espectral adequado (Stuart 2004).

Com o exposto, percebe-se a potencialidade da técnica na separação e identificação de micro-organismos. Neste trabalho, o objetivo foi testar se essa separação pelos espectros de FTIR ATR pode ser alcançada para microalgas, especialmente em um grupo que contém espécies de difícil delimitação e identificação, e se é possível fornecer informações, no contexto de um trabalho polifásico, sobre relações filogenéticas entre as espécies.

2. Materiais e métodos

Cepas e cultivos: O trabalho foi primariamente focado na classe Chlorophyceae (Chlorophyta), ordem Sphaeropleales. Todas as cepas utilizadas foram obtidas da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce – UFSCar (CCMA-UFSCar). A classificação atualmente aceita, baseada no trabalho de Krienitz e Bock (2012) e no sítio da internet Algae Base, é apresentada entre parênteses depois de um conjunto de espécies do mesmo clado taxonômico: *Ankistrodesmus densus* Korshikov, 1953 (003), *Ankistrodesmus densus* Korshikov, 1953 (128), *Ankistrodesmus densus* Korshikov, 1953 (239), *Ankistrodesmus fusiformis* Corda ex Korshikov, 1953 (333), *Selenastrum bibraianum* Reinsch, 1866 (047), *Selenastrum bibraianum* Reinsch, 1866 (241), *Selenastrum gracile* Reinsch, 1866 (350) e *Monoraphidium komarkovae* Nygaard, 1979 (353) (Selenastraceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta); *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald 2000 (030), *Coelastrum cf sphaericum* Nägeli, 1849 (060) e *Scenedesmus ecornis* (C.G. Ehrenberg ex J. Ralfs, 1845) R.H. Chodat, 1926 (Scenedesmaceae, Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta); *Chlamydomonas clorastera* Ettl 1968 (009) (Chlamydomonadaceae, Chlamydomonadales, Chlorophyceae, Chlorophyta); e *Micrasterias pinnatifida* Ralfs, 1848 (089) (Desmidiaceae, Desmidiales, Zygnemophyceae, Charophyta).

As cepas foram cultivadas em triplicata em 1,8 litro de meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen 1972), exceto por *Micrasterias pinnatifida* (089), cultivada em meio WC complementado com solução de ferro-EDTA 10^{-6} molar (de cada) (Andersen 2005). Todos os cultivos foram realizados em frascos Boeco® com 2 litros de capacidade, aerados com ar comprimido a uma taxa de $0,05 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$, filtrado em filtros de PTFE (politetrafluoretileno) de $0,2 \mu\text{m}$ de poro (Sartorius). Todos os cultivos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e com intensidade luminosa de $300 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12:12 horas claro/escuro.

Os cultivos tiveram suas curvas de crescimento acompanhadas por densidade ótica e conteúdo de clorofila - a *in vivo* para determinar o momento de sua retirada, considerando a média das triplicatas de cultivo. As medidas de densidade ótica foram obtidas em comprimentos de onda que variaram de uma espécie para outra, verificados em culturas prévias para cada cepa utilizada neste trabalho, com os respectivos valores de absorbância em 750 nm (turbidez) subtraídos. As leituras de clorofila - a foram realizadas em fluorômetro Trilogy™ (Turner Designs), calibrado previamente para quantificação de clorofila - a.

O acompanhamento dos cultivos foi necessário para que um padrão de retiradas das culturas fosse estabelecido. Devido à característica da técnica de FTIR, o conteúdo total das células influencia todo o espectro das amostras, portanto é preciso que haja uma padronização de em qual momento da curva de crescimento a cultura será retirada.

Em seu trabalho, Kansiz et al (1999) sugerem que o melhor momento para a retirada das culturas seja o final da fase exponencial, pois nesta fase as mudanças do conteúdo intracelular são menos acentuadas quando as culturas diferem entre si em alguns poucos dias de cultivo. Os cultivos realizados tinham todos os mesmos tempos de duração, mas mesmo com os parâmetros de cultivo constantes é usual haver diferenças de crescimento entre réplicas, de forma que essa padronização de fato se faz necessária.

As culturas foram retiradas, portanto, no final da fase exponencial através de centrifugação em tubos falcon de 50 mL a 3500 x g de 7 a 10 minutos, lavadas com meio WC (sem a adição de nitrogênio, fósforo, vitaminas e micronutrientes) e concentradas de 1,8 litros para 15 mL, congeladas, liofilizadas e guardadas a -20°C até que as análises de FTIR fossem realizadas.

Aquisição espectral e preparação das amostras: Todos os espectros foram coletados em espectrofotômetro Shimadzu IRAffinity-1 FTIR com fonte luminosa de cerâmica resfriada a ar e detector piroelétrico DLATGS, controlado pelo software IRsolution que acompanha o

equipamento. Espectros de absorvância foram coletados no intervalo de 4000 – 630 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e média de 128 espectros co-adicionados, com função triangular de apodização.

Amostras foram preparadas a partir das biomassas liofilizadas na forma de um filme depositado em placa do acessório HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance), o qual possui cristal de ZnSe e ângulo de incidência do feixe de radiação de 45°, resultando em dez reflexões do feixe na amostra em contato com o cristal.

A biomassa liofilizada foi ressuspensa em 0,5 mL água deionizada e então pipetada na placa HATR, gentilmente agitada para distribuir igualmente a suspensão sobre todo o cristal. As amostras foram então secas na placa através de ventilador aquecido por aproximadamente 18 minutos (temperatura aproximada de 45°C e com a velocidade do vento a mínima possível, método testado previamente). A concentração de biomassa necessária para produzir filmes com boa reprodutibilidade foi testada previamente e a melhor concentração foi adotada para o restante das análises.

Análises quimiométricas e pré-tratamento dos espectros: Antes de qualquer tratamento estatístico dos dados, é necessário realizar algum tipo de pré-tratamento dos espectros, de forma a retirar variações randômicas e absolutas dos espectros.

Variações randômicas são bem ilustradas pela dispersão diferenciada do feixe de radiação nas partículas das amostras, o que causa variações nos espectros que não têm significado na caracterização das amostras (Beebe et al. 1998). Variações absolutas decorrem, p.e., de diferenças na biomassa (Beebe et al. 1998) que forma o filme a ser analisado. Ao retirar os efeitos dessas variações através de pré-tratamentos dos espectros, as respostas quimiométricas são melhoradas notavelmente.

Os pré-tratamentos testados foram baseados na literatura (Helm et al. 1991b; Kansiz et al. 1999; Mariey et al. 2001; Domenighini e Giordano 2009; Wenning e Scherer 2013), sendo o mais comum a utilização da primeira ou segunda derivada dos espectros originais, com a primeira derivada sendo preferida, embora uma grande diversidade de pré-tratamentos estejam disponíveis (Beebe et al. 1998).

Centralização pela média é um desses pré-tratamentos e também foi testado, tanto para os espectros brutos quanto para a suas derivadas, e consiste em realizar a média entre todas as espécies para um número de onda e então subtrair o valor individual desse número de onda de cada espécie da média total, até que todos os números de onda dos espectros das espécies tenham sido tratados dessa forma.

Outro procedimento usual é realizar uma seleção de regiões do espectro que serão utilizadas nas análises quimiométricas, sendo que a região de 1800 cm^{-1} a 600 cm^{-1} foi reportada como a mais interessante para realizar separações das espécies (Helm et al. 1991b; Kansiz et al. 1999; Mariey et al. 2001; Domenighini e Giordano 2009). Nós testamos subdivisões – janelas espectrais - desta região e combinações destas janelas para realizar e avaliar a técnica. As janelas espectrais foram determinadas de acordo com as atribuições de biomoléculas a cada região do espectro, e suas delimitações eram as seguintes: janela I, $1800 - 1700\text{ cm}^{-1}$; janela II, $1700 - 1500\text{ cm}^{-1}$; janela III, $1500 - 1200\text{ cm}^{-1}$; janela IV, $1200 - 900\text{ cm}^{-1}$; e janela V, $900 - 630\text{ cm}^{-1}$.

Testes iterativos foram realizados para determinar qual o melhor pré-tratamento para nossos dados. A separação das cepas foi avaliada em um primeiro momento através da aplicação de PCA (Principal Component Analysis) da matriz de variância-covariância dos dados. Para verificar de forma mais conclusiva a discriminação das cepas, e realizar uma comparação com a classificação atualmente aceita, análise HCA (Hierarchical Cluster Analysis) foi feita usando algoritmo 'single linkage' com distância Euclidiana.

3. Resultados

3.1. Comprimentos de onda utilizados para acompanhamento da curva de crescimento por densidade ótica

Exceto por três espécies, o comprimento de onda utilizado para acompanhar as curvas de crescimento por densidade ótica foi 682 nm. Para as cepas *M. pinnatifida* (089), *A. densus* (128) e *S. bibraianum* (241) o comprimento de onda utilizado foi 680 nm.

3.2. Curvas de crescimento por densidade ótica e clorofila –a

Os tempos de cultivos, para atingir o final da fase exponencial/início da fase estacionária variaram de 14 dias para *S. ecornis* (088) a 26 dias para *S. bibraianum* (047). A figura abaixo (Fig. 1) mostra as curvas de crescimentos médias das triplicatas de cultivo para cada cepa através de leituras de densidade ótica, nos comprimentos de onda citados, e de clorofila – a.

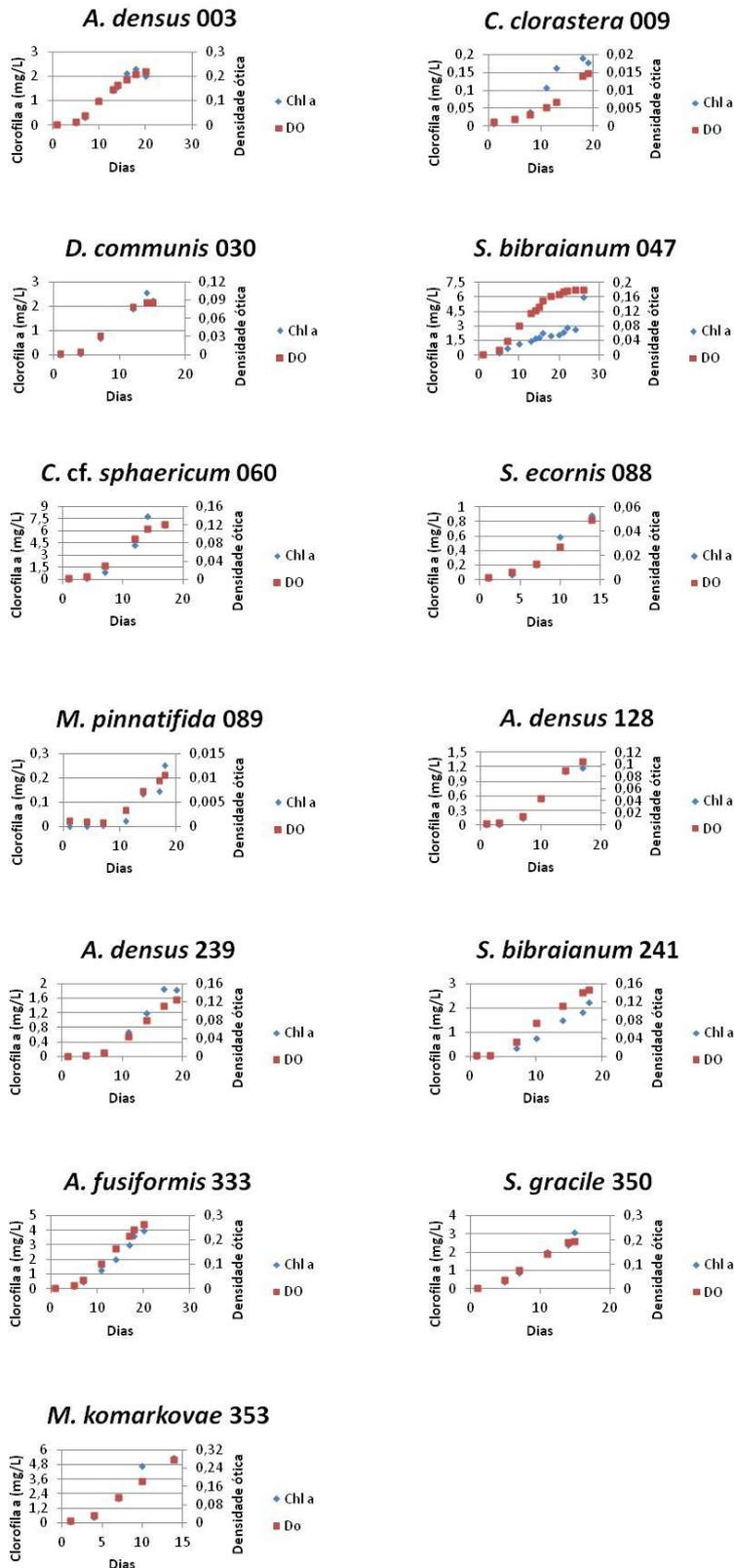


Figura 1. Curvas de crescimentos das 13 cepas utilizadas, determinadas por quantidade de clorofila a (em mg/L, losângulo) e densidade ótica (quadrado) medida nos comprimentos de onda 680nm (*M. pinnatifida* (089), *A. densus* (128) e *S. bibrainum* (241) e 682nm (todas as restantes).

3.3. Concentração das suspensões celulares usadas na obtenção dos filmes para análise espectroscópica

A verificação da qualidade dos filmes das diferentes concentrações de suspensão celulares foi feita através da homogeneidade e da reprodutibilidade espectral de filmes feitos a partir de uma mesma suspensão celular, em deposições distintas. As concentrações testadas variaram de 1mg a 5mg/mL, em incrementos de 1mg/mL.

A concentração de 1mg/mL, apesar de formar um filme coeso, apresentou maior variação visual que as restantes e foi descartada, embora suas réplicas de leitura apresentassem valores razoavelmente semelhantes. O restante das concentrações formaram filmes bastante coesos e íntegros.

Para escolhermos qual concentração utilizar, observamos a reprodutibilidade espectral, a qual se apresentou bastante semelhante para as quatro concentrações restantes, sendo muito mais dependente da secagem do filme na placa ATR do que de sua concentração.

Desta forma, optamos por utilizar a concentração de 3mg/mL, um valor intermediário na gradação testada. As análises de todas as cepas mostraram que os filmes são altamente reprodutíveis, fato evidente tanto pela reprodutibilidade espectral vista na Figura 2 quanto pelo restante dos resultados.

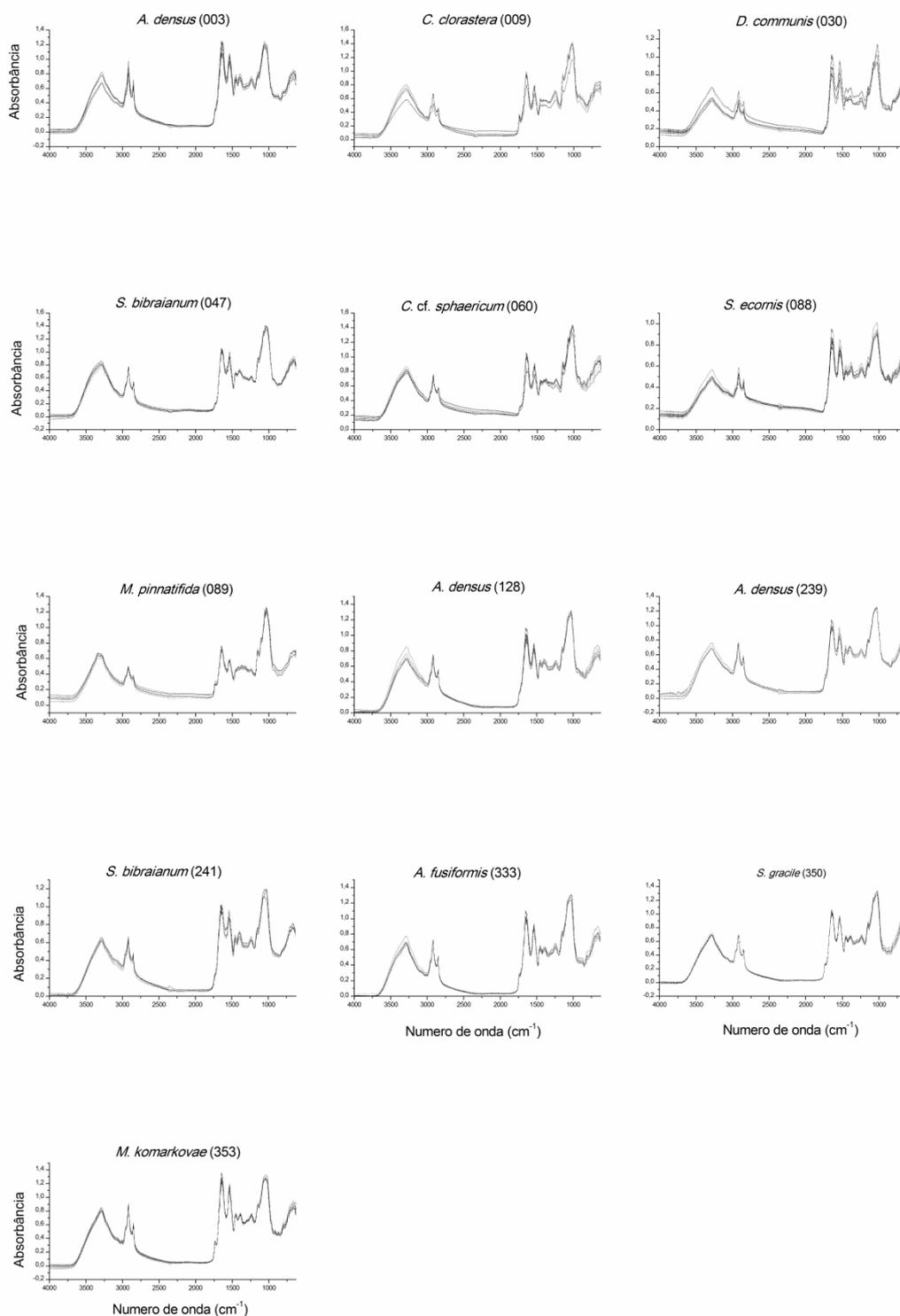


Figura 2. Composição dos 12 espectros brutos obtidos para cada uma das 13 cepas utilizadas. Aquisição espectral através da técnica de Attenuated Total Reflectance (ATR). A leitura de cada espectro foi feita com intervalo espectral de 4000 a 630 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , apodização por função triangular e média de 128 espectros co-condicionados.

3.4. Reprodutibilidade espectral e testes de pré-tratamento dos espectros

Para conseguir discriminar adequadamente qualquer amostra é necessário obter espectros de FTIR com alta reprodutibilidade. Como visto na Figura 2 este requerimento é alcançado. No entanto, é importante notar as variações que ocorreram no limite inferior dos espectros.

O fabricante do acessório ATR afirma que as aquisições espectrais possuem boa reprodutibilidade até 630 cm^{-1} . No entanto, nós observamos um aumento na variação dos valores de absorbância a partir de 650 cm^{-1} em direção a números de onda menores (Fig. Anterior), de forma que embora a aquisição espectral tenha ocorrido até 630 cm^{-1} , utilizamos dados a partir de 675 cm^{-1} nas análises quimiométricas.

Outra observação importante é o fato de que embora os espectros brutos tenham boa reprodutibilidade, as cepas *C. clorastera* (009), *D. communis* (030), *C. cf. sphaericum* (060) e *S. ecornis* (088) apresentam um maior grau de variação em toda a região mostrada na Figura 2, diferenciando uma das réplicas de cultivo das restantes. De modo geral, variações absolutas (pequenas variações na biomassa que formou o filme) e randômicas (dispersão diferenciada pelas partículas da amostra) ocorrem em todas as outras cepas também (Fig. 2), o que dificulta a utilização dos espectros brutos para separar as cepas quimiometricamente, constituindo-se na razão para realizar pré-tratamento dos dados.

Para retirar - e no caso das três cepas citadas anteriormente minimizar - as variações entre os espectros, diversos pré-tratamentos foram avaliados neste trabalho. O método utilizado foi o iterativo, que consistiu em se realizar o pré-tratamento e a análise multivariada dos dados obtidos, avaliando os resultados alcançados. Em dependência destes resultados, altera-se o pré-tratamento e comparam-se os novos resultados com os anteriores, até que todas as combinações de interesse sejam testadas.

Os seguintes pré-tratamentos foram testados: nenhum pré-tratamento (espectros brutos), centralização pela média dos espectros brutos, primeira derivada com 15 pontos, segunda derivada com 15 pontos, centralização pela média da primeira derivada com 15 pontos, centralização pela média da segunda derivada com 15 pontos, primeira derivada com nove pontos e primeira derivada com cinco pontos. Normalização dos espectros não foi testada *per se*, pois os tratamentos com as derivadas dos espectros produzem resultados normalizados.

O número de pontos explicitado nas derivadas determina o tamanho da janela móvel que percorre o espectro. Esta janela é usada para determinar uma função polinomial que será derivada, de modo a determinar o valor derivado do ponto médio da janela. A janela então se move um ponto para frente e o procedimento é repetido, até que o espectro todo seja derivado. Além destes pré-tratamentos, a combinação de diferentes regiões espectrais foi testada.

De modo geral, todos os pré-tratamentos melhoraram, ao menos visualmente, a reprodutibilidade dos espectros de uma mesma espécie comparados com os dados brutos, como mostrado no exemplo com os dados de primeira derivada com nove pontos, determinado como o melhor pré-tratamento (figura 3). A exceção foi o tratamento da centralização pela média dos dados brutos, que não melhoraram a reprodutibilidade dos espectros, como pode ser visto no exemplo com a espécie *A. densus* (003) (Fig. 4).

Estas duas figuras mostram os espectros já reduzidos para a região espectral utilizada nas análises quimiométricas deste trabalho, de 1800 a 675 cm^{-1} , que foi subdividida em cinco janelas espectrais menores, baseada em trabalhos obtidos na literatura, que foram combinadas entre si durante as análises quimiométricas para determinar quais regiões espectrais possibilitam uma melhor separação.

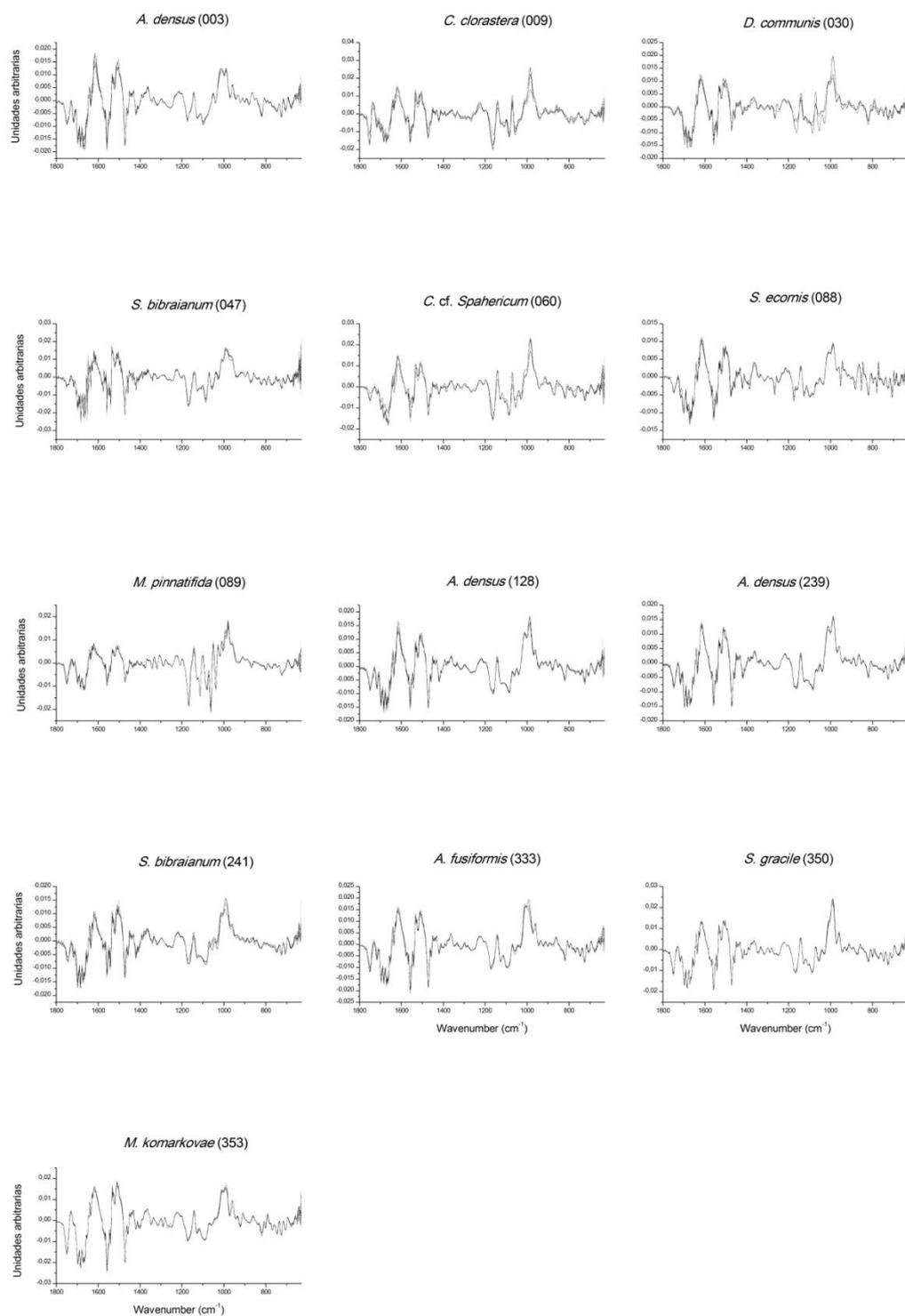


Figura 3. Espectros das 13 cepas utilizadas processados pelo pré-tratamento da primeira derivada com janela de nove pontos. Intervalo espectral de 1800 a 630 cm^{-1} .

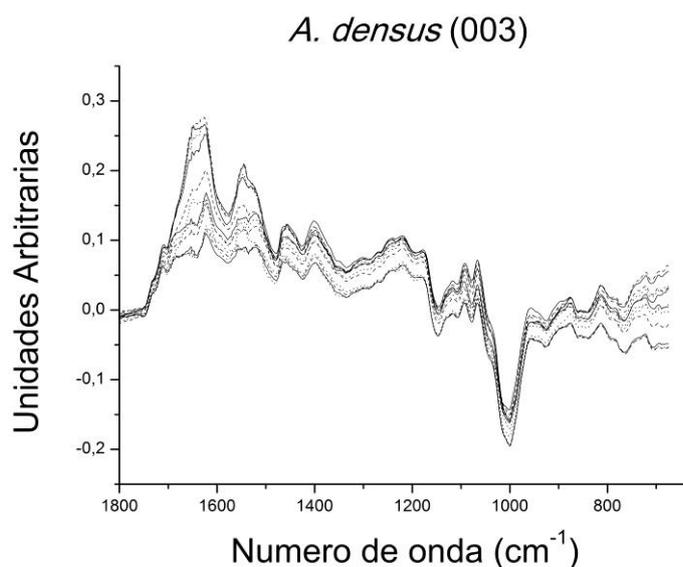


Figura 4. Efeito do pré-processamento de centralização pela média dos espectros brutos exemplificado pela espécie *A. densus* (003). Intervalo espectral de 1800 a 675 cm^{-1} .

A figura 5 mostra em destaque esta região e as janelas espectrais que a subdivide. Os intervalos destas janelas foram determinados de forma a refletir grupos de biomoléculas específicos, seguindo as tabelas de determinação em Helm et al. (1991a) e Naumann (2000). Desta forma, temos: (WI) janela de 1800 – 1700 cm^{-1} , relacionada às ligações C=O de ésteres e grupos carboxila de DNA/RNA; (WII) janela de 1700 – 1500 cm^{-1} relaciona-se com os grupos amida I, II e III das proteínas; (WIII) janela de 1500 – 1200 cm^{-1} é uma região com sobreposição de informações sobre ligações C=O de ácidos orgânicos, fosfodiésteres e amida III de proteínas; (WIV) janela de 1200 – 900 cm^{-1} , atribuída a ligações C-O-C e C-O de carboidratos de polissacarídeos e vibrações de alongamento simétricas e assimétricas de PO_2^- ; e (WV) janela de 900 – 675 cm^{-1} , considerada como a região do “fingerprint verdadeiro”, inespecífica para qualquer composto ou grupo funcional. Para uma tabela de atribuições de compostos às regiões do espectro mais detalhada, ver os trabalhos citados.

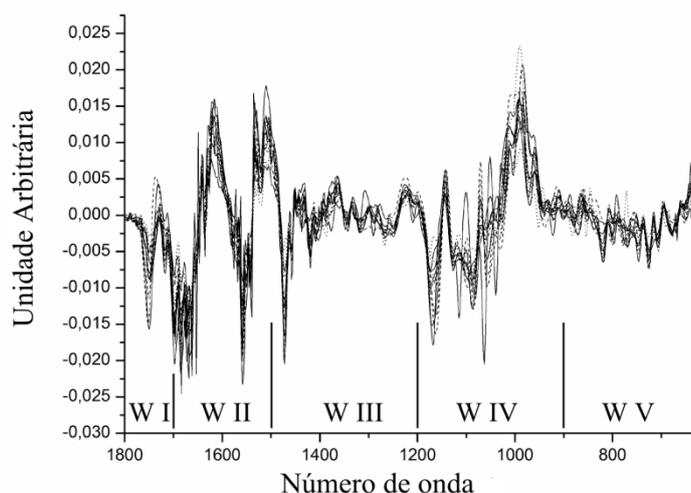


Figura 5. Composição com todos os espectros das cepas utilizadas tratados com a primeira derivada com nove pontos, explicitando as janelas espectrais. WI – janela de 1800 – 1700 cm^{-1} ; WII – janela de 1700 – 1500 cm^{-1} ; WIII – janela de 1500 – 1200 cm^{-1} ; WIV – janela de 1200 – 900 cm^{-1} ; WV – janela de 900 – 675 cm^{-1} .

Para avaliar a melhora na reprodutibilidade dos espectros, também é necessário verificar a discriminação entre as espécies alcançada com as análises multivariadas.

3.5. Análises multivariadas: discriminação das cepas e congruência com classificação atualmente aceita

Devido à característica iterativa dos testes dos pré-tratamentos, as primeiras análises multivariadas foram muitas vezes realizadas antes da aquisição dos espectros de todas as espécies aqui utilizadas. Com isto, obtivemos indicações sobre qual seria o melhor pré-tratamento para os dados, em especial com relação às regiões espectrais que forneceriam melhores resultados, para que os testes posteriores pudessem ser melhor direcionados. No entanto, os resultados aqui apresentados se referem aos dados do conjunto completo das espécies.

Dado a característica iterativa destes testes, cabe dizer por princípio que o melhor resultado foi obtido com as análises quimiométricas dos dados de pré-tratamento da primeira derivada com nove pontos, assim os testes com PCA e HCA apresentados a seguir para a seleção de janelas espectrais adequadas foram os obtidos com os dados deste pré-tratamento. Os testes com os demais pré-tratamentos são apresentados posteriormente.

Com relação às janelas espectrais testadas, temos na Figura 6a o PCA obtido com as cinco janelas, na Fig. 6b o PCA das janelas III, IV e V, na Fig. 6c o PCA das janelas I, II, III e V, na Fig. 6d temos o PCA das janelas IV e V e na Fig. 6e temos o PCA com as janelas III e V.

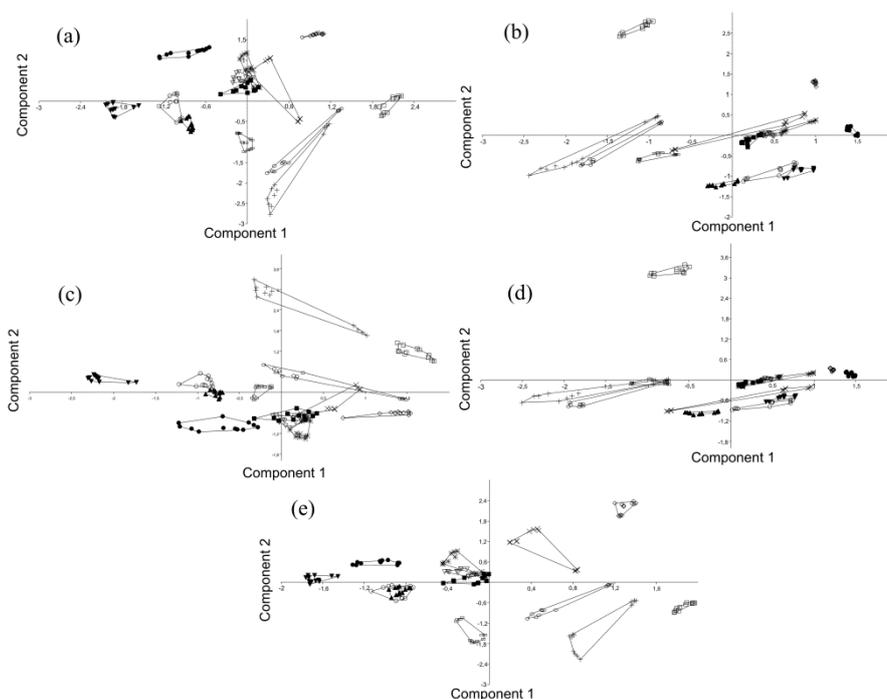


Figura 6. Composição de PCAs (Principal Components Analysis) utilizados para avaliar as separações obtidas com diferentes combinações de janelas espectrais. Os dados utilizados foram os obtidos pela aplicação da primeira derivada com nove pontos. Nem todas as combinações possíveis são mostradas. (a) janelas I, II, III, IV e V; (b) janelas III, IV e V; (c) janelas I, II, III e V; (d) janelas IV e V; (e) janelas III e V.

Análises de PCA usando as janelas espectrais III e V em conjunto ou não com a janela espectral IV forneceram resultados com melhor separação (Fig. 6b, 6c e 6e), mas os resultados quimiométricos foram bastante influenciados pelo *estado fisiológico* das culturas quando as janelas espectrais I e IV foram utilizadas (mais sobre isso na discussão). A janela espectral II, referente a proteínas, também resultou em separações ruins, então preferimos utilizar somente as janelas III e V.

No geral, somente a combinação das janelas espectrais III e V forneceram as melhores discriminações das cepas na análise HCA . Como pode ser visto na Figura 7, o HCA com esta combinação de janelas espectrais resultou em uma completa discriminação das cepas, com exceção de duas das três cepas utilizadas de uma mesma espécie (*A. densus* 128 e 239), enquanto que ao incluir a janela espectral IV (região dos carboidratos), as cepas *C. clorastera* (009), *D. communis* (030) e *C. cf. sphaericum* (060) não tiveram as três réplicas de cultivo posicionadas em um mesmo cluster (Figura 8), ficando misturadas com outras cepas.

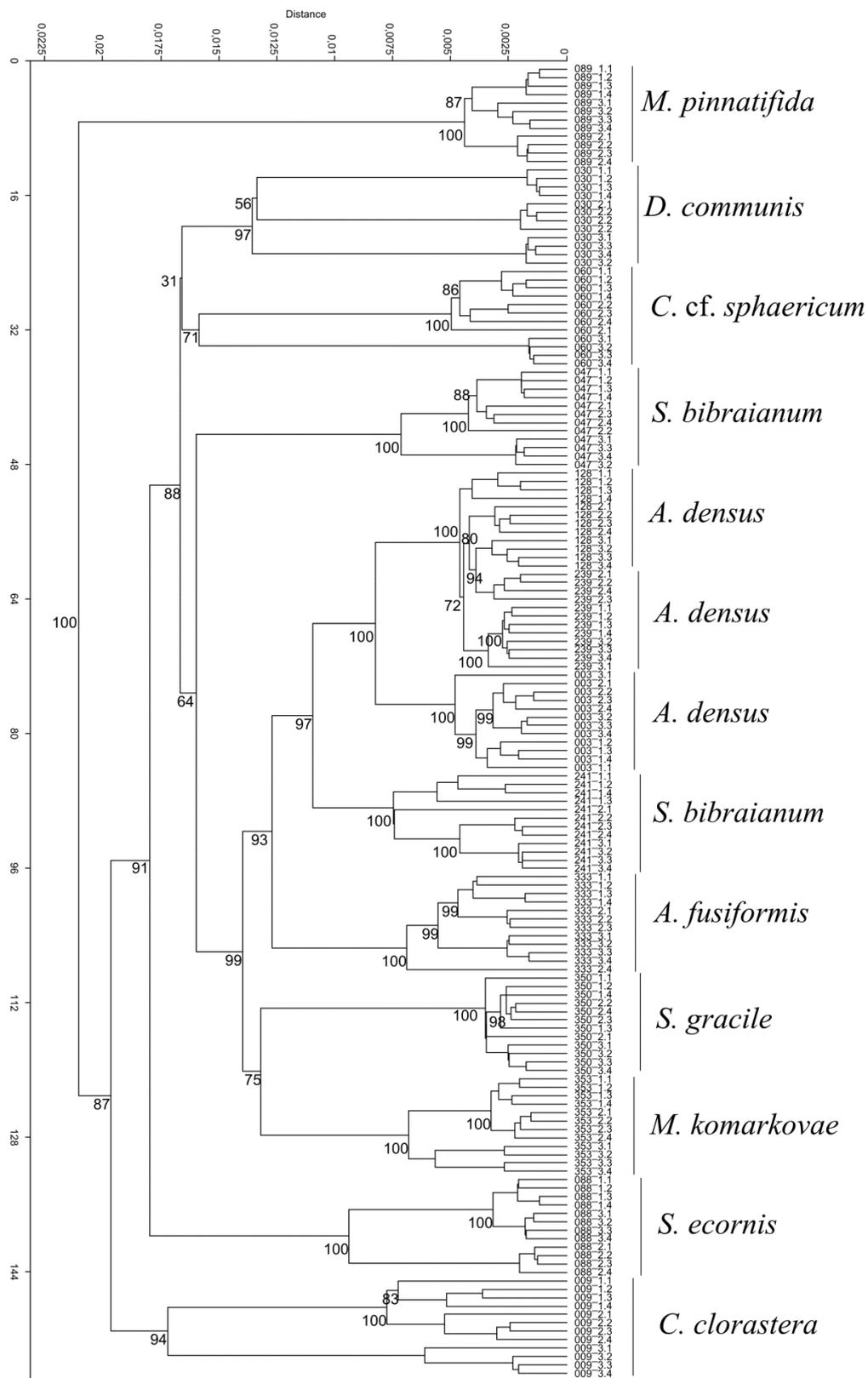


Figura 7. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V). As cepas estão individualizadas sem sobreposição e tem seus nomes ampliados na frente de seus respectivos clusters. Valores de bootstrap (1000 réplicas) são apresentados nos nós, omitidos para as réplicas de leitura de uma mesma cultura.

Quanto aos demais pré-tratamentos, observamos que alguns deles não forneceram dados com poder de resolução suficiente e por isso foram preteridos. Cabe lembrar que os testes das janelas espectrais e dos pré-tratamentos foram concomitantes, e os resultados dos demais pré-tratamentos são apresentados já utilizando as janelas espectrais que forneceram as melhores separações, parâmetro que se mostrou mais crítico neste trabalho.

Por exemplo, usar os espectros brutos (Fig. 9a), ou sua média centralizada (Fig. 9b), resultou em PCAs com muita sobreposição entre as espécies, e clusters no HCA que não as individualizavam (Figura 9, PCAs com as cepas não identificadas; HCA não mostrado).

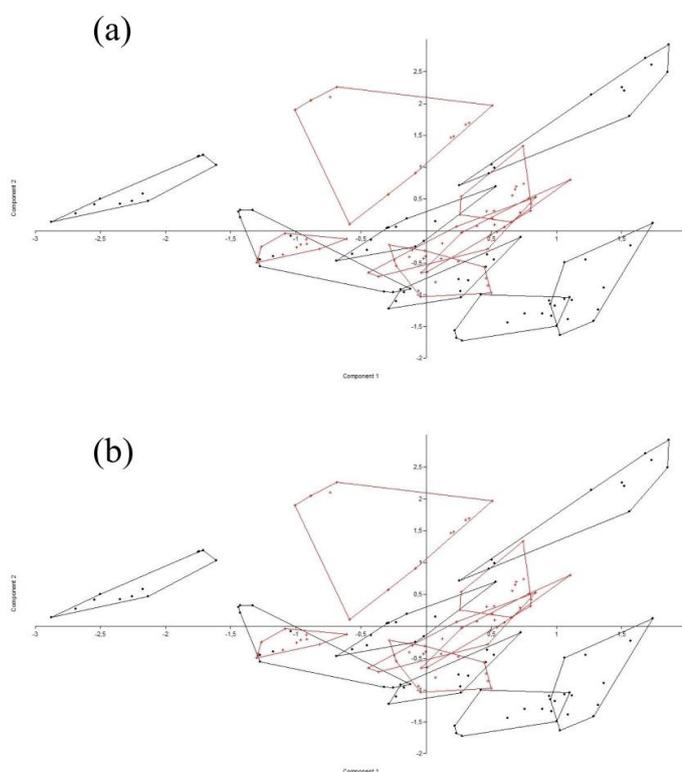


Figura 9. PCA dos dados de espectros brutos (a) e espectros brutos centralizados pela média (b) de todas as cepas utilizadas. Espécies não identificadas.

Os dados obtidos pelas primeiras e segundas derivações dos espectros, por outro lado, mostraram-se bastante promissores. O primeiro teste com estes pré-tratamentos foi realizado com uma janela de 15 pontos e os resultados obtidos na PCA (Figura 10a e 10b

respectivamente, espécies não identificadas) mostraram uma sobreposição menor do que àquela que ocorreu quando os dados brutos foram utilizados na análise (Fig. 9). Comparando as primeiras e segundas derivações na PCA da Figura 10, é perceptível que o pré-tratamento com a primeira derivada resultou em uma melhor individualização e separação das espécies.

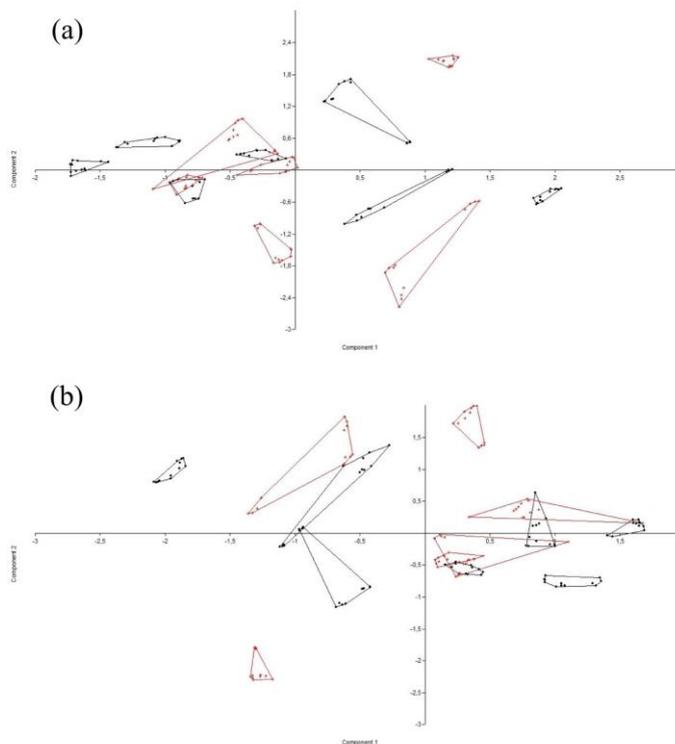


Figura 10. PCA com os dados dos espectros tratados com a primeira derivada com janela de 15 pontos (a) e segunda derivada com janela de 15 pontos (b) de todas as cepas utilizadas. Espécies não identificadas.

Este resultado se repete na análise de HCA. Os dados de primeira derivada com janela de 15 pontos separam completamente as cepas estudadas, individualizando-as em clusters próprios (Fig. 11). O HCA dos dados de segunda derivada apresenta agrupamentos errados entre as espécies *A. fusiformis* (333_3.4) e *S. gracile* (350) e entre *S. gracile* (350_3.4) e *M. komarkovae* (353) e uma réplica de cultivo, com suas quatro réplicas de leitura, de *C. cf. sphaericum* (060) separada das demais, em um cluster isolado (Fig. 12, setas apontando as diferenças).

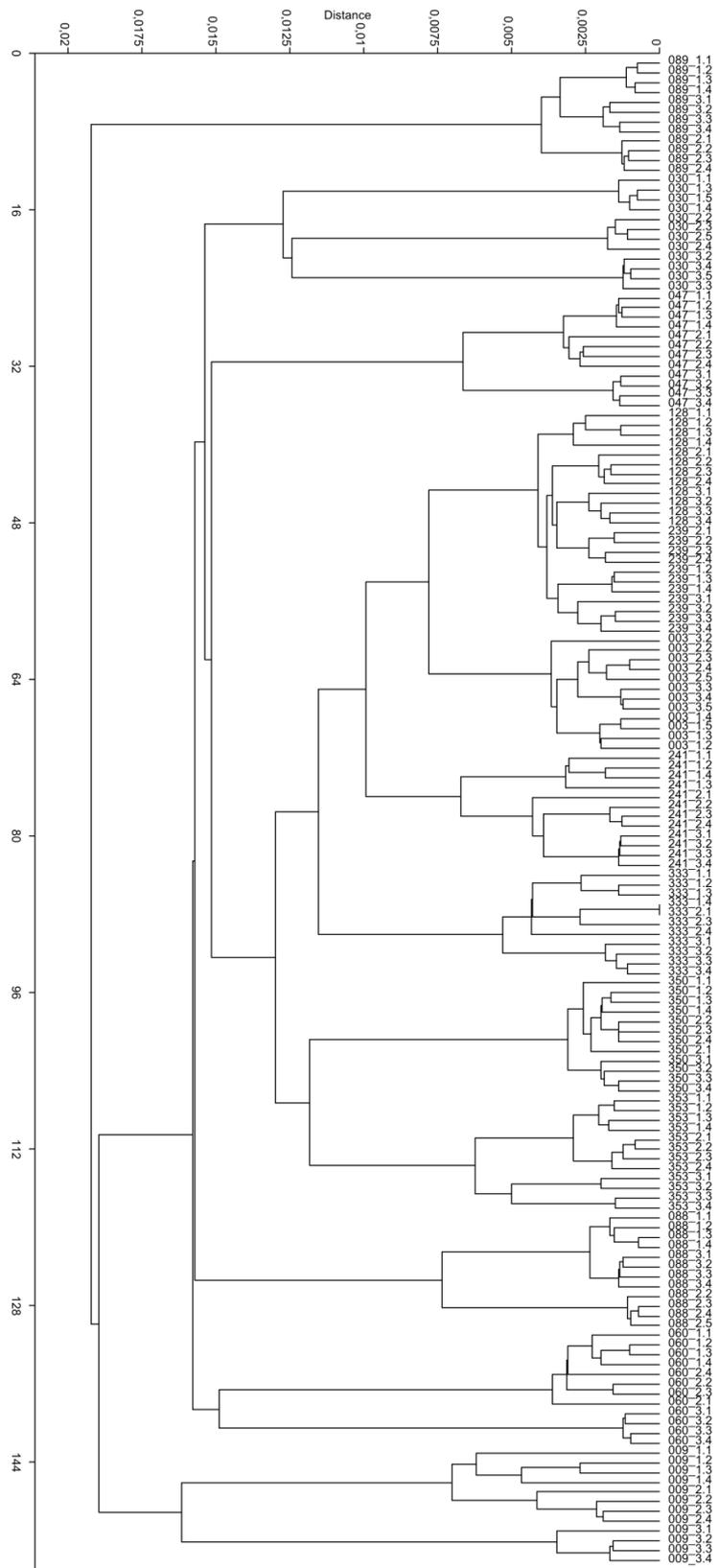


Figura 11. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a primeira derivada com 15 pontos.

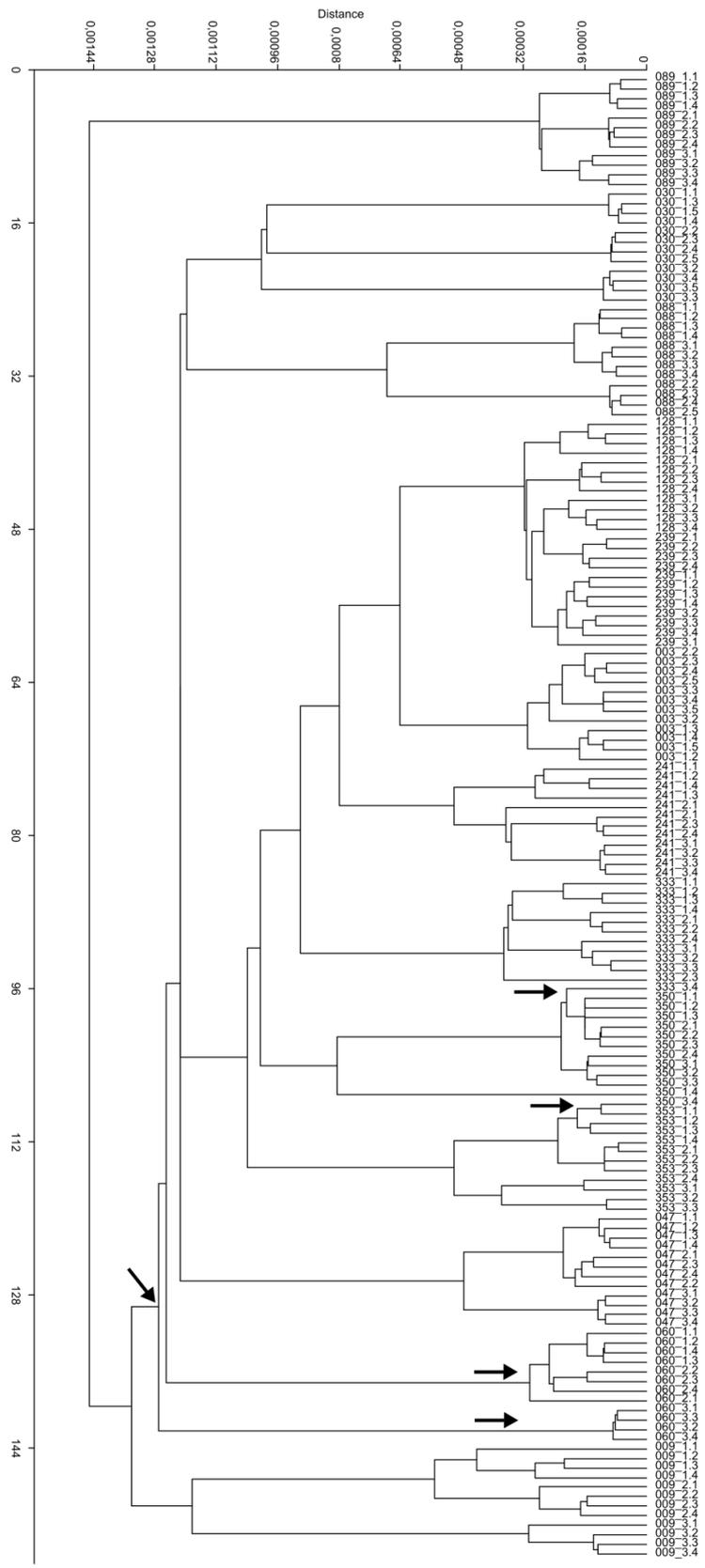


Figura 12. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a segunda derivada com 15 pontos. As setas indicam os pontos com separações erradas, tanto entre réplicas de leitura quanto a separação de uma réplica de cultivo de suas outras duas réplicas.

O tratamento de centralização pela média dos dados da primeira derivada com 15 pontos resultou em quimiometrias com essencialmente os mesmos resultados, de forma que eles não são apresentados. Para as análises da segunda derivada, a centralização pela média resolveu os agrupamentos errados das espécies *A. fusiformis* (333) e *S. gracile* (350), mas a separação completa de uma das réplicas de cultivo de *C. cf. sphaericum* (060), seu principal problema, permaneceu igual e, portanto, estes resultados não são apresentados.

Quando determinamos que o pré-tratamento com a primeira derivada forneceu melhores resultados, passamos a testar o parâmetro *número de pontos da janela da derivação*. Testamos janelas de derivação de 15 pontos, nove pontos e cinco pontos.

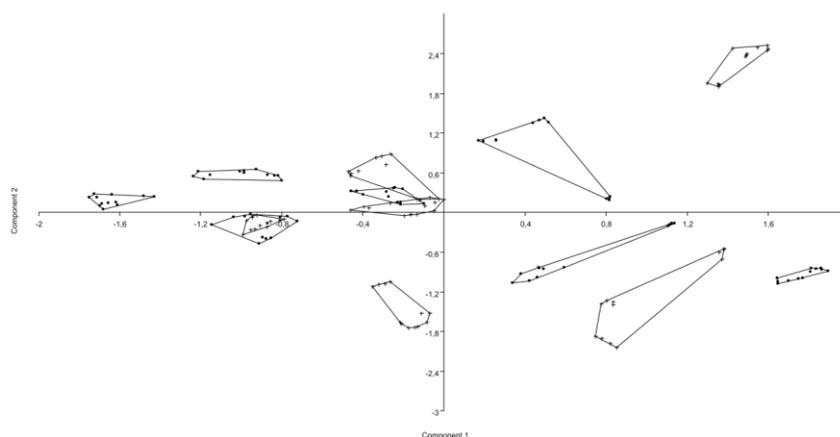


Figura 13. PCA com os dados dos espectros tratados com a primeira derivada com cinco pontos. Espécies não identificadas.

Os dois primeiros tratamentos já tiveram seus resultados apresentados anteriormente. Os dados do tratamento da 1ª derivada com janela de derivação de cinco pontos são mostrados na Figura 13 (PCA) e na Figura (14). Seu PCA é essencialmente parecido com o tratamento com janela de nove pontos, mas a separação das cepas no HCA, quando avaliado em relação à classificação obtida, não é satisfatória (mais sobre isso na discussão), de forma que comprovamos que o tratamento da primeira derivada com nove pontos retorna os melhores resultados.

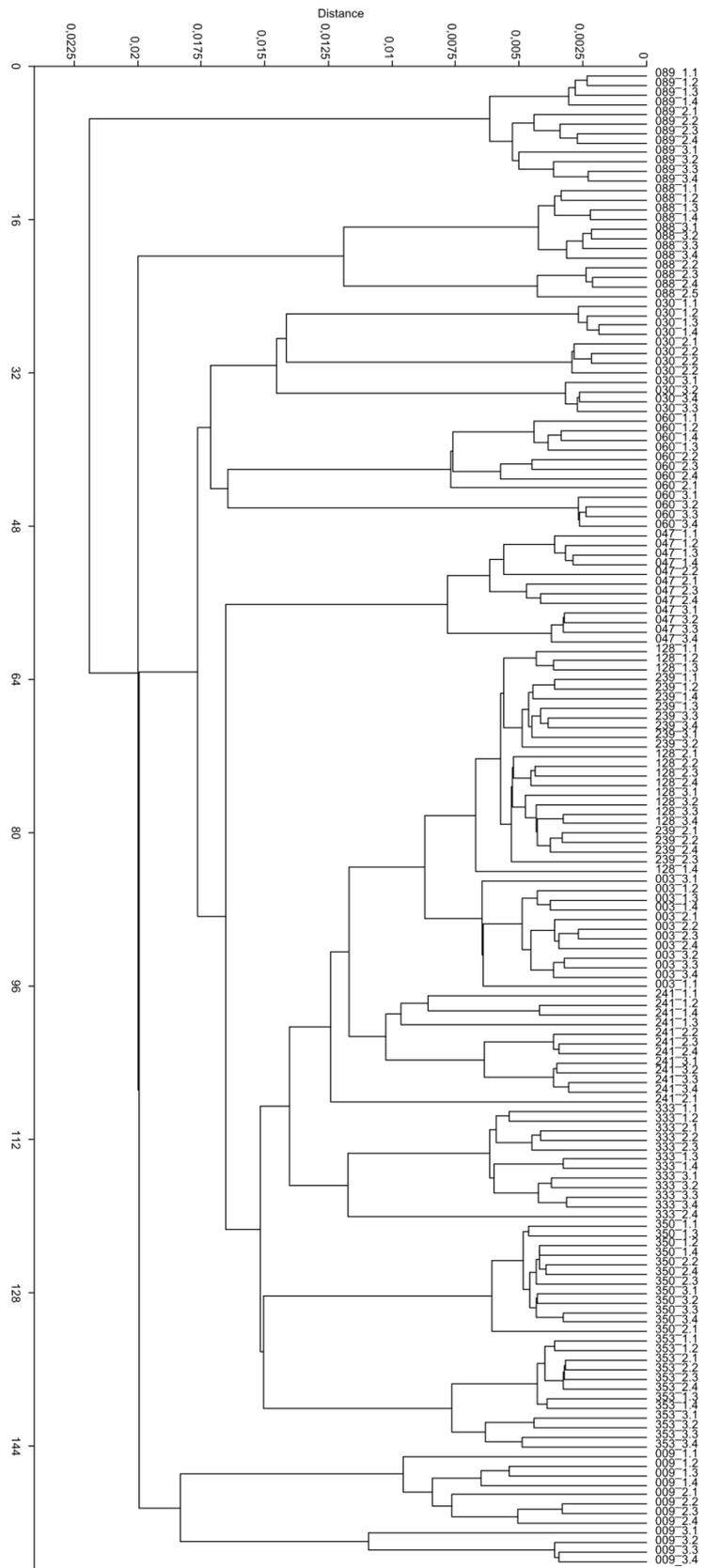


Figura 14. Hierarchical cluster analysis (HCA) da melhor combinação de janelas espectrais (janelas III e V) com os dados tratados com a primeira derivada com 5 pontos.

O tratamento da primeira derivada com nove pontos separa adequadamente todas as cepas, sem sobreposição ou separação errônea de qualquer réplica. Além, suas análises resultaram em uma separação de clusters semelhante à classificação dessas espécies encontrada na literatura.

A classificação dos grupos (Fig. 7) referente a esta análise apresenta resultados que condizem muito bem com classificação atualmente aceita, apesar de uma espécie, *S. ecornis* (088), ter sido posicionada fora do cluster onde se esperaria que ela estivesse – junto com as cepas *D. communis* (030) e *C. cf. sphaericum* (060).

Foi baseado nesses resultados que determinamos qual região espectral (combinações das janelas espectrais) teve o melhor resultado, apresentados no começo desta seção. No entanto, nós escolhemos não avaliar estes resultados em termos de porcentagem de classificações corretas, usual neste tipo de trabalho, porque a classificação deste grupo tem sido constantemente alterada, o que introduziria um viés não desejado em nossos resultados.

De acordo com Krienitz e Bock (2012), para os representantes da ordem Sphaeropleales neste trabalho nós temos onze cepas pertencentes a seis gêneros, divididos em duas famílias: Selenastraceae e Scenedesmaceae. Para a primeira família nós temos as cepas *A. densus* (003), *A. densus* (128), *A. densus* (239), *A. fusiformis* (333), *S. bibraianum* (047), *S. bibraianum* (241), *S. gracile* (350), e *M. komarkovae* (353). Para Scenedesmaceae temos *D. communis* (030), *C. cf. sphaericum* (060) e *S. ecornis* (088).

Pode-se observar na Figura 7 que, além de termos obtido uma excelente discriminação, com exceção da cepa *S. ecornis* (088), as cepas estão localizadas em clusters que podem ser relacionados à taxa tradicionais. Considerando a ordem Sphaeropleales, as cepas estão posicionadas em um grande cluster que se subdivide em dois clusters menores mais um terceiro cluster que contém somente a cepa *S. ecornis* (088). Com base nisso, este

grande cluster poderia ser tentativamente relacionado à classificação hierárquica *ordem*, e suas duas subdivisões principais poderiam ser interpretadas como as duas famílias citadas.

A cepa *C. clorastera* (009), classificada dentro de Chlamydomonadales, ordem-irmã de Sphaeropleales, foi posicionada em um cluster diferente, de forma consistente com a sistemática atualmente aceita. Por sua vez, a cepa *M. pinnatifida* (089) foi posicionada no cluster mais distante, em boa concordância com a sua classificação em uma divisão diferente das demais cepas (Charophyta, classe Zygnemophyceae).

É digno de nota que cepas de uma mesma espécie, *A. densus* cepas 003, 128 e 239, são as posicionadas mais proximamente na análise, e que embora haja uma clara distinção entre a cepa *A. densus* 003 e as outras duas, as cepas *A. densus* 128 e 239 apresentam alguma sobreposição.

As distâncias intra-cepa das réplicas de cultivo também apresentam um comportamento interessante. Para as cepas *C. clorastera* (009), *D. communis* (030), *C. cf. sphaericum* (060) e *S. ecornis* (088) há um réplica de cultivo que foi posicionada mais distante das demais, ainda que dentro do cluster de sua cepa (veja figura 7, réplicas de cultivo números três, um, três e dois respectivamente).

Estas réplicas de cultivo eram de culturas que estavam em fase de crescimento diferente das suas réplicas, fato verificado pelas curvas de crescimento individuais de cada réplica de cultivo (veja Apêndice 2). Essa variação foi minimizada removendo da análise quimiométrica as janelas referentes a compostos de reserva, em especial de carboidratos (janela espectral III) (Fig. 7).

Quando esta janela espectral não foi removida da análise quimiométrica, as réplicas de cultivo com diferenças fisiológicas devido a diferentes fases de crescimento foram

posicionadas em clusters separados, tanto em relação às outras réplicas de cultivo da mesma cepa quanto em relação a sua classificação dentro do cluster da ordem (Fig. 8).

Porquanto não tenha afetado negativamente nossas análises com as janelas espectrais III e V, essas diferenças entre as réplicas de cultivo podem ser uma observação interessante quando o estado fisiológico ou nutricional das culturas é objeto de estudo.

4. Discussão

De acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorvância de uma amostra é dependente de sua absorvância molar, o comprimento do caminho que a radiação faz através da amostra e de sua concentração. A variação na espessura da amostra introduz erros ao mudar o comprimento do caminho da radiação.

Como nós usamos a mesma concentração em todos os nossos filmes, e a absorvância molar pode ser considerada constante em nossas amostras, a única fonte de variação que não seja por conta das características bioquímicas de cada amostra, exatamente o que queremos explorar, originar-se-ia de diferenças no comprimento do caminho de luz. No entanto, ao usar o ATR removemos essas variações, facilitando a obtenção de espectros altamente reprodutíveis.

A técnica de ATR elimina essa fonte de erros por garantir que o comprimento do caminho da radiação passando através da amostra seja sempre o mesmo. O princípio da técnica de ATR é que o raio infravermelho do espectrômetro tem um dado número de reflexões com um ângulo incidente específico e constante no interior de um cristal de ZnSe, ao longo de suas faces paralelas.

Toda vez que o cristal de ZnSe reflete a radiação na face em contato com a amostra, somente uma porção atenuada da radiação interage com ela, na forma de uma onda evanescente que penetra uma profundidade fixa na amostra e é então refletida para o espelho. A profundidade de penetração da radiação depende do ângulo de incidência, dos índices de refração do cristal e da amostra e do comprimento de onda da radiação infravermelha. De acordo com o ângulo de incidência e do comprimento do cristal, um dado número de reflexões e interações com a amostra ocorre e um espectro de absorvância/transmitância da *onda evanescente* pode ser obtido.

As vantagens desta técnica é que uma face superior não homogênea do filme da amostra não tem impacto na análise, desde que o filme cubra completamente o cristal, e a possibilidade de saturação de bandas no espectro é minimizada. A espessura do filme também não interfere na análise, especialmente se o espectro for pré-tratado por, p.e., suas derivadas, que removem diferenças por conta de variação da biomassa (Beebe et al. 1998). De fato, alta reprodutibilidade dos espectros é característica básica dos dados obtidos neste trabalho (Fig. 2 dos espectros brutos, Fig. 3 com o tratamento da primeira derivada com nove pontos).

Outra fonte de variação, independente da técnica de aquisição espectral empregada, é a diferença nas fases de crescimento entre as culturas. Primeiramente, o conteúdo celular muda ao longo do desenvolvimento do cultivo. Quando culturas de microalgas esgotam suas fontes de nutrientes, especialmente quanto ao nitrogênio, ocorre uma parada na citocinese celular, indicada pelo fim da fase exponencial de crescimento e o começo da fase estacionária do cultivo. Entretanto, a fotossíntese não para, e o carbono fixado nesse estágio é desviado para a produção de compostos de reserva, como carboidratos e lipídios (Giroldo e Vieira 2005; Rodolfi et al. 2009; Griffiths e Harrison 2009; Harwood e Guschina 2009).

Isto pode ser problemático quando comparamos culturas objetivando sua discriminação, já que a técnica de FTIR considera o conteúdo celular total. Por essa razão, Kansiz et al. (1999) sugerem que as culturas devem ser amostradas no final da fase exponencial para que as variações intra-cultura que ocorrem quando a amostragem é conduzida em diferentes fases do cultivo sejam minimizadas.

Outra característica dos compostos de reserva é que eles são altamente variáveis. Brown (1991) testou 16 espécies de microalgas marinhas das classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Eustigmatophyceae, Cryptophyceae, Prasinophyceae e Prymnesiophyceae e encontrou que o conteúdo total (em % da massa seca) dessas biomoléculas flutua significativamente entre as cepas, tanto dentro quanto entre divisões e classes.

Para lipídios, Lang et al. (2011) publicaram um abrangente trabalho com CG-EM (Cromatografia a Gás – Espectroscopia de Massas) onde pode ser observado que os perfis lipídicos variam muito, mesmo entre um autor e outro, o que eles consideram que seja causado por diferenças nas condições de cultivo.

No geral, eles consideram que os perfis lipídicos refletem a filogenia de classificações hierárquicas superiores, como divisões e classes, mas não se constitui em um marcador útil para discriminar gêneros e espécies. Este resultado está de acordo com Harwood e Guschina (2009), que expuseram que devido às morfologias e habitats variáveis que este grupo possui, os conteúdos lipídicos poderiam ser extremamente variáveis, mesmo entre algas de uma mesma divisão.

Sobre carboidratos, no mesmo trabalho citado acima, Brown (1991) encontrou que os carboidratos são principalmente constituídos de polissacarídeos, usualmente mais de 90% do total de carboidratos intracelulares. A composição de açúcares destes carboidratos possui algumas características constantes, como ser predominantemente constituída de glicose, mas não parecem ter qualquer padrão que poderia ser usado para discriminar espécies ou outras classificações hierárquicas.

Estes resultados, em conjunto com as variações às quais os compostos de reserva estão sujeitos durante todo o crescimento de um cultivo de microalgas, são indicativos, pelo menos a princípio, que usar regiões espectrais do FTIR relacionadas a lipídios e carboidratos objetivando a discriminação de cepas pode não ser uma boa abordagem.

Nossos resultados dão suporte a essa observação, sendo esta a razão para considerarmos a seleção das janelas espectrais como fator mais crítico do que os pré-tratamentos. Assim, a discussão que se segue é focada nas razões e possíveis causas para as janelas espectrais selecionadas terem fornecido melhores resultados, em função da significância biológica dos grupos químicos a elas relacionados. Quanto aos diferentes pré-

tratamentos estatísticos pode-se apenas apontar qual forneceu os melhores resultados - primeira derivada com nove pontos - e a discussão das janelas espectrais é baseada nos dados obtidos por esse pré-tratamento.

Em nosso trabalho, diferenças entre réplicas que estavam em final da fase exponencial e no começo da fase estacionária são óbvias nas análises de HCA (Fig. 7). Apesar de distinguir corretamente uma cepa da outra, cepas que possuíam análises de uma réplica de cultura em começo da fase estacionária - *C. clorastera* (009), *D. communis* (030), *C. cf. sphaericum* (060) - ou cepa que possuía uma réplica de cultivo em final de fase exponencial enquanto as outras duas já haviam entrado em fase estacionária - *S. ecornis* (088) – apresentaram estas réplicas de cultivo em clusters mais afastados neste HCA.

Especificamente sobre lipídios, nós consideramos apenas uma das duas regiões relativas a eles, 1745 – 1715 cm^{-1} , janela I (a outra região sendo por volta de 2920 cm^{-1}) (posicionamento das janelas espectrais na Fig. 5). Essa janela piorou a discriminação mesmo com culturas na mesma fase de crescimento (Fig. 7), resultando em maior sobreposição de cepas, refletindo os mesmos resultados de Harwood e Guschina (2009) e Lang et al. (2011).

Além, a separação entre as cepas não é satisfatória quando a janela IV, relativa aos carboidratos, é adicionada às análises quimiométricas (Fig 6a,b e c; Fig. 8). Na análise de HCA usando esta janela (Fig. 8), não somente as culturas com réplicas em fases de cultivo diferentes não foram agrupadas juntas (*C. clorastera* (009_3), *D. communis* (030_1), *C. cf. sphaericum* (060_3) e *S. ecornis* (088)), mas a separação correta em classificações de famílias e ordens não foi alcançada, com *S. ecornis* (088) e *D. communis* (030) posicionadas dentro da família Selenastraceae.

Portanto, nós verificamos que, a fim de conseguir uma boa discriminação das cepas e para obter um cluster que reflita melhor a classificação deste grupo de cepas/espécies, é melhor remover das análises quimiométricas as regiões espectrais relativas à compostos de

reserva. Usando somente as regiões do fingerprint verdadeiro e a da superposição de informações sobre a ligação C=O de ácidos orgânicos, fosfodiésteres e amida III das proteínas (janela V e janela III, respectivamente), uma discriminação e posicionamento em grupos hierárquicos melhores podem ser obtidos.

Preisner et al. (2006) conduziram uma abrangente pesquisa para determinar qual tratamento do conjunto de dados e seleção de variáveis poderiam melhorar as análises quimiométricas para a discriminação de amostras bacteriológicas. Seus resultados dão suporte parcial à nossa metodologia de pré-tratamento e seleção de janelas espectrais.

Através de técnicas robustas de bioinformática e quimiometria, eles determinaram qual pré-tratamento e quais variáveis, em termos de número de onda, deveriam ser usados para discriminar adequadamente dois sorotipos bacterianos. O pré-tratamento selecionado foi o de primeira derivada e a seleção de variáveis indicou uma janela mais estreita, predominantemente na região dos carboidratos, mas não usando todos os números de onda contidos nela, mostrando que esta região de fato tem uma maior variabilidade.

No entanto, nós não consideramos essa característica de maior variabilidade desta região como desejável para discriminar nossas cepas porque as variações desta região poderiam ser uma resposta fisiológica a regimes de cultivo, não uma característica distintiva entre os organismos que usamos. É necessário notar que no trabalho de Preisner et al. (2006) somente uma espécie de bactéria foi utilizada, com o objetivo de discriminar diferentes sorotipos. Por outro lado, nosso objetivo primário era discriminar diferentes espécies/cepas de microalgas.

Como já exposto, a fisiologia da acumulação dos compostos de reserva em situações de estresse nutricional exerce um papel importante para as microalgas, algo que não tem um impacto tão significativo no trabalho deles devido aos seus métodos de cultivo. Ademais, nós

também encontramos que a janela 1500 – 1200 cm^{-1} forneceu bons resultados, mesmo quando usando todos os seus números de onda.

Essas diferenças na escolha da janela espectral podem indicar que a seleção de variáveis adequadas é dependente do objetivo do trabalho, p.e. quando o objetivo é separar organismos mais próximos, talvez escolher regiões com mais variação poderia ajudar em sua discriminação.

Esta observação possivelmente tem algum suporte no fato de que as janelas espectrais que nós verificamos serem mais efetivas na separação das cepas aqui testadas podem ser tentativamente designadas a compostos celulares mais *estruturais*, mas que ainda retêm variabilidade suficiente para discriminar os organismos, em oposição à região espectral das proteínas, que parece ser muito conservada entre todos os organismos, e a região dos compostos de reserva - muito variável-, ambas piorando a análise quando incluídas.

O padrão da região do fingerprint verdadeiro (janela V) origina-se de vibrações acopladas, p.e., do esqueleto carbônico das moléculas (Stuart 2004), sendo dependente dos grupos orgânicos a ele ligados. Para a janela III, temos bandas de absorção relativas à fosfodiésteres, ligações covalentes fortes altamente eletronegativas que ligam duas pentoses nas fitas de DNA e RNA, e que por terem tão alta eletronegatividade apresentam uma banda de absorção forte no espectro. Essa eletronegatividade é balanceada por compostos carregados positivamente, como histonas e poliaminas, as quais se relacionam ao empacotamento do DNA.

Portanto, similarmente as vibrações de acoplamento dos esqueletos carbônicos, um acoplamento das ligações fosfodiésteres poderia ocorrer, variando de acordo com a taxa de empacotamento do DNA, o que poderia explicar porque esta região forneceu boa discriminação entre as cepas. No entanto, mais estudos são necessários para verificar se esta hipótese procede.

No geral, a técnica de FTIR por ATR forneceu uma abordagem confiável para obter espectros bastante reprodutíveis, o requerimento mais importante para chegar a uma boa diferenciação entre os organismos. Como um primeiro teste desta técnica para identificar microalgas cocóides e avaliar as classificações resultantes das análises quimiométricas, bons resultados foram alcançados, com excelente discriminação entre espécies e gêneros, exceto para as cepas da mesma espécie muito proximamente relacionadas (Fig. 7) *A. densus* cepas 128 e 239.

É interessante notar este fato dado que a cepa *A. densus* (003) tem sido mantida em nosso banco de culturas desde 1979, enquanto que as cepas *A. densus* 128 e 239 foram identificadas e isoladas de amostras ambientais em 2009 e 2010, respectivamente. Essa observação poderia indicar que cepas mantidas em coleções de culturas, neste caso por 35 anos, apresentam algum grau de variação em relação às amostras de cepas “mais” naturais, embora ainda sendo bastante próximas a elas.

Os grupamentos em clusters da análise de HCA mostrado na Figura 7 refletem a classificação desses organismos atualmente aceita, com algumas pequenas diferenças. Como já exposto, nossos organismos estão distribuídos em clusters que se relacionam corretamente às ordens e famílias, exceto por *S. ecornis* (088), que foi posicionado em um cluster próprio, ainda dentro da ordem Sphaeropleales, mas separado pelo nó anterior.

Além do fato de que a classificação deste grupo tem mudado constantemente nos últimos anos com a introdução da abordagem molecular em adição ao conceito de morfoespécie (veja Krienitz e Bock (2012)), outra possível razão para esse posicionamento da cepa *S. ecornis* (088) em nosso trabalho poderia ser que a família Scenedesmaceae está um pouco sub-amostrada.

Nosso trabalho tem apenas três cepas de Scenedesmaceae e, com mais cepas desta família nós esperaríamos que elas se agrupassem todas juntas em um mesmo cluster, como o

que de fato aconteceu com a família Selenastraceae, a qual apesar de estar mais dispersa no PCA (Fig. 6e) está localizada em um único cluster robusto no HCA (Fig. 7).

Além disso, dentro desta família há algumas observações interessantes sobre as possíveis relações entre os gêneros. Hegewald et al. (2010), usando o marcador genético ITS2, verificou que a família Scenedesmaceae é subdividida em três sub-famílias, Desmodesmoidea, Coelastroidea e Scenedesmoidea, com as últimas duas mais próximas.

Por outro lado, em nossas análises nós observamos que as cepas *D. communis* (030) e *C. cf. sphaericum* (060) (espécies de Desmodesmoidea e Coelastroidea, respectivamente) são mais próximas uma da outra do que em relação à cepa *S. ecornis* (088) (Scenedesmoidea). No entanto, nós, de fato, temos poucas cepas para sustentar essas relações com confiança, e um trabalho mais focado dentro desta família seria necessário para verificar se as relações entre cepas que encontramos para este grupo estão em conformidade com outros autores.

Uma tendência de separação das cepas similar é observada em Selenastreaceae. Nesta família, nossos dados agruparam as três cepas de *A. densus* próximas de *S. bibraianum* (241) e *A. fusiformis* (333), mas uniram estas cepas em um cluster diferente do que contém *S. gracile* (350) e *M. komarkovae* (353). Embora ainda dentro da família Selenastraceae, *S. bibraianum* (047) também ocupou um cluster próprio. Se um paralelo for traçado com a família Scenedesmaceae, o posicionamento das espécies pode indicar que esta família também tem sub-famílias e há indicação de, por nem todos os representantes de um mesmo gênero estarem agrupados juntos, que esta família possui espécies crípticas e convergência morfológica.

Fawley et al. (2006) reportaram observações mais precisas sobre isso em seu trabalho, com características morfológicas normalmente usadas para diferenciar espécies de Selenastraceae, as quais nós também usamos para identificar nossas cepas, levando a identificações e classificações divergentes das alcançadas com análise molecular. De fato,

tanto cepas morfológicamente distintas produziram sequências de 18S rDNA similares quanto cepas morfológicamente similares produziram sequências moleculares distintas, mostrando a convergência morfológica e a plasticidade fenotípica do grupo.

No trabalho de Krienitz et al. (2001), cepas dos gêneros *Monoraphidium*, *Ankistrodesmus* e *Selenastrum* (os últimos apresentados no sinónimo *Ankistrodesmus gracilis* e *A. bibraianus*) estão distribuídos de forma espalhada nos clados, mostrando que o que consideremos com *S. bibraianum* (*A. bibraianus* no trabalho deles) também está agrupado mais distante das espécies de *Monoraphidium* de outras espécies de *Ankistrodesmus*, dando suporte a visão de que muito da identificação e classificação atual dessas espécies precisa de revisão.

5. Conclusões

Para identificar e discriminar cepas de microalgas por FTIR é necessário o desenvolvimento de um método altamente reprodutível de aquisição espectral. A técnica de ATR mostrou atender este requisito, com o benefício de contornar os problemas – p.e. deposição não homogênea e variação na espessura da amostra – da técnica de deposição em janelas, continuando a ser uma análise bastante rápida.

A seleção de regiões espectrais e pré-tratamentos adequados para discriminar as espécies e cepas é de importância crucial. Aqui testamos diversos pré-tratamentos e determinamos que a primeira derivada com nove pontos forneceu os melhores resultados. Também testamos diversas combinações de janelas espectrais dentro da região de 1800 – 675 cm^{-1} e verificamos que o uso de janelas relacionadas a compostos de reserva e proteínas não proporcionaram boa discriminação das cepas testadas.

A combinação das regiões 1500 – 1200 cm^{-1} e 900 – 675 cm^{-1} resultaram na melhor discriminação, sem qualquer sobreposição de espécies. Talvez a razão para esta melhor separação seja que estas regiões relacionam-se com compostos mais conservados, estruturais, das células, mas que ainda retêm variação suficiente para discriminar as cepas.

Adicionalmente, as análises quimiométricas parecem refletir corretamente a classificação das cepas testadas, posicionando-as de acordo com as relações filogenéticas atualmente aceitas, com apenas pequenas diferenças em relação à classificação proposta por marcadores genéticos. Este é um bom indicativo de que a técnica de FTIR ATR pode ser utilizada em uma abordagem polifásica em conjunto com os conceitos filogenéticos e morfológicos de espécies, fornecendo outra ferramenta para ajudar a resolver a classificação e identificação do grupo altamente diverso e problemático das microalgas cocóides verdes de água doce.

Bibliografia

- Al-Jowder O, Defernez M, Kemsley EK, Wilson RH (1999) Mid-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Meat Products. *J Agric Food Chem* 47:3210–3218. doi: 10.1021/jf981196d
- Al-Jowder O, Kemsley EK, Wilson RH (2002) Detection of Adulteration in Cooked Meat Products by Mid-Infrared Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 50:1325–1329. doi: 10.1021/jf0108967
- An SS, Friedl T, Hegewald E (1999) Phylogenetic Relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. *Plant Biol* 1:418–428.
- Andersen RA (2005) Algal culturing techniques. Elsevier/Academic Press, Burlington, Mass
- Beardall J, Berman T, Heraud P, et al. (2001) A comparison of methods for detection of phosphate limitation in microalgae. *Aquat Sci* 63:107–121.
- Beebe KR, Pell RJ, Seasholtz MB (1998) Chemometrics: a practical guide. Wiley
- Blokker P, Schouten S, de Leeuw JW, et al. (1999) Molecular structure of the resistant biopolymer in zygospore cell walls of *Chlamydomonas monoica*. *Planta* 207:539–543.
- Brown MR (1991) The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 145:79–99.
- Buffeteau T, Desbat B, Eyquem D (1996) Attenuated total reflection Fourier transform infrared microspectroscopy: Theory and application to polymer samples. *Vib Spectrosc* 11:29–36.
- Dean AP, Sigee DC, Estrada B, Pittman JK (2010) Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour Technol* 101:4499–4507.
- Domenighini A, Giordano M (2009) Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the assessment of water quality. *J Phycol* 45:522–531.
- Fawley MW, Dean ML, Dimmer SK, Fawley KP (2006) evaluating the morphospecies concept in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* 42:142–154. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00169.x
- Giordano M, Kansiz M, Heraud P, et al. (2001) Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 37:271–279. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x
- Giroldo D, Vieira AAH (2005) Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. *J Plankton Res* 27:695–705. doi: 10.1093/plankt/fbi043

- Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid Evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59:491–517. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915
- Griffiths MJ, Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J Appl Phycol* 21:493–507. doi: 10.1007/s10811-008-9392-7
- Griffiths PR (2007) *Fourier transform infrared spectrometry*, 2nd ed. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J
- Guillard RRL, Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide c². *J Phycol* 8:10–14. doi: 10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x
- Harwood JL, Guschina IA (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91:679–684. doi: 10.1016/j.biochi.2008.11.004
- Hegewald E, Wolf M, Keller A, et al. (2010) ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta, Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia* 49:325–335. doi: 10.2216/09-61.1
- Helm D, Labischinski H, Naumann D (1991a) Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. *J Microbiol Methods* 14:127–142. doi: 10.1016/0167-7012(91)90042-0
- Helm D, Labischinski H, Schallehn G, Naumann D (1991b) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137:69–79.
- Hirschmugl CJ, Bayarri ZE, Bunta M, et al. (2006) Analysis of the nutritional status of algae by Fourier transform infrared chemical imaging. *Infrared Phys Technol* 49:57–63.
- Hoek C van den (1995) *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York
- Huss VA, Frank C, Hartmann EC, et al. (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *J Phycol* 35:587–598.
- Kansiz M, Heraud P, Wood B, et al. (1999) Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* 52:407–417.
- Krienitz L, Bock C (2012) Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia* 1–32.
- Krienitz L, Ustinova I, Friedl T, Huss VA (2001) Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J Phycol* 37:852–865.
- Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol* 11:124.

- Léveillé J-C, Amblard C, Bourdier G (1997) Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrine phytoplankton. *J Plankton Res* 19:469–490.
- Lewis LA, McCourt RM (2004) Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* 91:1535–1556.
- Luinge HJ, Hop E, Lutz ETG, et al. (1993) Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. *Anal Chim Acta* 284:419–433.
- Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vib Spectrosc* 26:151–159. doi: 10.1016/S0924-2031(01)00113-8
- Mattox, K.R. & Stewart, K.D. 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. Pp. 29-72, In Irvine, D.E.G. & John, D.M. (eds.), *The systematics of Green Algae*. The Systematics Association, Special Vol. 27, Academic Press, London.
- Mayr E (1942) *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*. Harvard University Press
- Montechiaro F, Hirschmugl CJ, Raven JA, Giordano M (2006) Homeostasis of cell composition during prolonged darkness. *Plant Cell Environ* 29:2198–2204. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01593.x
- Naumann D (2000) Infrared spectroscopy in microbiology. *Encycl. Anal. Chem.*
- Norris KP (1959) Infra-red spectroscopy and its application to microbiology. *J Hyg* 57:326–345.
- Pistorius AM, Stekhoven FMS, Boveegeurts PH, Degrip WJ (1994) Quantitative analysis of residual detergent in proteoliposomes by Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Biochem* 221:48–52.
- Preisner O, Lopes JA, Guiomar R, et al. (2006) Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal Bioanal Chem* 387:1739–1748. doi: 10.1007/s00216-006-0851-1
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648.
- Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, et al. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 102:100–112. doi: 10.1002/bit.22033
- Saunders GW, Kucera H (2010) An evaluation of *rbcl*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogam Algal* 31:487–528.
- Stehfest K, Toepel J, Wilhelm C (2005) The application of micro-FTIR spectroscopy to analyze nutrient stress-related changes in biomass composition of phytoplankton algae. *Plant Physiol Biochem* 43:717–726.
- Stuart B (2004) *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. J. Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ

- Tapp HS, Defernez M, Kemsley EK (2003) FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils. *J Agric Food Chem* 51:6110–6115.
- Thomas LC, Greenstreet JES (1954) The identification of micro-organisms by infrared spectrophotometry. *Spectrochim Acta* 6:302–319.
- Wartewig S, Neubert R (2005) Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev* 57:1144–1170. doi: 10.1016/j.addr.2005.01.022
- Wenning M, Scherer S (2013) Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7111–7120. doi: 10.1007/s00253-013-5087-3
- Yoshinaga K, Ohta T, Suzuki Y, Sugiura M (1988) *Chlorella* chloroplast DNA sequence containing a gene for the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and a part of a possible gene for the β' subunit of RNA polymerase. *Plant Mol Biol* 10:245–250.

Apêndice 1. *FTIR: Processos físicos que geram os espectros e princípio de funcionamento do equipamento*

As vibrações que geram ou modificam um momento dipolo são entendidas como a variação da posição dos átomos de uma ligação química ao longo de um *modo normal de vibração*. Para entender de uma forma mais clara esse conceito, pode-se entender as vibrações moleculares como uma aproximação ao modelo do movimento harmônico simples.

O movimento harmônico simples é um movimento periódico, no qual a força para restaurar o equilíbrio de um objeto qualquer é proporcional à distância desse objeto ao seu ponto de equilíbrio. Este conceito é bem exemplificado por um sistema com uma massa presa a um objeto imóvel por uma mola. Considerando a ligação entre dois átomos análoga a esse sistema, onde deslocar um átomo gera uma força proporcional a esse deslocamento para retornar o átomo para sua posição de equilíbrio, os movimentos dos átomos podem ser descritos pelo modelo do movimento harmônico simples e a força exercida pela mola, no exemplo, é análoga ao momento dipolo elétrico entre dois átomos ligados.

Esta é na verdade apenas uma aproximação simplificada, já que os modos normais de vibração são não-harmônicos. Esta aproximação é útil porque a descrição mais precisa desses movimentos, feita através de teoria do oscilador quântico harmônico, é bastante complicada, fugindo do escopo deste trabalho.

Considerando o movimento harmônico simples, ao se determinar a posição de um átomo fora do equilíbrio, também chamado de coordenada normal, e o conjunto das coordenadas normais, determina-se qual tipo de vibração é excitada em uma ligação química quando um quantum com energia apropriada é fornecido (com a energia fundamental dessa vibração ou um de seus múltiplos), o que é chamado de modo vibracional normal.

A intensidade desse movimento é proporcional ao momento dipolo molecular induzido com respeito à coordenada normal e, portanto, a banda de absorção no espectro referente a

essa ligação é determinada, em termos de nível energético – novamente nota-se a facilidade em se usar a unidade cm^{-1} . Como já dito, a intensidade de uma banda de absorção aumenta conforme aumenta o número de moléculas ou ligações atômicas absorvendo ou emitindo energia naquela frequência.

Os modos normais de vibração possíveis, retirados de Stuart (2004), são de alongamento simétrico e assimétrico e de dobramento por deformação (tesoura), *rocking*, *wagging*, *twisting*, podendo ser dobramento para fora do plano e dobramentos no plano, apresentados nas figuras 15 e 16. Cada um dessas vibrações, mesmo quando são vibrações de diferentes tipos ocorrendo em uma mesma ligação química, possuem energias (número de onda) específicas.

Quanto ao número de vibrações possíveis, mesmo moléculas bastante simples apresentam muitas vibrações diferentes. Uma molécula poliatômica linear tem $3N-5$ graus de liberdade de vibrações e uma molécula poliatômica não-linear tem $3N-6$ graus de liberdade de vibrações, onde N é igual ao número de átomos na molécula (Stuart 2004).

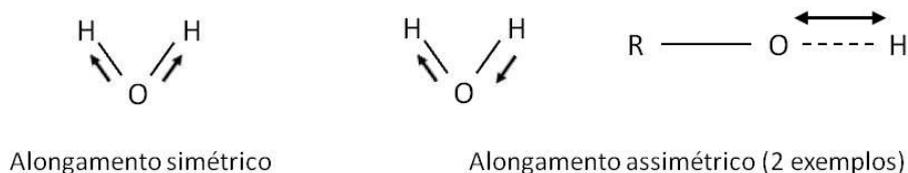


Figura 15. Representação das vibrações de alongamento simétricas e assimétricas. Adaptado de Stuart (2004).

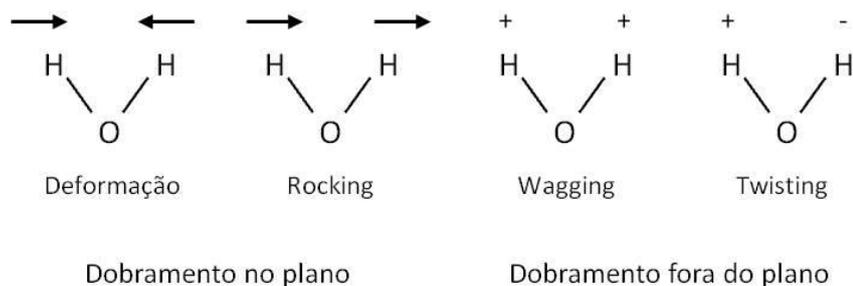


Figura 16. Representação das vibrações de dobramento no plano e fora de plano. Adaptado de Stuart (2004).

Por conta desta grande variedade de vibrações possíveis e o fato de cada vibração depender dos momentos dipolo da totalidade do material analisado, o espectro de uma amostra envolve a interação de inúmeras bandas de absorção. Além, quando o material a ser analisado se constitui de uma mistura complexa, ocorre também a sobreposição de bandas com o mesmo número de onda, mas originadas em moléculas diferentes. Como exemplo destas interações entre bandas, pode-se citar o “*overtone*” e o “*coupling*”.

No *overtone*, quando um segundo quantum correspondente a uma frequência fundamental é absorvido, gera-se uma frequência mais alta, de forma que a cada quantum absorvido após a primeira excitação, dobra-se a frequência da vibração (Stuart 2004). Um *overtone* de uma frequência pode se sobrepor no espectro a uma frequência fundamental de outra ligação química. Esse efeito é conhecido como ressonância de Fermi, e acaba por gerar duas bandas, de igual intensidade e muito próximas, onde deveria haver somente uma.

O *coupling* ocorre quando bandas com pequenos ou nenhum momentos dipolo, como as que representam as ligações C-C, N=N entre outras com baixa polaridade e bastante comuns em amostras biológicas, se ‘acoplam’, formando as chamadas vibrações estruturais (*skeletal vibrations*).

Disto resulta a complexidade dos espectros destas amostras, o qual vem do acoplamento de vibrações de grande parte ou mesmo da totalidade da molécula (Stuart 2004), especialmente do acoplamento das vibrações da cadeia carbônica em biomoléculas.

Essa complexidade de interações entre as vibrações de uma amostra muitas vezes impede a caracterização de um ou alguns compostos específicos. No entanto, este conjunto de bandas provavelmente irá se organizar em um padrão característico, ou *fingerprint* (impressão digital), da molécula ou amostra estudada ao invés de refletir apenas alguns grupos químicos dentro da molécula ou da amostra com mistura (Stuart 2004).

Este comportamento é exatamente o que faz desta técnica promissora nos estudos de microrganismos. Espectros específicos e únicos poderiam ser obtidos quando analisamos diferentes espécies, e o reconhecimento de padrões nesses espectros poderiam ser utilizados para individualizar os organismos.

Explicados os conceitos físicos que geram as vibrações de uma dada ligação química, é agora interessante explicar o princípio de funcionamento dos equipamentos e a forma como os espectros são gerados e organizados para que possamos entendê-los.

O funcionamento do espectrômetro de infravermelho é baseado em interferências na radiação de infravermelho causadas por um *interferômetro*. A maioria dos interferômetros utilizados atualmente nos espectrômetros tem seus desenhos baseados no interferômetro monocromático de dois feixes desenvolvido por Michelson em 1891 (Griffiths 2007), de forma que entender esse interferômetro facilita o entendimento dos interferômetros atuais.

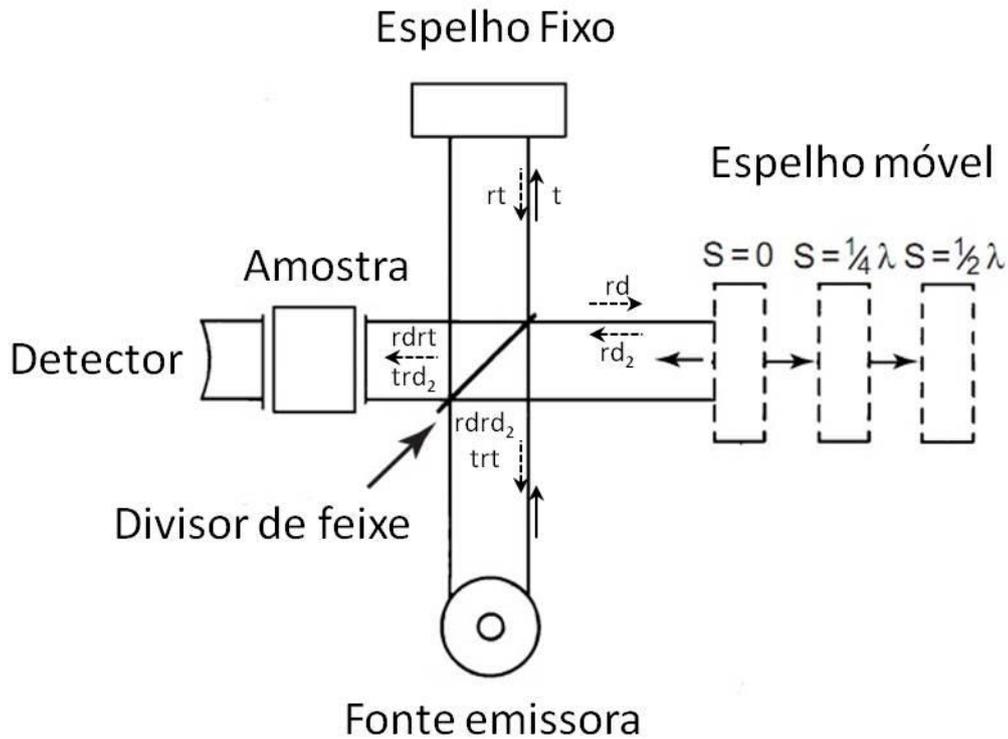


Figura 17. Interferômetro de Michelson. Primeiro caminho da divisão do feixe inicial: t = feixe transmitido; rt = feixe t refletido; $rdrt$ = feixe rt refletido no divisor de feixe em direção ao detector; trt = feixe rt transmitido em direção à fonte; Segundo caminho da divisão do feixe inicial: rd = feixe refletido no divisor de feixe; rd_2 = feixe rd refletido no espelho móvel; trd_2 = feixe rd_2 transmitido em direção ao detector; $rdrd_2$ = feixe rd_2 refletido no divisor em direção à fonte. Notar que $rdrt$ e trd_2 são os feixes que interferem e são lidos no detector.

Um interferômetro divide um feixe de radiação em dois caminhos distintos e os recombina depois de introduzir uma diferença de comprimento em um dos caminhos, causando uma interferência entre os feixes, de forma que as variações da intensidade do feixe que sai do interferômetro é medida por um detector em função da diferença entre as distâncias percorridas pelos feixes (Griffiths 2007). A forma mais simples de um interferômetro é apresentada na Figura 17, adaptada de Naumann (2000).

Neste interferômetro, considerando um divisor de feixes ideal que não absorve a radiação infravermelha e uma fonte monocromática de luz, exatamente metade do feixe de radiação incidente será transmitido através do divisor de feixes em direção ao espelho fixo e

metade será refletida em direção ao espelho móvel. A interferência será causada pela variação na distância (S) - também chamada de retardamento (*retardation*) - do espelho móvel, que refletirá a radiação de forma que essa fração da radiação irá interagir com a fração refletida pelo espelho fixo em fases de onda diferentes, causando interferências na radiação que chegará ao detector.

Considerando o espelho móvel em posições fixas determinadas, quando os espelhos estão equidistantes do divisor de feixe, o retardamento é zero e as ondas dos feixes refletidos estão em fase na recombinação que ocorre no divisor, interferindo construtivamente, de forma que a intensidade do feixe que chega ao detector é a mesma do feixe que deixou a fonte emissora.

Se o espelho for posicionado em $S = \frac{1}{4}\lambda$, o retardamento do feixe refletido no espelho móvel é $\frac{1}{2}\lambda$, ou seja, seu retardamento tem metade do comprimento de onda, de forma que as ondas agora interferem destrutivamente, e nenhuma luz chega ao detector. Se o espelho for colocado em $S = \frac{1}{2}\lambda$ o retardamento é exatamente λ e as ondas estão novamente em fase, com interferência construtiva.

Se o espelho for movido a uma velocidade constante, como acontece nos aparelhos comercialmente disponíveis, o sinal no detector resultará em um interferograma que irá variar como uma função cosseno, com forma sinusóide, com o máximo ocorrendo quando o retardamento for um múltiplo integral de λ (Griffiths 1986), como visto em Fig. 18A e Fig. 18B (retirada de Åmand & Tullin, material de ensino a distância retirado da internet no dia 25/09/2013 as 18:08h, link: http://turroserver.chem.columbia.edu/pdf_db/theory_ftir.pdf).

Para um interferômetro com uma fonte de radiação policromática, ou seja, com mais de uma frequência de onda emitida pela fonte emissora, o interferograma obtido será a resultante da integral dos interferogramas de todas as frequências emitidas (Griffiths 1986).

Portanto, cada ponto dos dados contém informações sobre toda a região do infravermelho (Naumann, 2000). Essa interação é bem representada na parte C da figura 18.

Enquanto os cálculos de interferômetros monocromáticos são triviais, calcular o interferograma resultante de uma fonte policromática exige grande capacidade de processamento, algo só alcançado relativamente há pouco tempo com o desenvolvimento de computadores acessíveis e com maior poder de computação.

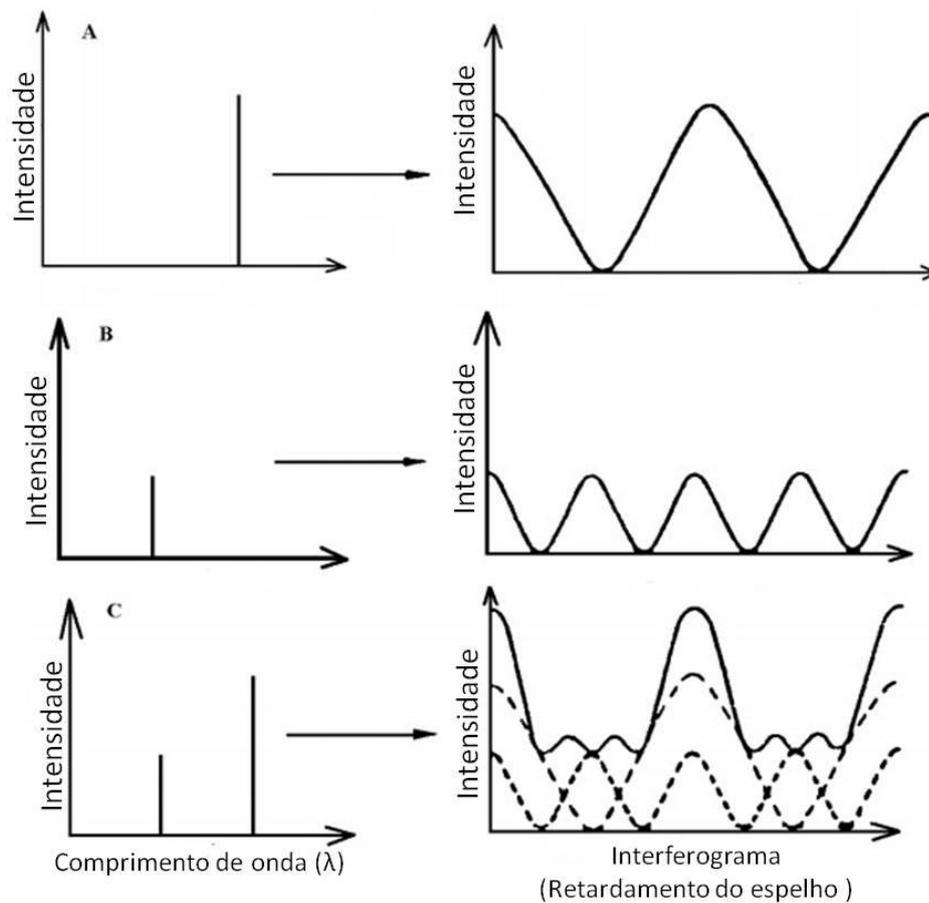
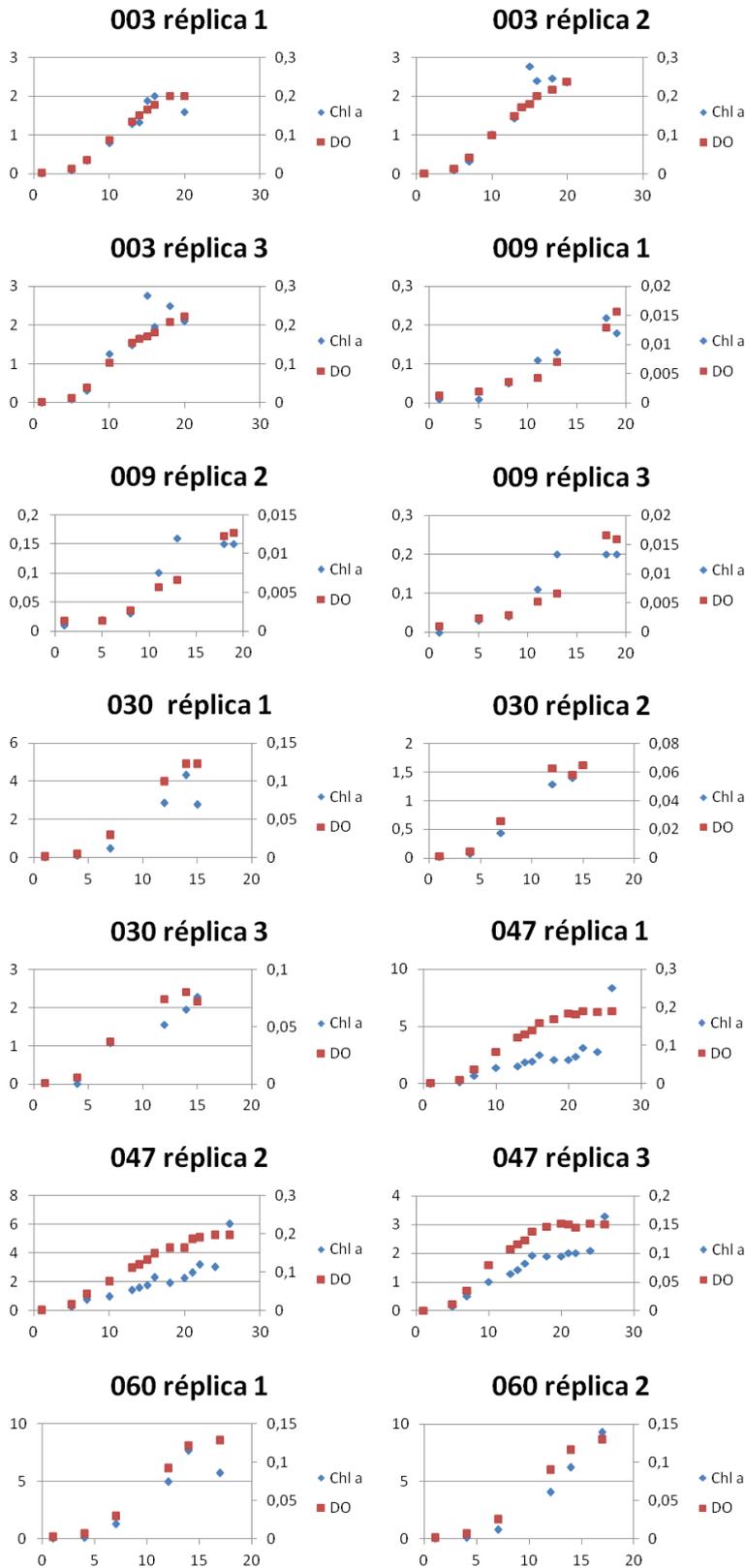
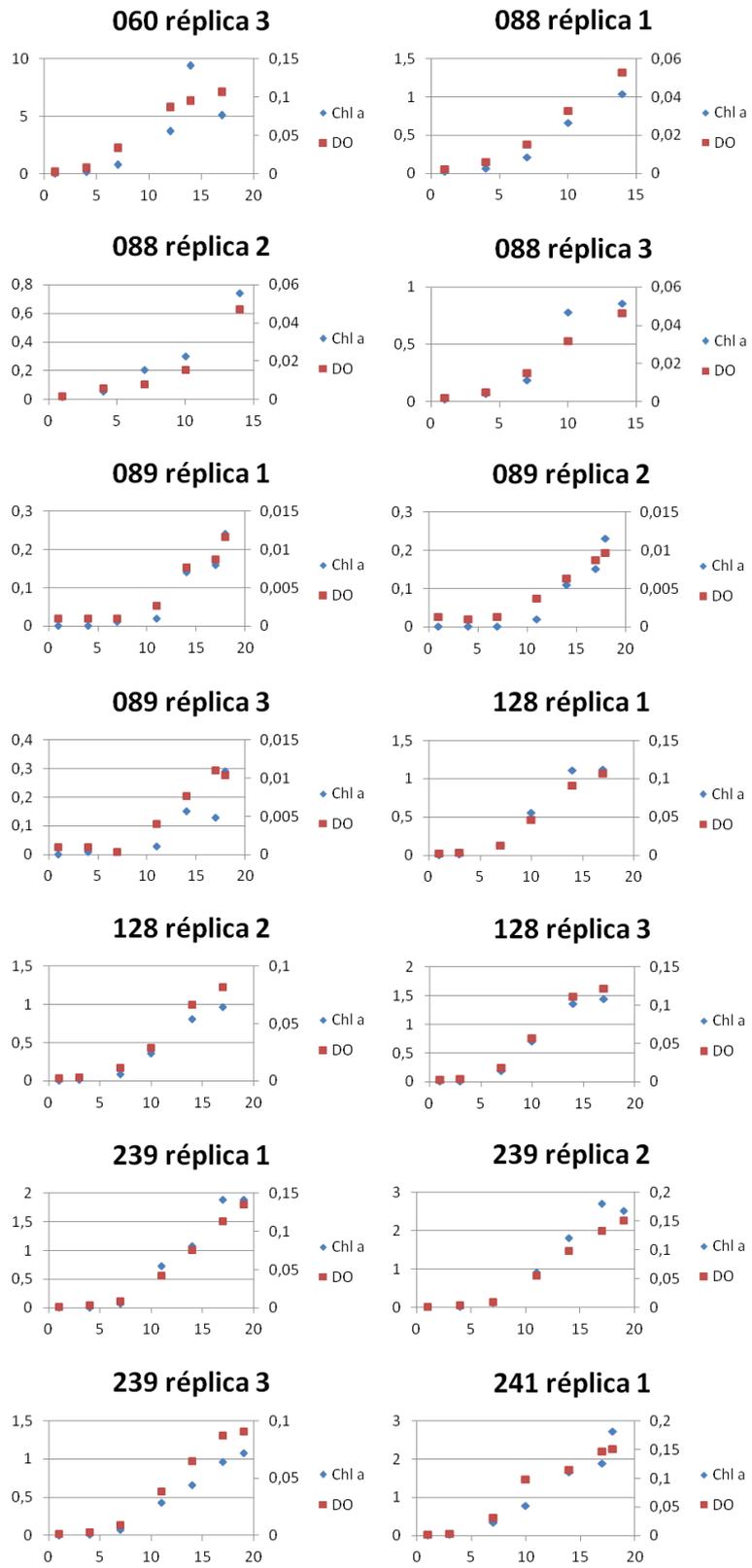


Figura 18. Efeito do interferômetro sobre sinais de diferentes comprimentos de onda. Em comprimentos de onda maiores, a frequência do sinal é mais baixa (A). Comprimentos de onda menores geram interferômetros com frequências mais altas (B). Em interferômetros policromáticos ocorre a superposição das frequências dos sinais de todos os comprimentos de onda presentes, exemplificado com apenas dois sinais (C).

A um interferograma obtido de uma fonte policromática é aplicada a *transformação de Fourier*, um método matemático de separar as frequências individuais em um espectro com suas características discerníveis (Naumann, 2000) e que dá nome a esta técnica, aumentando dramaticamente a qualidade do espectro obtido e minimizando o tempo necessário para a sua aquisição.

Apêndice 2. Curvas de crescimento individuais das culturas





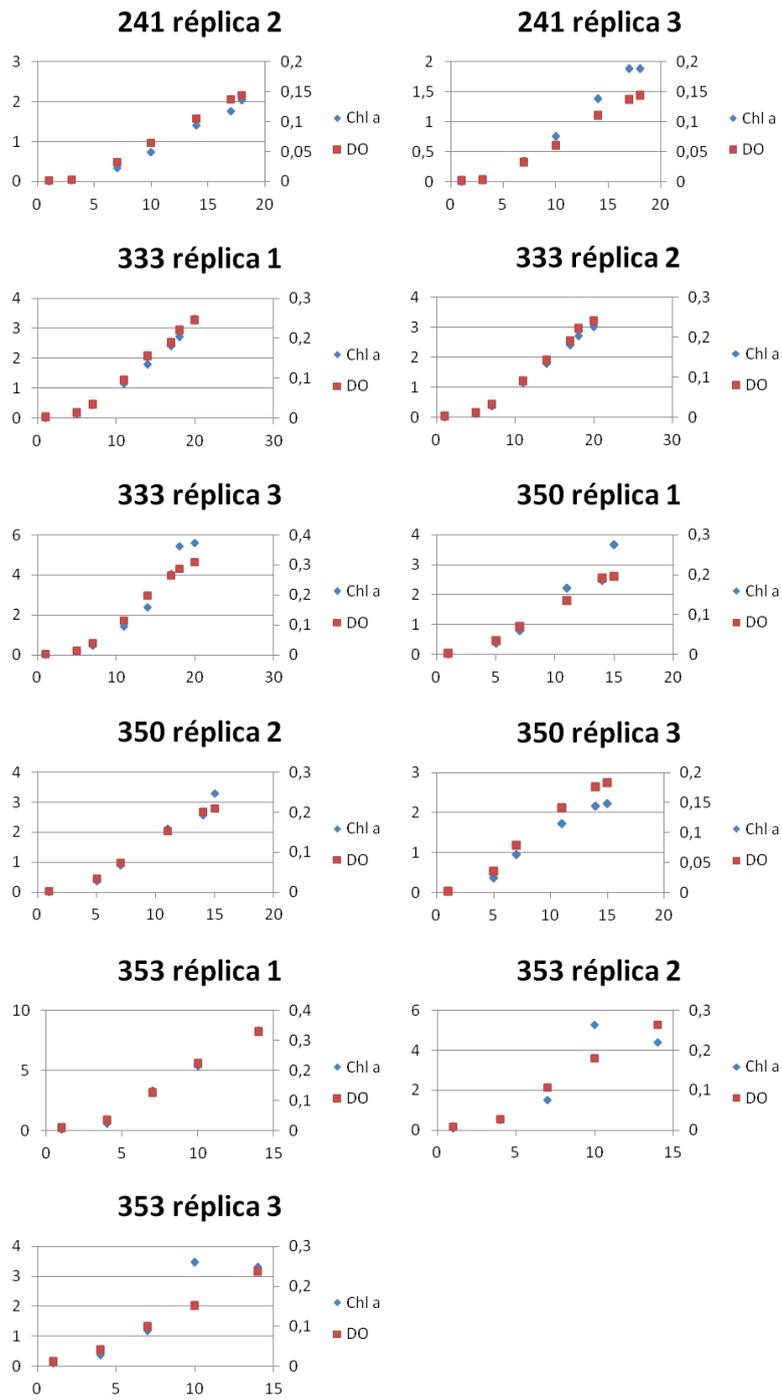


Figura 19. Curvas de crescimento das réplicas individuais de cultivo, acompanhadas por clorofila a (mg/L, losângulo) e por densidade ótica (quadrado). As cepas estão identificadas apenas por seus códigos.