

# Validação de metodologia para determinação de ácidos carboxílicos em cultivos de microalgas por cromatografia a líquido em fase reversa

Maurício Tiba<sup>\*1</sup> (PG), Marilda Rigobello-Masini<sup>1</sup> (PQ), Jorge Cesar Masini<sup>1</sup> (PQ).

e-mail: \*tiba@usp.br

<sup>1</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes n° 748, CEP: 05508-900, São Paulo, SP.

Palavras Chave: validação, fitoplancton, metabólitos, ácidos carboxílicos

## Introdução

O fitoplancton marinho é responsável por 40% de toda fotossíntese planetária sendo, portanto, importante sorvedouro de CO<sub>2</sub> atmosférico. Os estudos sobre assimilação e seqüestro de carbono oferecem subsídios para a compreensão dos fenômenos em questão e sugerem ações mitigadoras para o problema do efeito estufa. O processo fotossintético e outras rotas bioquímicas correlatas podem ser acompanhados através das variações de concentrações, tanto no meio de cultivo quanto no fitoplancton, de níveis de alguns metabolitos, tais como ácidos orgânicos. Estes resultados podem ser usados em conjunto com outros parâmetros fisiológicos, como a fluorescência da fotossíntese e dados enzimológicos, fornecendo, assim, um mapa mais completo do funcionamento do processo.<sup>1</sup> O presente trabalho apresenta a validação de método de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa para determinar os ácidos β OH pirúvico, glicólico, málico, α cetoglutárico e fumárico, que são alguns dos ácidos orgânicos de interesse no estudo do processo de assimilação de carbono pelo fitoplancton marinho.

## Resultados e Discussão

Usou-se um cromatógrafo Shimadzu modelo LC 9A, duas colunas em série: Synergy 4u Fusion – RP 80 A (250 x 4,60 mm e 150 x 4,60 mm), 4 micron; a fase móvel aquosa 93% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, 7% metanol; pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico, fluxo de 0,8 ml min<sup>-1</sup>, detector Shimadzu SPD-6AV UV-VIS (210 nm), volume de amostra de 20 μL. A Figura 1 mostra um cromatograma típico.

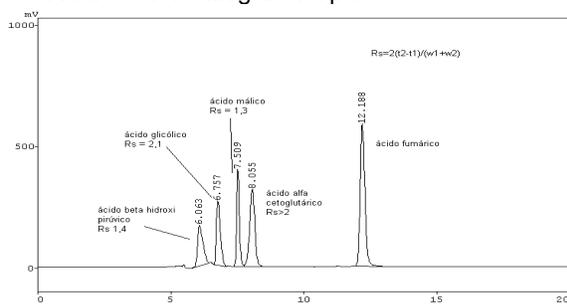


Figura 1. Cromatograma dos padrões dos cinco ácidos carboxílicos.

32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

**Tabela 1.** Parâmetros de validação estudados: t<sub>R</sub> - tempo de retenção (n = 6, com 3 repetições e intervalo de confiança de 95%); curva analítica com 6 níveis de concentração (20 – 90 mg L<sup>-1</sup>); coeficientes de correlação (R) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Compostos	Tempo de Retenção		Coeficiente linear		Inclinação da reta (L/mg)	R <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
	t <sub>R</sub> (min)	Incerteza	Valor	DP				
Ácido β OH Pirúvico	6,053	0,014	23799	5583	2317	0,994	7,2	24,1
Ácido Glicólico	6,739	0,008	3615	812	663	0,996	3,7	12,2
Ácido Málico	7,479	0,022	6068	1375	889	0,995	4,6	15,5
Ácido α Cetoglutárico	8,018	0,024	19014	4508	3365	0,995	4,0	13,4
Ácido Fumárico	12,046	0,034	188070	25778	37916	0,996	2,0	6,8

## Conclusões

O método avaliado é seletivo para os compostos analisados, a resolução R<sub>s</sub> apresentou valores adequados (R<sub>s</sub> ≈ 1,5 ou superiores); os coeficientes de correlação “R<sup>2</sup>” indicam linearidade suficiente (de acordo com os parâmetros de validação da ANVISA e do INMETRO, r ≥ 0,99); a faixa linear dinâmica é aceitável. A repetitividade está adequada, assim como a precisão instrumental, a qual deve ser avaliada periodicamente. Os valores de LD e LQ estão de acordo com a literatura<sup>2</sup>; a exatidão, avaliada por estudos de adição e recuperação, indica taxas de recuperação de 85 – 113% na faixa de resposta linear.

## Agradecimentos

CNPq, FAPESP, CAPES

<sup>1</sup>Rigobello-Masini, M.; Masini J. C.; Aidar, E. *FEMS Microbiol Ecol.* **2006**, *57*, 18.

<sup>2</sup>Leboulanger, C.; Descolas-Gros, C.; Jupin, H. *J. Plankton Res.* **1994**, *16*, 897.