

Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC) aplicada na separação de ácidos orgânicos presentes em cultivos de microalgas

Marilda Rigobello-Masini*,¹ (PQ), José Carlos P. Penteadó¹ (PQ), Maurício Tiba (PG), Jorge C. Masini¹ (PQ) rmmarilda@gmail.com

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513- 970, São Paulo, SP

Palavras Chave: assimilação de carbono, metabolismo, ácidos orgânicos, interação hidrofílica.

Introdução

Cromatografia líquida de alta eficiência por interação hidrofílica (HILIC) tem se mostrado uma técnica promissora para separação de compostos polares envolvidos em processos metabólicos.¹ Algumas fases estacionárias usadas em HILIC apresentam sílica porosa como suporte, sendo esta modificada com grupos funcionais polares tais como sulfo alquil betaína (Figura 1). Essa característica faz com que os mecanismos de separação sejam dependentes da partição do analito por interação iônica com os grupos funcionais. Assim, quanto maior a polaridade do soluto, maior é sua retenção em relação a uma fase móvel predominantemente orgânica, com concentrações de acetonitrila (ACN) $\geq 60\%$ (v v⁻¹).

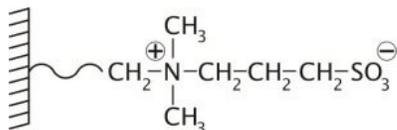


Figura 1. Grupo funcional da coluna ZIC⁺-HILIC.

No presente trabalho foi utilizada a coluna ZIC⁺-HILIC de 250 x 4,6 mm, 5 μ m, 200Å em PEEK da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) para estudos dos ácidos orgânicos: glicérico, oxalacético, pirúvico, β -hidróxi-pirúvico, glicólico, α -cetoglutárico, fumárico, málico, cítrico, isocítrico, 3-fosfoglicérico e fosfoenolpiruvico. Os estudos foram realizados em um cromatógrafo Shimadzu LC9A (Japão) com o detector UV (220 nm). As separações foram realizadas com fase móvel constituída por 70 % (v v⁻¹) acetonitrila (ACN) em tampão acetato de amônio (NH₄Ac) 20 mmol L⁻¹ (pH 6,8) no modo isocrático e vazão de 0,50 mL min⁻¹.

Resultados e Discussão

A fração de solvente orgânico na fase móvel foi a variável mais significativa na retenção dos ácidos orgânicos. Como exemplo pode-se mencionar que o aumento de 70 para 72,5% (v v⁻¹) de ACN na fase móvel aumentou o tempo de retenção do ácido mais retido (fosfoenolpiruvico) de 24,6 para 48 min. A vazão da fase móvel também foi importante, pois um pequeno aumento de 0,50 para 0,70 ml min⁻¹ proporcionou perda de resolução cromatográfica na

separação dos ácidos málico e fumárico. A menor altura de prato teórico é obtida com vazões entre 0,3 e 0,5 mL min⁻¹.² A Figura 2 mostra um típico cromatograma da mistura de ácidos.

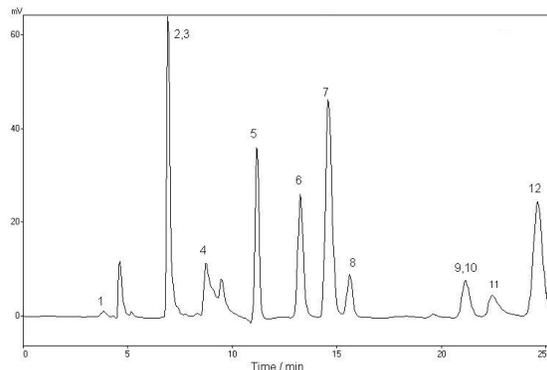


Figura 2. Cromatograma de uma mistura dos ácidos: (1) glicérico, (2,3) oxalacético e pirúvico, (4) β hidroxipirúvico, (5) glicólico, (6) α cetoglutárico, (7) fumárico, (8) málico, (9,10) cítrico e isocítrico, (11) 3-fosfoglicérico and (12) fosfoenolpirúvico obtido a 0,50 mL min⁻¹, volume de amostra de 20 μ L e fase móvel composta por 70 % (v v⁻¹) de ACN em NH₄Ac 20 mmol L⁻¹ (pH 6.8).

Os limites de detecção variaram entre 2,0 μ mol L⁻¹ para o ácido fumárico e 1,0 mmol L⁻¹ para o ácido glicólico. A metodologia foi aplicada em estudos fisiológicos relacionados à assimilação de carbono inorgânico pelas microalgas marinhas *Tetraselmis gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*. O ácido glicólico, que é o metabolito mais importante para avaliação do processo de fotorrespiração das algas, foi determinado, sendo que sua concentração no meio de cultivo aumentou nos cultivos que eram borbulhados com nitrogênio gasoso, quando comparados a cultivos aerados com ar atmosférico.

Conclusões

HILIC se mostrou promissora na separação e quantificação de ácidos orgânicos relacionados ao metabolismo de assimilação de carbono, permitindo determinar ácido glicólico nos meios de cultivo.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP

¹ Hemstrom, P.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1784.

² Guo, Y.; Srinivasan, S.; Gaiki, S. *Chromatographia* **2007**, *66*, 223.