

## Jornada da Iniciação Científica do TECPAR 28 de Agosto de 2015

### Identificação de compostos em algas verdes *Chlorella* por HPLC e MS.

Antônio César de Godoi

Roberto Sidnei Chiandotti

Centro de Alimentos e Medicamentos

#### Resumo

*Chlorella* são microalgas de grande predominância e apresentam elevadas quantidades de clorofila e antioxidantes, capazes de reduzir os efeitos causados pelos radicais livres, além de proteínas, carboidratos e lipídios, substâncias que podem ser determinadas por métodos analíticos tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Espectrometria de Massa (MS).

Os componentes dessas microalgas têm sido objeto de vários estudos a fim de comprovar suas propriedades terapêuticas em tratamento de doenças, alimentação humana e animal, controle microbiológico e uma série de outras utilidades. Em função disso, a *Chlorella* é uma espécie de grande interesse comercial.

**Palavras-chave:** *Chlorella*, microalgas, espectrometria de massa, cromatografia.

#### 1. Introdução

As microalgas são capazes de produzir valiosas biomoléculas tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e vitaminas para uma ampla gama de aplicações, incluindo produtos farmacêuticos e nutracêuticos, suplementos alimentares, pigmentos para corantes naturais, aditivos para rações animais, fertilizantes, tratamento de efluentes e bioenergia com foco na produção de diferentes biocombustíveis, incluindo o biodiesel, biogás, bio-óleo e biohidrogênio (YOSHIHITO 2009; LI et al 2008; CHISTI 2007; DERNER et al 2006; SPOLAORE et al 2006).

Os principais constituintes (composição geral) da microalga *Chlorella*, de acordo com Spolaore et al, 2006, são proteínas (51% - 58%), carboidratos (12% - 17%) e lipídeos (14% - 22%). Entre tais classes de compostos podem ser citados vitaminas, clorofila, carotenoides e ácidos graxos neutros de cadeias longas poli-insaturadas (OTLES; PIRE 2001).

A espécie *Chlorella* é uma das microalgas mais estudadas e está entre as poucas empregadas na alimentação humana. Apresenta elevado teor de proteína, acumula

lipídeos e carboidratos e também pode apresentar muitas vitaminas e minerais (TANG; SUTER 2011).

Em função do exposto, o objetivo deste trabalho foi efetuar um experimento preliminar propondo um método de solubilização dos componentes de interesse e sua identificação através de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) e Espectrometria de Massa (MS).

## 2. Técnicas de HPLC e MS aplicadas na avaliação da composição da *Chlorella sp*

*Chlorella* é uma alga que é rica em proteínas teor (60%, proporcionando a maioria dos aminoácidos) e contém muitas vitaminas e minerais. No entanto, a parede celular da *Chlorella* é rígida e indigesta, tem um teor excepcionalmente elevado de clorofila. Contem grandes quantidades de folato, vitamina B-12 e ferro, podendo ajudar a redução da anemia e distúrbios hipertensivos (TANG; SUTER, 2011).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), apresenta uma alternativa e método para análise de vários compostos, tais como lipídeos, podendo identificar várias classes de lipídeos. Quando combinado com espectrometria de massa, pode se obter um quadro mais detalhado de determinadas espécies lipídicas dentro de cada classe. Análise de lipídeos desses extratos por HPLC revelou além do triacilglicerol, uma quantidade surpreendentemente grande de hidrocarbonetos saturados. Estes métodos são relativamente simples, mas eles fornecem uma medida quantitativa detalhada dos vários componentes lipídicos em algas, incluindo hidrocarbonetos saturados (JONES; MANNING; MONTOYA; KELLER; POENIE, 2012).

*Chlorellas* cultivadas sob 24h de luz e 10% de CO<sub>2</sub>, apresentaram os melhores índices de crescimento e maiores teores de lipídeos, proteínas e umidade em comparação com outras condições de cultura. Curiosamente, o teor de ácidos graxos foi dependente da quantidade de CO<sub>2</sub>. A análise de ácidos graxos da *Chlorella* por cromatografia a gás - espectrometria de massa (GC-MS) apresentou ácidos graxos poli-insaturados (linoleico e linolênico) em abundância em comparação com outros ácidos graxos. As concentrações de palmítico, oleico, linoleico e linolênico aumentaram quando a quantidade de dióxido de carbono foi aumentada de 1 a 10% em ambas as condições de cultura (12 e 24 h de luz). Este estudo mostra a possibilidade de modificação de conteúdo de lipídeos em microalgas de água doce através da variação da quantidade de dióxido de carbono e luz (YUSOFI; BASARI; MUKTI; SABUDDIN; MUDA; SULAIMAN; MAKPOL; NGAH, 2011).

Os lipídeos de algumas microalgas são espécies de hidrocarbonetos semelhantes aos encontrados no petróleo enquanto que os de outras espécies se assemelham aos óleos de sementes oleaginosas, podendo ser convertidos em combustível para motores diesel por transesterificação. Uma vez que o óleo tenha sido produzido a partir de algas, pode ser transesterificado ao longo das rotas de biodiesel tradicionais ou hidro tratado para produzir hidrocarbonetos (RENGARAJU; PALANISAMY; JAGANNATHAN; BOOTHALINGAM; SEENIVASAN; NS, 2012).

Os principais ácidos graxos do óleo extraído da microalga *Chlorella vulgaris* são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais ácidos graxos do óleo da microalga *Chlorella vulgaris*.

Ácido	Fórmula	Teor (%)
Capróico	C6:0	2,8
Palmítico	C16:0	14,4
Esteárico	C18:0	1,6
Oléico	C18:1	17,6
Linoléico	C18:2	12,0
Linolênico	C18:3	15,8

Adaptado de Otlés e Pire 2001.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Microrganismo

Uma biomassa de microalgas verdes da espécie *Chlorella sp* foi a matriz utilizada.

#### 3.2. Reagentes

Os principais reagentes utilizados nos experimentos foram etanol (MERCK), hexano (EMSURE), solução de hidróxido de potássio KOH (ANIDROL), todos grau P.A. e cartucho de sílica -Sep-Pak Vac (WATERS).

Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), foram empregados a acetonitrila e metanol (J.T.BAKER), grau cromatográfico.

#### 3.3. Preparo da Amostra

Uma amostra de 225g de biomassa da microalga congelada foi triturada com 285 mL de etanol, sendo o volume final dividido em seis alíquotas.

Uma das alíquotas foi filtrada através de um cadinho filtrante de vidro sinterizado (porosidade 3, com diâmetro de 12,5 cm), obtendo-se 45 mL de filtrado, volume do qual se retirou uma alíquota de 5 mL.

Tal amostra foi filtrada sob vácuo em um cartucho de sílica (Sep-Pak Vac) por fase normal, de modo que os componentes polares fossem adsorvidas pelo recheio do cartucho. O cartucho foi lavado com 5 mL de hexano, para uma melhor eficiência da filtração, e o filtrado foi armazenado. Outra lavagem do cartucho foi efetuada com 10 mL de metanol, para retirada de substâncias polares que foram adsorvidas pela sílica do recheio, e este filtrado armazenado em outro tubo.

O restante da amostra inicial (40 mL) passou por um processo de saponificação com um volume igual a 10% de KOH (4g), e mantido durante a noite em temperatura ambiente no escuro. Repetiu-se o mesmo processo da filtração por cartucho de sílica da amostra anterior.

Obtendo:

Amostra I - (Crua / Apolar + Hex)

Amostra II – (Crua / Polar + MeOH)

Amostra III – (Saponificada / Apolar + Hex)

Amostra IV – (Saponificada / Polar + MeOH)

### 3.4. Análise por HPLC

As diferentes amostras foram separadas por frações e analisadas por método HPLC de fase reversa 150 mm, coluna C18 (Novapack), com um sistema gradiente de solvente que consistia em acetonitrila e metanol com um fluxo de 0,4mL/min e a temperatura da coluna é mantida a 25 °C. As identificações dos compostos poderão ser realizadas comparando com a média do tempo de retenção e com o auxílio de um espectro de massa, com referencia de valores relatados na literatura. Todas as substancias foram monitorizados a 230 nm com um detector UV-visível.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Análise por HPLC

As substancias obtidas a partir de algas verdes *Chlorella* produziu oito grandes picos na amostra crua e seis grandes picos na amostra saponificada e diversos menores, resolvidos com a separação de linha de base. A análise por HPLC de substancias das *Chlorella* foram separadas dentro de 26 min através de uma coluna C18 mostrando substancias que estavam disponíveis, podendo haver interferentes como mistura de outros gêneros de algas.

As Figuras 1 e 2 apresentam os cromatogramas gerados nas análises das amostras preparadas e as Tabelas 2 e 3 os dados experimentais resultantes de tais análises, suas médias ( $\bar{x}$ ) desvios padrão ( $\sigma$ ) e coeficientes de variação (CV).

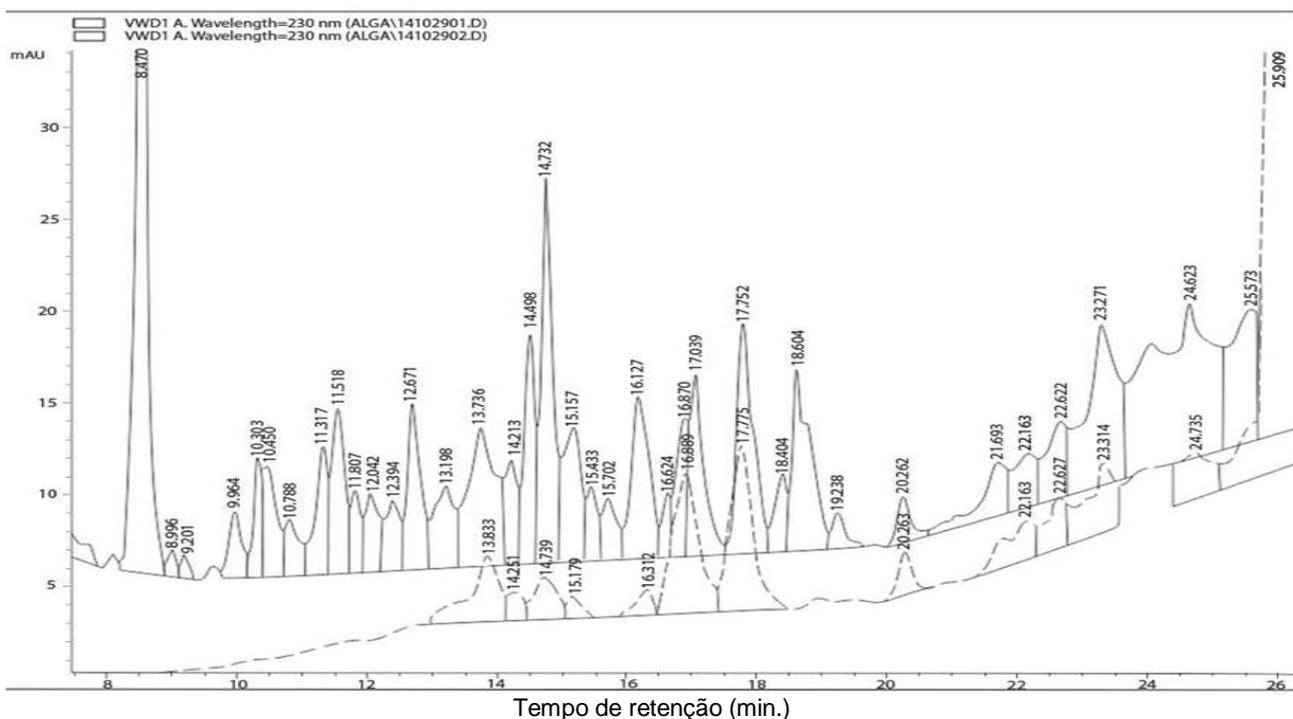


Figura 1. Perfil de HPLC da amostra crua (polar / MeOH) de *Chlorella*.

			$\bar{x}$ (min)	$\sigma$ (min)	CV (%)
PICO 1	13.833	13.736	13.785	0,07	0,51
PICO 2	14.739	14.732	14.736	$4,9 \cdot 10^{-3}$	0,03
PICO 3	16.889	16.870	16.880	$6,7 \cdot 10^{-3}$	0,04
PICO 4	17.775	17.752	17.764	0,02	0,11
PICO 5	20.263	20.262	20.263	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$
PICO 6	22.163	22.163	22.163	0	0
PICO 7	23.314	23.271	23.293	0,03	0,13
PICO 8	25.573	25.909	25.741	0,24	0,93

Tabela 2. Dados experimentais da análise por HPLC da amostra crua (polar) de *Chlorella*.

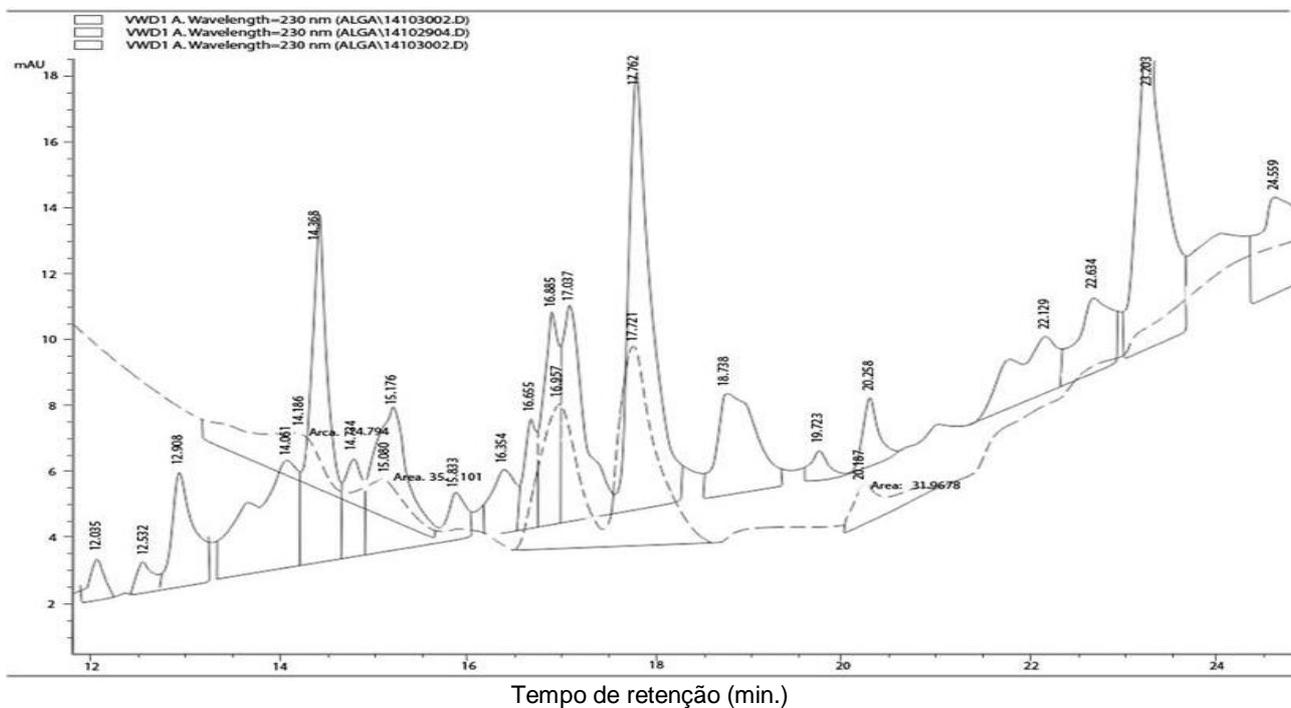


Figura 2. Perfil de HPLC da amostra saponificada (polar / apolar) de *Chlorella*.

	APOLAR	POLAR	$\bar{x}$ (min)	$\sigma$ (min)	CV (%)
PICO 1	14.061	14.368	14.215	0,22	1,55
PICO 2	14.734	15.176	14.955	0,11	0,74
PICO 3	16.957	16.885	16.921	0,03	0,18
PICO 4	17.721	17.762	17.742	0,03	0,17
PICO 5	20.187	20.258	20.223	0,04	0,20
PICO 6	25.687	25.896	25.792	0,15	0,58

Tabela 3. Dados experimentais da análise por HPLC da amostra saponificada (polar / apolar) de *Chlorella*.

## 5. Conclusão

Os resultados preliminares mostram que a microalga *Chlorella* apresenta uma grande variedade de compostos, cujos teores dependem de múltiplos fatores. Experimentalmente, isto pôde ser observado através de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), pela quantidade de picos observados nos cromatogramas, em diferentes e grandes variações do tempo de retenção. A etapa seguinte envolverá a identificação de alguns compostos de maior interesse, através de comparações com padrões conhecidos, tendo em vista que a quantidade de substâncias que podem ser obtidas das microalgas parece ser imprevisível.

## Referências

- JONES, J; MANNING, S; MONTOYA, M; KELLER, K; POENIE, M. Extraction of Algal Lipids and Their Analysis by HPLC and Mass Spectrometry. *J Am Oil Chem Soc.* v.89, p. 1371-1381, 2012.
- RENGARAJU, B; PALANISAMY, S; JAGANNATHAN, R; BOOTHALINGAM, R; SEENIVASAN, S; NS, V. Characterization of Algal Oil from *Chlorella* sp., and its growth optimization using Co-solvent systems. *Indian Journal of Sciences.* v.1(2), p.127-129, 2012.
- TANG, G; SUTER, P.M. Vitamin A, Nutrition, and Health Values of Algae: *Spirulina*, *Chlorella*, and *Dunaliella*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences.* v.1, p.111-118, 2011.
- YUSOF, Y.A; BASARI, J.M.H; MUKTI, N.A; SABUDDIN, R; MUDA, A.R; SULAIMAN, S; MAKPOL, S; NGAH, W.Z.W. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *African Journal of Biotechnology.* v.10(62), p.13536-13542, 2011.
- YOSHIHITO, SUMI, Y. Microalgae Pioneering the Future - Application and Utilization. *Science & Technol. Trends - Quarterly Review* 34, 9-21, *Science and Technology Foresight Center - NISTEP*, 2009.
- LI, Y; HORSMAN, M; WU, N; Q. LAN, CQ; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.* v.24, p.815-820, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v.25, p.294-306, 2007.
- DERNER, R.B; OHSE, S; VILLELA, M; CARVALHO, S.M; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural.* v.36, p.1959-1967, 2006.
- SPOLAORE, P; JOANNIS-CASSAN, C; DURAN, E; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Bioscience & Bioengineering.* v.101(2), p.87-96, 2006.
- OTLES, S. PIRE, R. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.* v.84, p.1708-1714, 2001.