

Padronização de método por HPLC-UV-ECD para identificação e quantificação de pigmentos em algas.

Thais Guaratini^{1*}(PG), Karina H. M. Cardozo¹(PG), Ernani Pinto²(PG), Pio Colepicolo¹(PQ).

thais@iq.usp.br

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química -USP, São Paulo-SP, Brazil.

² Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, São Paulo, SP, Brazil

Palavras Chave: HPLC-UV, detecção eletroquímica, carotenóides, clorofilas, padronização de método.

Introdução

Inúmeros são os desafios nas análises qualitativas e quantitativas de pigmentos^{1,2}. O presente trabalho tem como objetivo padronizar uma metodologia por HPLC acoplado ao detector ultravioleta (UV) e eletroquímico (ECD) para análise de 16 pigmentos em diferentes espécies de algas, bem como comparar os resultados obtidos em cada detector.

Resultados e Discussão

Os pigmentos foram separados (figura 1) utilizando-se uma coluna C30, que contribui para a separação de misturas complexas de carotenóides³ e detector de UV e ECD em série. A fase móvel utilizada foi: (A) metanol:água:tampão acetato 1mol/L pH 4,6 [90:8:2] e (B) metanol:MTBE:tampão acetato 1mol/L pH 4,6 [30:68:2], sendo que no caso do uso de ECD, a presença de eletrólitos se faz necessária. O gradiente de eluição consistiu em 0-15min? 5-10%B; 15-25min? 10%B; 25-35min? 10-15%B; 35-40min? 15-40%B; 40-42min? 40-45%B; 42-62min? 45%B; 62-63min? 45-100%B e 63-68min? 100%B, sendo injetados 50µL em cada análise, em fluxo de 1mL/min.

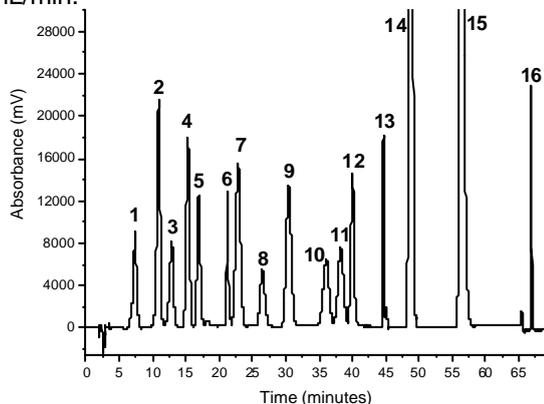


Figura 1. Cromatograma obtido pela injeção dos padrões dos pigmentos no método descrito acima, e analisados no UV, em 445nm. Picos: 1-peridina; 2-fucoxantina; 3-neoxantina; 4-prasinoxantina; 5-violaxantina; 6-astaxantina; 7-diadinoxantina; 8-anteraxantina; 9-aloxantina; 10-diatoxantina; 11-luteína;

12-zeaxantina; 13-cantaxantina; 14-clorofila b; 15-clorofila a; 16-β-caroteno.

Os fatores de retenção e separação foram calculados, obtendo-se valores aceitáveis. Para avaliar os melhores potenciais de análise no ECD, voltamogramas hidrodinâmicos de cada substância foram obtidos variando-se os potenciais a cada corrida. Para a quantificação dos pigmentos nas algas, curvas analíticas foram construídas com os resultados obtidos em ambos os detectores. Também foram calculados precisão e exatidão, e com esses resultados foi possível afirmar que o método foi mais preciso e exato quando utilizou-se o detector UV. Apesar do ECD ser geralmente mais sensível, este grupo de moléculas apresenta grande absorção no UV, decorrente da extensa cadeia de duplas ligações conjugadas, o que explica a maior sensibilidade quando utilizado o UV como detector. Além disso, o ECD é muito sensível a variações na fase móvel, principalmente quando voltagens mais altas são aplicadas⁴.

Com o método padronizado, 6 espécies de algas (*Prorocentrum minimum*, *Minutocellus polymorphus*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis gracilis* Hillea sp e *Synechococcus lividus*), foram extraídas e seus pigmentos analisados, obtendo-se resultados condizentes a cada classe estudada.

Conclusões

Neste trabalho foi padronizado um método para separação de 16 pigmentos, entre clorofilas e carotenóides, tanto por detecção UV quanto ECD. Os detectores foram comparados e observou-se que para este grupo de substâncias, o de UV é mais sensível que o ECD. Porém, o uso de UV e ECD em série fornece maiores informações qualitativas. Além disso, o método desenvolvido foi eficiente na separação e identificação de pigmentos de diferentes classes de algas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, CAPES, CNPq.

¹Colyer, C.L., et al. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 559.

²Cardozo, K.H.M., *et al. Biol. Rhythm Res.* **2002**, 33, 371.

³Sander, K.E. *et al. J. Chromatog. A*, **2000**, 880, 189.

⁴JWang, J. *Electroanalysis*, **2005**, 17, 1133.