

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Raquel Guidetti Vendruscolo

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE METABÓLITOS MICROALGAIS EMPREGANDO
CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA**

Santa Maria, RS
2016

Raquel Guidetti Vendruscolo

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
METABÓLITOS MICROALGAIS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof Dr. Roger Wagner

Santa Maria, RS
2016

Raquel Guidetti Vendruscolo

**VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE
METABÓLITOS MICROALGAIS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2016:

Roger Wagner, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Eduardo Jacob-Lopes, Dr. (UFSM)

Sergio Roberto Mortari, Dr. (Unifra)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria – UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pelo aprendizado, possibilitando a minha titulação.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Prof Dr. Roger Wagner, pela orientação desde minha iniciação científica, por sua paciência, dedicação, disponibilidade e confiança em meu trabalho. Obrigada pelos conhecimentos que me foram transmitidos durante este período e por despertar meu interesse pela análise de alimentos e pela cromatografia.

Ao Prof Dr. Eduardo Jacob-Lopes, pelo fornecimento das amostras e principalmente, pela disponibilidade, aprendizados e auxílio na elaboração deste trabalho.

Aos demais professores do Núcleo de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (NTA), Juliano, Leila, Alexandre e Cristiano, pelos ensinamentos e empréstimo de equipamentos, sem os quais não seria possível a execução deste trabalho.

Ao Prof Dr. Sergio Mortari por ter aceito o convite para participar da banca avaliadora.

Ao meu colega e amigo Matheus Rafael Raschen (*in memoriam*) pela amizade, companheirismo e muito aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, Mari, Tassi, Jossiê, Tefa e Bruna K., pelo companheirismo, troca de conhecimentos e auxílio sempre que necessário.

Às minhas colegas e amigas, Bruna T., Dani, Mari M. e Mari B., pelo apoio, auxílio, aprendizados, amizade, conversas e demais momentos de descontração.

À todos colegas de NTA pela ótima convivência, auxílio e disponibilidade.

À minha família, por todos esses anos de dedicação, amor, confiança e por apoiar, sempre, minhas decisões.

Ao meu namorado Lucas, pela compreensão, amor, motivação e apoio, por estar lado a lado compartilhando dos momentos difíceis e também por proporcionar momentos únicos, de extrema alegria.

A todos que de alguma maneira, colaboraram para realização deste trabalho.

À Deus por ter me guiado e iluminado meus caminhos.

Muito obrigada!

RESUMO

VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS MICROALGAIS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

AUTORA: Raquel Guidetti Vendruscolo

ORIENTADOR: Roger Wagner

O estudo do metabolismo, a partir da determinação de metabólitos, está assumindo elevada importância no cenário científico biológico, pois possibilita o conhecimento ou até mesmo o entendimento de como e porque são modificadas pelo meio as rotas existentes em matrizes biológicas. As microalgas são organismos unicelulares procariontes ou eucariontes com capacidade fotossintética, apresentam requisitos relativamente simples para o crescimento e elevado potencial para síntese de produtos de interesse tecnológico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de extração simultânea da fração apolar (ácidos graxos) e polar (aminoácidos e ácidos orgânicos) do conteúdo intracelular de microalgas, empregando a cromatografia em fase gasosa (GC) como ferramenta analítica de análise. Os compostos foram extraídos pelo método de Bligh e Dyer com redução no volume de solventes orgânicos e diferentes formas de agitação e/ou ruptura celular. Os compostos apolares foram derivatizados segundo Hartman e Lago (1973). A derivatização dos compostos polares foi realizada de acordo com Oms-Oliu et al. (2011) e validada para a amostra biomassa microalgal quanto a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Então, foram analisadas duas clorofíceas, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* e duas cianobactérias, *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Phormidium autumnale*. Foram detectados onze ácidos graxos, dez aminoácidos, e três ácidos orgânicos entre as espécies. Os ácidos succínico, málico e cítrico, importantes intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), a partir do qual são formados produtos microalgais de interesse. Dentre os aminoácidos, o ácido glutâmico foi o composto majoritário em todas espécies. Com exceção da *S. obliquus*, as microalgas apresentaram perfil de ácidos graxos (AG) majoritariamente de cadeia carbônica saturada. Posteriormente, foram caracterizados os ácidos orgânicos, os aminoácidos e os ácidos graxos ao longo do crescimento da microalga *S. obliquus* cultivada fotossinteticamente com iluminação constante. O ácido succínico apresentou concentrações constantes a partir das 120 h de cultivo, enquanto os ácidos málico e cítrico tiveram aumento significativo de concentração às 336 h. Com exceção da alanina, ácido glutâmico e asparagina que apresentaram ápice em 336 h, as maiores concentrações aminoácidos foram observadas entre 120 e 288 h. O perfil de ácidos graxos apresentou mudança significativa entre as análises de 0 e 120 h. Primeiramente o cultivo foi caracterizado pela elevada concentração de AG saturados e compostos de cadeia curta e média, a partir de 120 h foi detectado maior concentração de AG insaturados e de cadeia longa (≥ 20 carbonos). Em face disso, foi possível estabelecer relação entre vias biossintéticas das microalgas.

Palavras-chave: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, derivatização.

ABSTRACT

VALIDATION AND APPLICATION METHOD FOR MICROALGAE METABOLITES DETERMINATION USING GAS CHROMATOGRAPHY

AUTHOR: Raquel Guidetti Vendruscolo

ADVISOR: Roger Wagner

The study of metabolism through the metabolites determination is assuming great importance in biological scientific scene, once it allows the knowledge or even understanding of how and why they are modified by existing routes in biological matrices. Microalgae are unicellular organisms prokaryotes or eukaryotes with photosynthetic capacity, that presents relatively simple requirements for growth and high potential to technological interest products synthesis. Thus, the aim of this study was to develop a simultaneous extraction method of non-polar fraction (fatty acids) and polar (amino acids and organic acids) in microalgae intracellular content, employing gas chromatography (GC) as analytical analysis tool. The compounds were extracted by Bligh e Dyer method with reducing the volume organic solvents and different forms of agitation and/or cell disruption. The non-polar compounds were derivatized by Hatman e Lago method. The derivatization of polar compounds was performed according to Oms-oliu and validated for microalgae biomass sample, considering selectivity, linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy. Then, were analyzed two chlorophytes, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* and two cyanobacteria, *Aphanothece microscopica Nægeli* and *Phormidium autumnale*. Eleven fatty acids, ten amino acids and three organic acids were detected between the species. The succinic, malic and citric acids, important intermediates from tricarboxylic acid cycle (TCA), from which are formed microalgae products of interest. Among the amino acids, the glutamic acid was the major compound in all species. Excepting the *S. obliquus*, the microalgae showed fatty acid profile mostly with saturated carbon chain. Posteriorly, the organic acids, amino acids and fatty acids were characterized during growth of *S. obliquus* microalgae cultivated photosynthetically with constant lighting. The succinic acid showed constant concentrations after 120 h of cultivation, while malic and citric acids had a significantly higher concentration to 336 h. Excepting the alanine, glutamic acid and asparagine, which showed peak in 336 h, the highest concentrations of amino acids were observed between 120 and 288 h. The fatty acid profile showed significant change between analysis of 0 to 120 h. Firstly the cultivation was characterized by the high concentration of saturated FA and short and medium chain compounds. After 120 h was detected higher concentration of unsaturated AG and long-chain (≥ 20 carbons). In this regard, it was possible establish relationship between microalgae biosynthetic pathways.

Keywords: amino acids, organic acids, fatty acids, derivatization.

LISTA DE ABREVIATURAS

BF₃	Trifluoreto de boro (do inglês <i>Boron trifluoride</i>)
BSA	N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (do inglês <i>N,Obis(trimethylsilyl)acetamide</i>)
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (do inglês <i>N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide</i>)
CE	Eletroforese capilar (do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>)
DIMS	Infusão direta por espectrometria de massas (do inglês <i>Direct-Infusion Mass Spectrometry</i>)
DMOX	4,4-dimetil-2-oxazolina (do inglês <i>4,4-dimethyl-2-oxazoline</i>)
DMS	Sulfato de dimetila (do inglês <i>Dimethyl Sulphate</i>)
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês <i>Fatty Acids Methyl Esters</i>)
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
HFBA	Anidrido heptafluorobutírico (do inglês <i>Heptafluorobutyric Anhydride</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>Limit of Quantitation</i>)
MS	Espectrômetro de massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (do inglês <i>N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide</i>)
MTBSTFA	N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (do inglês <i>N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide</i>)
MTPA	Ácido α -metoxi- α -trifluorometil fenil acético (do inglês <i>α-methoxy-α-trifluoromethyl phenyl acetic acid</i>)
NMR	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PFBBr	Brometo de pentafluorbenzila (do inglês <i>Pentafluorobenzyl Bromide</i>)
PFPA	Anidrido pentafluoropropiónico (do inglês <i>Pentafluoropropionic Anhydride</i>)
TFAA	Anidrido trifluoroacético (do inglês <i>Trifluoroacetic Anhydride</i>)
TMCS	Trimetilclorosilano (do inglês <i>Trimethylchlorosilane</i>)
TMS	Trimetilsilil (do inglês <i>Trimethylsilyl</i>)
TMSH	Hidróxido de trimetilsulfônio (do inglês <i>Trimethylsulfonium Hydroxide</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 ESTUDO DOS METABÓLITOS	10
2.2 MICROALGAS	12
2.3 METABÓLITOS MICROALGAIS	12
2.3.1 Lipídios	13
2.3.2 Aminoácidos	13
2.3.3 Ácidos orgânicos	14
2.4 DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS MICROALGAIS	15
2.4.1 Extração dos metabólitos por partição em solventes imiscíveis	15
2.4.2 Análise dos metabólitos por cromatografia em fase gasosa	16
2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	18
2.5.1 Seletividade	19
2.5.2 Linearidade	19
2.5.3 Sensibilidade	20
2.5.4 Intervalo (faixa linear)	20
2.5.5 Precisão	21
2.5.6 Limite de Detecção (LOD)	22
2.5.7 Limite de Quantificação (LOQ)	23
2.5.8 Exatidão	23
2.5.9 Robustez	24
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	25
Manuscrito 1	25
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS INTRACELULARES DE MICROALGAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC)	25
Manuscrito 2	43
CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DA MICROALGA <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> CULTIVADA EM FOTOBIOREATOR	43
4 CONCLUSÃO GERAL	57
5 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos são compostos orgânicos ou inorgânicos pertencentes as mais diversas classes químicas e apresentam relação direta com as vias bioquímicas que correm durante o metabolismo de sistemas biológicos (HU e XU, 2013). Assim, o estudo do metabolismo, a partir da determinação destes metabólitos, está assumindo elevada importância no cenário científico biológico, pois possibilita o conhecimento ou até mesmo o entendimento das rotas existentes em determinada matriz biológica (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

As microalgas são organismos unicelulares procariontes ou eucariontes com capacidade fotossintética, apresentam requisitos relativamente simples para o crescimento e elevado potencial para síntese de produtos de interesse tecnológico (WANG et al., 2013). Pigmentos, compostos bioativos (toxinas, antibióticos, antioxidantes), proteínas e lipídios são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da biotecnologia microalgal (BOROWITZKA, 2013). Entretanto, existem poucos trabalhos abordando ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos como metabólitos precursores ou intermediários da síntese dos produtos citados e sua caracterização poderia vir a auxiliar na elucidação das rotas desenvolvidas pelas microalgas em dada condição de cultivo (IBÁÑEZ et al., 2013).

Para a determinação dos metabólitos microalgais eles devem ser, primeiramente, extraídos por um método que possibilite a ruptura da parede celular (HALIM et al., 2012). Normalmente, extrações desta natureza são realizadas por solventes orgânicos ou uma mistura deles. No entanto, a crescente preocupação ambiental requer que haja a redução ou até mesmo a eliminação destes solventes na execução de métodos analíticos (PIZZUTTI et al., 2009). Neste sentido, métodos de extração assistidos por ultrassom estão sendo aplicados, visto que é possível manter ou maximizar a eficiência de extração com o emprego de um menor volume de solventes orgânicos (GRIMI et al., 2014).

Tradicionalmente, ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos são determinados por métodos cromatográficos, eletroforéticos e espectrofotométricos (DULF et al., 2006; CALLEJÓN, TRONCOSO, MORALES, 2010; CHRISTOU et al., 2014). Com exceção dos ácidos graxos, a cromatografia em fase gasosa (GC) é pouco usual na determinação destes metabólitos e surge como uma alternativa por apresentar alto poder de resolução e sensibilidade (KOEK et al., 2006). Na maioria das vezes, ela não é preferida para análises de compostos polares pela necessidade de um processo de derivatização anterior a análise (PASIKANTI, HO, CHAN, 2008).

As principais reações de derivatização aplicadas a estas substâncias envolvem reações de silição isoladas ou em combinação com reações de oximação (LEE et al., 2010; OMS-OLIU et al., 2011; HURTADO- FERNÁNDEZ et al., 2014). Uma vasta gama de substâncias derivatizantes estão disponíveis e são capazes de gerar derivados estáveis e voláteis, permitindo a análise por GC (KLOOS et al., 2011). A utilização desta técnica irá possibilitar realização de análises com alta resolução aliadas a baixo custo e tempo de execução inferior a de outras técnicas utilizadas para a determinação desses compostos polares (MANDALAKIS, APOSTOLAKI, STEPHANOU, 2010).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTUDO DOS METABÓLITOS

Metabólitos são compostos orgânicos ou inorgânicos, produtos finais ou subprodutos das inúmeras vias de biossíntese e catabolismo existentes em sistemas biológicos (DEBERARDINIS e THOMPSON, 2012). O número de metabólitos presente depende do organismo e o tipo de amostra que se está trabalhando (ALMSTETTER, OEFNER, DETTMER, 2012). Bactérias procariontes, por exemplo, contém cerca de 750 metabólitos, enquanto eucariontes variam de 1100 em leveduras até milhares em seres humanos e dezenas ou centenas de milhares em determinadas espécies de plantas (GOODACRE, 2007).

Atualmente várias técnicas analíticas estão sendo aplicadas para a análise de uma grande variedade de metabólitos. Dependendo da amostra, das abordagens analíticas e do desempenho analítico requerido (limite de detecção, precisão, exatidão) surgem diferentes demandas de análise (Quadro 1) (KOEK et al., 2011).

A terminologia na pesquisa metabólica ainda não é padronizada e diferentes definições dos termos podem ser encontradas. As análises de metabólito alvo e perfil metabólico são comumente aplicadas em pesquisas quando existe uma hipótese, em que o interesse está focado em um número limitado de metabólitos ou uma certa classe de compostos ou via metabólica. Devido ao pré-tratamento seletivo da amostra, baixos limites de detecção e alta exatidão e precisão podem ser alcançados. Para a rápida verificação e classificação das amostras, a identificação e quantificação de cada metabólito nem sempre é necessária, o que é abordado pelas análises de “fingerprint” metabólico e metabolômica (KOEK et al., 2011).

A metabolômica é uma análise não- alvo, abrange todos ou maior número possível de metabólitos presentes em um sistema biológico, pode fornecer informações sobre a

concentração absoluta de todos compostos extraídos da amostra (ALMSTETTER, OEFNER, DETTMER, 2012). Entretanto, devido a limitações de ordem prática, como a ausência de materiais de referência, os metabólitos são quantificados utilizando a quantificação relativa, isto é, determinar a relação entre a resposta do composto e um padrão interno (MOUNICOU, SZPUNAR, LOBINSKI, 2009).

Quadro 1. Abordagens analíticas para estudo de metabólitos.

Análise de metabólito alvo	Análise quantitativa (absoluta ou relativa) de um ou alguns metabólitos alvo. Estratégia típica: pré-tratamento da amostra seguida por separação seletiva (GC, LC, CE) acoplado a detecção sensível e seletiva.
Caracterização metabólica	Análise quantitativa (absoluta ou relativa) e qualitativa (identificação) multicomponente que define ou descreve padrões metabólicos para um grupo de metabólitos, que sejam metabolicamente ou analiticamente relacionados. Estratégia típica: pré-tratamento seletivo da amostra para uma classe de compostos ou compostos de uma via metabólica comum, seguido da separação acoplada a detecção MS.
"Fingerprinting" metabólico	Fornecer a classificação da amostra. Normalmente, não há quantificação (ou apenas a quantificação relativa) e sem a identificação individual de metabólitos. Estratégia típica: pré-tratamento simples de amostra, seguido de NMR, FTIR ou espectrometria de massas por infusão direta (DIMS).
Metabolômica	Análise quantitativa (principalmente quantificação relativa) e qualitativa do conteúdo completo de metabólitos presentes em um sistema biológico. Estratégia típica: pré-tratamento de amostra genérico seguido de separação acoplada a detecção MS.

Fonte: modificado de Koek et al., 2011.

O desenvolvimento de metodologias para metabolômica apresenta certa dificuldade devido à complexidade do metaboloma, que é formado por diferentes classes de compostos presentes em uma ampla faixa de concentração (ALMSTETTER, OEFNER, DETTMER, 2012). Atualmente, as principais técnicas analíticas utilizadas para análise do metaboloma são a NMR e técnicas combinadas, como a GC e a LC acopladas a MS, além da CE acoplada a MS (DIETERLE et al., 2011). Essas técnicas são, geralmente, preferidas para análise do metaboloma, pois permitem a quantificação e identificação de um grande número de metabólitos (KOEK et al., 2011).

Metabólitos voláteis, de baixo peso molecular podem ser analisados diretamente por GC, porém muitos dos metabólitos presentes em um sistema biológico contêm grupos funcionais polares e são termicamente instáveis à temperatura necessária para sua separação ou não são suficientemente voláteis (LEE et al., 2013). Portanto, é necessária uma transformação desses compostos antes da análise por GC, onde a maioria dos métodos utilizados depende de uma derivatização com um reagente de oximação seguido por siliilação

ou somente sililação. Os agentes sililantes são os reagentes de derivatização mais versáteis e aplicáveis universalmente, sendo os mais adequados para análise por GC, poucos trabalhos utilizam outras derivatizações para aplicação desta técnica (KOEK et al., 2011).

2.2 MICROALGAS

Primeiramente, os estudos relacionados aos metabólitos em sistemas biológicos se concentraram em bactérias e mamíferos devido a importância das informações obtidas para saúde humana e suas aplicações no âmbito biomédico (ARAPITSAS et al., 2015). No entanto, outros sistemas menos comuns ou conhecidos também foram sendo gradualmente incluídos nos estudos ômicos, como as microalgas. A maioria das análises metabólicas de microalgas está focada na quantificação e identificação de metabólitos secundários que apresentem valor econômico. A metabolômica também está sendo aplicada em estudos ambientais a fim de verificar a resposta metabólica das microalgas a estímulos ambientais ou fontes de estresse (JAMERS, BLUST, COEN, 2008).

Microalgas são microrganismos unicelulares procariontes ou eucariontes, sendo as organelas as principais responsáveis por esta diferenciação. Procariontes não possuem cloroplastos, mitocôndrias e núcleo. Dependendo da espécie, as microalgas podem se desenvolver nos mais diversos ambientes, água doce, água salobra e águas residuais (RASHID, 2014). Estes micro-organismos apresentam versatilidade no que se refere a manutenção de suas estruturas, usufruindo de diferentes metabolismos energéticos, fotossintético, heterotrófico e fixação nitrogênio (MORALES-SÁNCHEZ et al., 2014).

As microalgas são a base da cadeia alimentar, componentes críticos em muitos habitats e são grandes produtores de oxigênio, além de apresentarem grande importância comercial na indústria de alimentos, farmacêutica e aquicultura como fonte natural de produtos de alto valor agregado (JAMERS, BLUST, COEN, 2008). Ácidos graxos, esteroides, carotenoides, polissacarídeos, enzimas e toxinas estão entre os bioprodutos de origem microalgal com maior aplicação industrial. Além de sua utilização para produção de biocombustíveis, tratamento de águas residuais e absorção de CO₂ (KOLLER, MUHR, BRAUNEGG, 2014).

2.3 METABÓLITOS MICROALGAIS

O estudo dos metabólitos de sistemas biológicos tem se mostrado uma ferramenta eficaz para a caracterização das vias metabólicas que ocorrem em determinadas condições

ambientais (WU et al., 2009). Assim, ao se ter conhecimento e entendimento das vias metabólicas responsáveis pela produção dos metabólitos de interesse é possível modificar ou intensificar condições em que o sistema biológico se encontra a fim de maximizar a biossíntese desses produtos (OMS-OLIU et al., 2011).

2.3.1 Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos de origem biológica, solúveis em solventes orgânicos não polares e geralmente insolúveis em água (AFANAS'ÉVA et al., 2011). Os triacilgliceróis, ácidos graxos esterificados com glicerol, são os constituintes majoritários dos lipídios, enquanto os minoritários são mono e diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfatídeos, esteróis e vitaminas lipossolúveis (ASIF, 2011)

Nos sistemas biológicos, os lipídios desempenham funções únicas, como formação de membranas celulares, estabilização das proteínas ligadas a membrana, reserva energética, principalmente na forma de triacilgliceróis, além de serem, juntamente com seus derivados, moléculas biologicamente ativas (hormônios, vitaminas) (AHMED et al., 2015).

Várias espécies de microalgas apresentam a capacidade de acumular lipídios na forma de triacilgliceróis (KUMAR e SHARMA, 2014). Através de manipulações simples nas propriedades físicas e químicas do seu meio de cultura elas são induzidas a produzir quantidades substanciais destes compostos (20 a 50% em peso seco) com diferentes composições em ácidos graxos (ARAUJO et al., 2013).

As microalgas são, teoricamente, capazes de produzir mais lipídios do que qualquer fonte convencional, assim se apresentam como potenciais fontes para produção de biodiesel. Entretanto, os lipídios obtidos de biomassa microalgal são ricos em ácidos graxos ômega-3 de cadeia longa, como EPA e DHA, que podem ser utilizados na tanto na alimentação humana quanto animal (RYCKEBOSCK, MUYLAERT, FOUBERT, 2012).

2.3.2 Aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas, macromoléculas biológicas mais abundantes. Os 20 aminoácidos primários que compõe as proteínas são α -aminoácidos, possuem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (carbono α). Eles diferem entre si apenas por sua cadeia lateral, a qual é responsável pela sua função e propriedades bioquímicas (LEHNINGER, NELSON, COX, 2006).

Com base no balanço de nitrogênio necessário para a dieta, os aminoácidos foram classificados como essenciais e não essenciais para seres humanos e animais. Os aminoácidos essenciais são definidos como os que não sintetizados ou adequadamente sintetizados pelo corpo, por isso devem ser fornecidos pela dieta para atender os requisitos ideais (WU, 2010).

Além de atuarem como blocos de construção das proteínas e polipeptídios, os aminoácidos na sua forma livre são compostos biologicamente ativos, essenciais para manutenção do metabolismo, crescimento, reprodução, funções imunológicas e também funções específicas no sistema nervoso central (EGYDIO et al., 2012). Estes compostos, chamados aminoácidos funcionais, incluem arginina, cisteína, glutamina, leucina, prolina, triptofano (WU, 2009).

As proteínas são um dos compostos orgânicos majoritários que constituem as microalgas e sua composição em aminoácidos essenciais é o principal fator da qualidade proteica da biomassa microalgal. Algumas espécies de microalgas apresentam elevado potencial para produção de aminoácidos essenciais, superando percentuais extraídos da soja (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013), o que aumenta o interesse no isolamento e caracterização dos aminoácidos de microalgas para aplicações farmacológicas e nutracêuticas (SAMARAKOON e JEON, 2012).

2.3.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos carboxílicos são os ácidos orgânicos mais comuns, cuja acidez está associada a presença de um ou mais grupamentos carboxilo (-COOH) (SHAIKH e QURESHI, 2013). Em meio aquoso são ácidos fracos e apresentam elevados pontos de ebulição devido a facilidade de formarem interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio (LOPEZ-BUCIO et al., 2000).

Os ácidos orgânicos foram os primeiros compostos a serem explorados pela biotecnologia. Atualmente, devido à crescente demanda por compostos de origem biosintética houve um aumento na diversidade de ácidos orgânicos com aplicação industrial (BECKER et al., 2015). Além dos usos tradicionais na alimentação animal e humana, os ácidos orgânicos estão sendo utilizados como blocos de construção química e polímeros biodegradáveis em substituição a produtos químicos sintéticos à base de petróleo (YANG, LÜBECK, LÜBECK, 2014).

As microalgas são organismos promissores para produção de compostos orgânicos de cadeia curta, como álcoois e ácidos orgânicos (WIJFFELS, KRUSE, HELLINGWERF,

2013). Estes ácidos apresentam importância fundamental a nível celular para várias vias metabólicas desempenhadas pelas microalgas, incluindo produção de energia e formação de precursores da biossíntese de compostos como aminoácidos e ácidos graxos (KLOOS et al., 2014).

2.4 DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS MICROALGAIS

2.4.1 Extração dos metabólitos por partição em solventes imiscíveis

Os constituintes intracelulares de microalgas são comumente extraídos com solventes orgânicos, benzeno, hexano, acetona e clorofórmio. Para que uma extração por solventes seja considerada eficiente é necessária a utilização de uma substância com capacidade de penetrar totalmente a amostra e solubilizar os componentes de interesse. Para facilitar o contato destes solventes orgânicos com o conteúdo intracelular podem ser aplicados pré-tratamentos visando a ruptura celular, como a hidrólise ácida, ciclos de congelamentos e descongelamentos subsequentes ou ainda extrações assistidas por ultrassom e micro-ondas (HARUN et al., 2010).

Tradicionalmente, constituintes lipídicos de matrizes biológicas são extraídos utilizando uma combinação de clorofórmio, metanol e água, descrita por Bligh e Dyer (1959). O método foi desenvolvido para extração de lipídios de tecido de peixe e tem sido utilizado como referência para extração da fração lipídica de diversas matrizes e também para estudos de comparação de métodos. Uma desvantagem do método Bligh e Dyer é o uso de grande volume de solventes para extração de lipídios e de resíduos formados (SAHENA et al., 2009).

O método Bligh e Dyer com modificações tem sido empregado também para extração de compostos polares presentes em biomassa microalgal, visto que são utilizados solventes com diferentes faixas de polaridades (SHIN et al., 2014). Atendendo aos princípios da química verde, a principal adaptação realizada é a redução do volume de solventes empregado, observando a manutenção da eficiência da extração ou até mesmo maximizada utilizando esse método assistido por ultrassom ou micro-ondas, por exemplo. Vários estudos mostraram que métodos de extração de compostos de microalgas assistidos tanto por ultrassom, quanto por micro-ondas se mostraram mais eficientes, com menor tempo, aumento de produtividade, custos baixos a moderados, sem toxicidade ou riscos adicionais (CRAVOTTO et al., 2008).

2.4.2 Análise dos metabólitos por cromatografia em fase gasosa

Recentemente, a evolução da análise instrumental permitiu a detecção e quantificação de inúmeros compostos, principalmente pelo aumento da sensibilidade e da precisão. A determinação deve proporcionar baixos limites de detecção para todos os analitos que estejam presentes na amostra em um curto tempo de análise (CALLEJÓN, TRONCOSO, MORALES, 2010).

A GC é técnica mais utilizada para determinação de ácidos graxos de amostras lipídicas, devido sua alta resolução, sensibilidade e capacidade de separar isômeros. Tanto detectores de ionização em chama (FID) quanto espectrômetros de massas (MS) são utilizados para determinação desses compostos (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Entretanto, cerca de 99% dos ácidos graxos encontrados na natureza se apresentam na forma de triacilgliceróis que não são suficientemente voláteis para serem analisados por GC (DEMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010). Assim, esses compostos são submetidos a processos de derivatização para obtenção de derivados voláteis, como ésteres de ácidos graxos (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Vários métodos são empregados atualmente para conversão de triacilgliceróis a ésteres de ácidos graxos, os quais se baseiam nos princípios básicos de hidrólise ácida e alcalina (ALDAI et al., 2005):

- A hidrólise dos lipídios em ácidos graxos envolve a saponificação (hidrólise alcalina) em que a ligação éster entre o ácido graxo e o glicerol é clivada sob temperatura elevada na presença de um álcali forte. Posteriormente, ocorre a metilação na presença de um ácido forte em metanol.

- A transesterificação direta envolve catálise ácida ou alcalina em um processo em que o álcool (glicerol) do lipídio é deslocado da molécula e substituído por outro álcool em excesso em condições anidras.

Tradicionalmente, a determinação de aminoácidos e ácidos orgânicos é realizada por cromatografia de troca iônica, LC, CE, acopladas a diferentes detectores, incluindo o espectrômetro de massas ou até mesmo métodos espectrofotométricos, por serem consolidados para este fim e apresentarem simplicidade e serem relativamente rápidos (CALLEJÓN, TRONCOSO, MORALES, 2010; CHRISTOU et al., 2014; HARVEY, 2011). A GC surge como alternativa para a determinação destes compostos por apresentar alto poder

de resolução, sensibilidade e fácil acoplamento a diferentes detectores (HARVEY, 2011). Entre esses detectores o MS permite a identificação de analitos por seu espectro de íons e além dos dados de tempo de retenção, ademais apresenta sensibilidade elevada e pode ser operado em modo seletivo de íons que contribui para maior seletividade (MARTENS-LOBENHOFFER e BODE- BÖGER, 2014).

Entretanto, esses compostos polares não são suficientemente voláteis para serem analisados por GC, o que torna necessário sua conversão a derivados voláteis, principal requisito para o emprego da técnica (KOEK, 2011). Em geral, as reações de derivatização de uma só etapa são preferidas, mas derivatizações de duas etapas podem se mostrar mais eficientes para posterior análise cromatográfica. Os métodos clássicos de derivatização consistem na substituição de grupos polares das moléculas para aumentar sua volatilidade (RUIZ-MATUTE et al., 2011).

Os grupamentos polares presentes nestes compostos são passíveis de diferentes reações de derivatização como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais reações de derivatização de grupos funcionais com seus respectivos derivatizantes.

Grupo funcional	Reação	Derivatizante
Ácido carboxílico	Sililação	MSTFA, BSA, BSTFA, TMCS, MTBSTFA;
	Formação de éster metílico	TMSH, DMS, Metanol/ Ácido inorgânico, Metanol/ Cloreto de acila; Metanol/ BF ₃ ;
	Esterificação	Álcool/ Ácido inorgânico, Álcool/ BF ₃ , PFBBr, 3-piridilcarbinol;
	Dimetiloxazolina	DMOX;
Hidroxila	Sililação	MSTFA, BSTFA, BSA, TMCS, MTBSTFA;
	Formação de éter metílico	Diazometano
	Derivatização quirál	MTPA
Cetona e aldeído	Oximação	Hidroxiamina e Metoxiamina
Amina	Sililação	MSTFA, BSTFA, BSA, TMCS, MTBSTFA;
	Acilação	HFBA, PFPA, TFAA;

Fonte: Modificada de Blau e Halket, 1993; Kloos, et al., 2014.

Segundo estudos que realizaram a determinação de metabólitos de goiaba (LEE, et al., 2010), tomate (OMS-OLIU et al., 2011) e abacate (HURTADO- FERNÁNDEZ, et al., 2014) a derivatização de duas etapas, oximação seguida de sililação é eficiente para a determinação

por GC de aminoácidos, carboidratos e ácidos orgânicos simultaneamente, visto que pode ser aplicada tanto para aldoses quanto cetoses, carbonilas e aminas e têm sido amplamente empregada na determinação de diversas misturas complexas, por ser eficiente e proporcionar cromatogramas com boa resolução (RUIZ-MATUTE et al., 2011).

A sililação é o método de derivatização mais utilizado, seja ele aplicado posteriormente a oximação ou isolado, pois é simples, versátil e consiste em um processo único e não necessita de um método de separação anterior a análise por GC quando comparada aos outros métodos de derivatização. A reatividade dos reagentes de sililação para os átomos de hidrogênio ativos reduz na seguinte ordem, hidroxila (alifático > fenólico > carboxila), amina e amida. As reações de sililação envolvem o ataque nucleofílico de segunda ordem, onde o par de elétrons do heteroátomo mais eletronegativo da molécula (O, N ou S) ataca o átomo de silício do reagente de sililação (WELLS, 1999).

Uma grande variedade de reagentes de sililação está disponível, como trimetilclorosilano (TMCS), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), mas os derivados trimetilsilil (TMS) formados são instáveis e requerem condições anidras (SEGURA, VENTURA, JURADO, 1998). Muitos trabalhos utilizam o N,N-terc-butil(dimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) como derivatizante por ser menos sensível a hidrólise e formar derivados mais estáveis que os outros reagentes. Os rendimentos obtidos com estes agentes sililantes são superiores a 96%. Além do reagente de derivatização é necessária a utilização de um solvente apropriado para que a reação ocorra. Como a sililação se dá nos hidrogênios ativos da molécula devem ser evitados solventes próticos. Piridina, hexano, isoctano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano e acetonitrila estão entre os solventes mais utilizados na reação de sililação (RODIER et al., 2001).

Assim, principal desvantagem da GC é o processo de derivatização dos compostos polares em questão para formação de derivados voláteis, devido à complexidade das reações e os reagentes envolvidos. Apesar destes inconvenientes, a GC é uma técnica seletiva, sensível, precisa, exata, barata e versátil, além de permitir a detecção de diversas classes químicas simultaneamente quando acoplada a detector universal (POOLE, 2013).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

A qualidade das mediações químicas deve ser assegurada através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Assim, para que um método analítico a ser desenvolvido forneça informações confiáveis e passíveis de interpretação, ele deve ser submetido a uma avaliação prévia, a validação (RIBANI et al., 2004).

A validação consiste de um processo contínuo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e se estende pelo seu desenvolvimento (RIBANI et al., 2004) e tem por objetivo garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Os parâmetros analíticos de validação (ou figuras de mérito) mais utilizados para avaliar métodos de separação são: seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalo (faixa linear), precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (PASCHOAL et al., 2008).

2.5.1 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação, visto que algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem vir a coeluir com substâncias de interesse (RIBANI et al., 2004).

A avaliação da seletividade deve ser realizada através de ensaios com padrões ou materiais de referência e amostras com e sem o analito e a capacidade de identificar o analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2007). Para os métodos cromatográficos é conveniente também a utilização de testes de pureza de pico com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas (PASCHOAL et al., 2008).

2.5.2 Linearidade

Corresponde a capacidade do método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2007). A relação matemática entre o sinal analítico e a concentração do

composto de interesse pode ser expressa por uma equação de regressão linear simples apresentada abaixo, chamada de curva analítica (RIBANI et al., 2004).

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico, absorvância, etc.);

x = concentração do analito de interesse;

a = inclinação da curva de calibração – sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0;

A determinação da linearidade deve ser realizada com no mínimo cinco níveis de contração do analito, preparados em três replicatas independentes. A linearidade do método será observada pelo gráfico dos ensaios em função da concentração do analito e verificada também pela equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2007). O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser =0,99 (ANVISA, 2003).

2.5.3 Sensibilidade

Demuestra a variação da resposta em função da concentração do analito. A sensibilidade pode ser expressa pela inclinação da curva analítica (coeficiente angular), assim é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. No caso de uma reta, quanto maior for o ângulo de inclinação, mais sensível será o método (INMETRO, 2007).

2.5.4 Intervalo (faixa linear)

A faixa linear ou intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. O intervalo é determinado pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2003).

A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2007).

2.5.5 Precisão

Representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). Normalmente, a precisão é determinada para circunstâncias específicas de medição e as formas comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

Os resultados de repetitividade, de precisão intermediária e de reprodutibilidade podem ser expressos pela estimativa do desvio padrão absoluto (s), pelo intervalo de confiança da média, como também pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido como coeficiente de variação (CV), conforme a equação abaixo (RIBANI et al., 2004).

$$\text{RSD (\%)} = (s / x_m) \times 100$$

Onde:

s: desvio padrão absoluto das medições em replicatas;

x_m : média das medições em replicatas;

Como os ensaios de precisão podem ser dependentes da concentração dos analitos, eles devem ser realizados em diferentes concentrações e o desvio padrão relativo (RSD) pode ser o mais útil para expressar os resultados neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse (INMETRO, 2007).

- Repetitividade (precisão intracorrída)

Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado nas mesmas condições; mesmo local; e as repetições realizadas em um curto intervalo de tempo (INMETRO, 2007).

- Precisão intermediária (precisão intercorridas)

A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada de uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas com variações devido a eventos como diferentes dias, analistas, equipamentos ou combinação destes fatores (INMETRO, 2007). Para determinação da precisão intermediária do método é recomendado que a análise seja realizada em pelo menos dois dias diferentes com diferentes analistas (ANVISA, 2003).

- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial)

A reprodutibilidade expressa o grau de concordância dos resultados das medições de uma mesma amostra realizadas em diferentes condições, mudança de analista, local, equipamentos (RIBANI et al., 2004). Refere-se, principalmente, a estudos de colaboração entre laboratórios geralmente aplicados a padronização de metodologias analíticas (ANVISA, 2003).

Apesar da reprodutibilidade não ser um componente da validação de um método executado por um único laboratório, este pode utilizá-la para verificar o desempenho dos seus métodos analíticos através da comparação interlaboratorial dos seus dados de validação (INMETRO, 2007).

2.5.6 Limite de Detecção (LOD)

Corresponde à quantidade mínima em que o analito pode ser detectado mas não necessariamente quantificado nas condições analíticas estabelecidas (ANVISA, 2003). O LOD pode ser calculado de várias maneiras: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004):

- Método visual: o LOD é determinado através da comparação da adição de baixas concentrações conhecidas do analito, de tal modo que se possa determinar o menor nível em que o analito realmente pode ser detectado, distinguido-se do ruído visualmente.

- Método da relação sinal/ruído: o LOD é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco da amostra. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal/ruído de 3:1 ou 2:1 são aceitas como estimativas do limite de detecção.

- Método baseado em parâmetros da curva analítica: o LOD é determinado através de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

s = a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica;

S= a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica;

2.5.7 Limite de Quantificação (LOQ)

Corresponde a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão em condições analíticas estabelecidas (INMETRO, 2007). O LOQ pode ser determinado com base nos mesmos critérios do LOD, porém utilizando uma relação 10:1, ou seja, pelo método visual, pela relação sinal ruído ou pela relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) (que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação) e a inclinação da curva analítica (S), em níveis próximos ao LQ (RIBANI et al., 2004), a partir da equação:

$$\text{LOD} = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde:

s = a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica;

S= a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica;

2.5.8 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

Normalmente, a avaliação da exatidão é realizada através do uso de materiais de referência certificados (MRC), participações em ensaios interlaboratoriais e realização de ensaios de adição e recuperação (INMETRO, 2007).

2.5.9 Robustez

Mede a sensibilidade do método analítico frente a pequenas e deliberadas variações. Um método se diz robusto quando se mostra praticamente insensível a variações que possam ocorrer quando executado (ANVISA, 2003).

A Robustez de um método cromatográfico pode ser avaliada pela variação de parâmetros como concentração de solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração e agitação. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

O Teste de *Younden* pode ser utilizado para verificar a robustez do método analítico e também para ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2007).

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Manuscrito 1

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA CARACTERIZAÇÃO
DE METABÓLITOS INTRACELULARES DE MICROALGAS EMPREGANDO
CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA (GC)**

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de extração simultânea da fração apolar (ácidos graxos) e polar (aminoácidos e ácidos orgânicos) do conteúdo intracelular de microalgas. Adicionalmente, métodos para a determinação desses analitos por GC foram validados e utilizados na caracterização de duas clorofíceas, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* e duas cianobactérias, *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Phormidium autumnale*. Os compostos foram extraídos por mistura de solventes orgânicos (metanol-clorofórmio) com volume reduzido e diferentes formas de agitação e/ou ruptura celular. Os compostos apolares foram derivatizados por catálise ácida. A derivatização dos compostos polares foi realizada utilizando derivatizante N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) em meio alcalino e validada para a amostra biomassa microalgal quanto a seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Todos os métodos de homogeneização e/ou ruptura celular avaliados apresentaram capacidade de extrair os compostos apolares e polares da biomassa de *C. vulgaris*. A derivatização dos compostos polares atendeu satisfatoriamente os parâmetros de validação avaliados. Foram detectados onze ácidos graxos, dez aminoácidos, e três ácidos orgânicos entre as espécies. Os ácidos succínico, málico e cítrico, importantes intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA), a partir do qual são formados produtos microalgais de interesse. Dentre os aminoácidos o ácido glutâmico foi o majoritário em todas espécies. Com exceção da *S. obliquus*, as microalgas apresentaram perfil de ácidos graxos com cadeia carbônica majoritariamente saturada.

Palavras-chave: derivatização, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos.

INTRODUÇÃO

Os sistemas biológicos são formados por compostos de diversas classes químicas em ampla faixa de concentração. Várias são as abordagens utilizadas para caracterizar esses compostos, as análises de caracterização metabólica visam identificar e quantificar um grupo de metabólitos que estejam correlacionados, o “fingerprinting” tem por objetivo determinar uma ampla gama de compostos, sem a necessidade de quantificar e os identificar separadamente, já a metabolômica identifica e quantifica o conteúdo total de metabólitos presentes em matrizes biológicas (KOEK et al., 2011; CASTRO-PUYANA e HERRERO, 2013).

Dentre as matrizes biológicas com elevado poder de síntese de metabólitos se encontram as microalgas, que são micro-organismos unicelulares procariontes ou eucarionte. (ZHU, 2015). As microalgas apresentam versatilidade no que se refere a manutenção de suas estruturas, usufruindo de diferentes metabolismos energéticos, fotossintético, heterotrófico e fixação de nitrogênio (MORALES-SÁNCHEZ et al., 2014).

A biomassa microalgal apresenta grande importância comercial para indústria de alimentos, farmacêutica, energia e aquicultura, como fonte natural de produtos de alto valor

agregado, pimentos, enzimas, lipídios, proteínas, esteróis e vitaminas (KOLLER, MUHR, BRAUNEGG, 2014). Entretanto, não são reportados dados a respeito de metabólitos precursores e intermediários da biossíntese destes compostos microalgais de interesse.

As principais técnicas analíticas utilizadas para determinação de metabólitos são a ressonância magnética nuclear (NMR) e técnicas combinadas, cromatografia em fase gasosa (GC) aliada a cromatografia líquida (LC), ambas acopladas a diferentes detectores (DIETERLE et al., 2011). Essas técnicas são, geralmente, preferidas para análise do metaboloma, pois permitem a quantificação e identificação de um grande número de metabólitos, já que este é formado por diferentes classes químicas em ampla faixa de concentração (KOEK et al., 2011).

Apesar de menos usual, a utilização da GC de forma isolada surge como alternativa para análise de metabólitos, visto que possibilita a separação e detecção tanto de compostos polares (ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares e açúcares álcoois) quanto não polares (ácidos graxos e esteróis) com elevado poder de resolução, sensibilidade e detectabilidade, além de permitir a análise simultânea de diferentes classes químicas (LEE et al., 2013).

Ao se empregar novos métodos e técnicas analíticas, os parâmetros de validação como a seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão são pré-requisitos básicos para obtenção de resultados de qualidade. Atualmente, outras características são requeridas para métodos analíticos quantitativos, tais como redução da quantidade de amostras e produtos químicos, abordagens menos nocivas ao meio ambiente, reagentes menos tóxicos e métodos com menor número de etapas, mais rápidos e de menor custo (PIZZUTTI et al., 2009).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de preparo de amostra que permite a extração simultânea da fração apolar (ácidos graxos) e polar (aminoácidos e ácidos orgânicos) do conteúdo intracelular de microalgas. Nesse estudo foi adotado a GC como ferramenta analítica única para análise das frações.

MATERIAL E MÉTODOS

MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTURA

As culturas de *C. vulgaris*, *S. obliquus*, *A. microscopica* Nägeli e *P. autumnale* foram propagadas e mantidas em meio sintético BG11 (Ripka et al., 1979) em pH 8,0. As condições utilizadas foram 25 °C, 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luminosidade e fotoperíodo de 12 h (escuro/claro).

SOLUÇÕES PADRÃO

Foram preparadas soluções padrão de aminoácidos (L-alanina, L-glicina, L-valina, L-leucina L-isoleucina, DL-norleucina (padrão interno), L-prolina, L-metionina, L-serina, L-treonina, L-fenilalanina, L-ácido aspártico, L-hidroxi prolina, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-arginina, L-asparagina, L-lisina, L-glutamina, L-histidina, L-tirosina e L-triptofano) (Sigma Aldrich - USA) e ácidos orgânicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido pirúvico, ácido succínico e ácido tartárico) (Vetec Química Fina LTDA - BR) na concentração de 8 mg/mL de ácido clorídrico 0,1 M.

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

Os metabólitos foram extraídos pelo método de Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações. Cerca de 100 mg de biomassa microalgal foram pesadas e adicionados 3 mL de metanol, 1,5 mL de clorofórmio e 1,2 mL de água destilada. Para extração foram testados diferentes formas de agitação e/ou ruptura celular: sonda de ultrassom (Sonifier 250, Branson - USA) com frequência de 20 kHz, 200 W de potência, amplitude de 70%, no modo pulsado por 30 minutos; mesa agitadora (Q225M, Quimis - BR) a 250 rpm por 30 minutos, com os tubos dispostos horizontalmente; vórtex (MX-S, SCILOGEX - USA) com adição de pérolas de vidro de 0,25 mm de diâmetro por 30 minutos; agitador do tipo Turrax (TE-102 Turratec, Tecnal - BR) por 10 minutos seguido de mesa agitadora por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada e novamente agitados em mesa agitadora por 4 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas (MTD III PLUS, Metroterm - BR) a 1370 g por 2 minutos para separação das fases. As fases orgânica e aquosa foram reservadas para análise dos metabólitos apolares e polares, respectivamente.

DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS APOLARES

A fase orgânica contendo os lipídeos foi transferida para tubos de ensaio de 10 mL com adição de 250 µL de padrão interno (Pi) com concentração de 4 mg/mL de tricosanoato de metila (C23:0Me) (Sigma-Aldrich - USA) em iso-octano. Os solventes foram evaporados em bomba de hidrovácuo (Q355J, Quimis - BR) e bloco de aquecimento (Concentrator e Dry, Technal - BR) a 40 °C. A derivatização foi realizada segundo o método descrito por Hartman e Lago (1973). Assim, a fração lipídica foi adicionada de 1 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (0,4 M) e mantida em banho-maria (500, Fisatom - BR) a 100 °C por

10 min. Após, os tubos foram resfriados e adicionados de 3 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1 M) e novamente submetidos a 100 °C por 10 min. Em seguida, os tubos foram resfriados e adicionados de 2 mL de hexano, sendo homogeneizados em vórtex (MX-S, SCIOLOGEX – USA) por 30 segundos. Posteriormente, após a separação das fases foi realizada a retirada da parte superior do tubo contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) dissolvidos em hexano para análise cromatográfica.

Os FAME dissolvidos em hexano foram analisados pela injeção de 1 µL em cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) da marca Varian, modelo Star 3400 CX (USA) e amostrador automático Varian, modelo 4200 (USA). Os FAME foram separados em coluna capilar CP- Wax 52 CB (Chrompack - NL) (50 m × 0,32 mm × 0,20 µm). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 15 psi. O injetor manteve-se no modo *splitless* por 0,6 min seguido de *split* com razão 20:1 e temperatura de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, onde permaneceu 1 min, aumentando para 180 °C com taxa de 20 °C/min, após até 200 °C com taxa de aumento de 2 °C/min e então com taxa de 10 °C/min até atingir 230 °C mantendo-se em isoterma por 8 min. O detector manteve-se na temperatura de 240 °C. A identificação dos FAME foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos analitos com padrões FAME Mix-37 (Sigma-Aldrich, USA). Os resultados foram expressos em massa de FAME/ massa de amostra, a partir do uso do Pi de massa conhecida e dos fatores de correção do FID.

DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS POLARES

A derivatização dos padrões e dos metabólitos polares extraídos da biomassa microalgal foi realizada de acordo com o método descrito por OMS-OLIU, et al. (2011). Foram secos 150 µL do sobrenadante do extrato metanólico e 150 µL da solução contendo o padrão interno DL-norleucina na concentração de 25 µL/mL em bomba hidrovácuo (Q355J, Quimis - BR) e bloco de aquecimento (Concentrator e Dry, Technal - BR) a 60 °C. Então, foram adicionados 40 µL de cloridrato de hidroxilamina em piridina na concentração de 20 mg/mL e as amostras incubadas em banho seco a 38 °C por 90 minutos. Posteriormente, foram adicionados 60 µL de N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) e novamente incubadas a 38 °C por 30 minutos. As amostras foram transferidas para frascos de vidro de 200 µL e então analisadas.

As amostras foram analisadas pela injeção de 1 µL em cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) da marca Varian, modelo Star 3400 (USA) e

amostrador automático Varian, modelo 8100 (USA). Os analitos foram separados em coluna capilar RTX-5MS (Restek - USA) ($30\text{m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 15 psi. O injetor manteve-se no modo *splitless* por 1 min seguido de *split* com razão 30:1 e temperatura de 320 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, onde permaneceu por 2 min, aumentando para 165 °C com taxa de 2 °C/min. Após, com taxa de 5 °C/min até atingir 200 °C e então até 280 °C com taxa de 3 °C/min, mantendo-se em isoterma por 5 min. O detector manteve-se na temperatura de 320 °C. Os metabólitos encontrados nas amostras foram positivamente identificados pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa com os das soluções contendo os analitos padrão, obtidos em cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/MS) Shimadzu, QP-2010 Plus (JAP) nas mesmas condições cromatográficas descritas acima, utilizando hélio como gás de arraste. A fonte de ionização do MS foi operada no modo de ionização por elétrons (EI) a 70 eV e o analisador de massas do tipo quadrupolos simples com varredura de 50 a 500 m/z. A quantificação foi realizada pelo método de padronização interna, comparando-se as áreas obtidas de soluções de concentrações conhecidas do padrão contendo a mistura dos aminoácidos e ácidos orgânicos com as áreas obtidas das amostras por meio de uma curva.

O método para determinação de aminoácidos livres e ácidos orgânicos da biomassa microalgal foi validado considerando os seguintes parâmetros de mérito: seletividade, linearidade, LOD, LOQ, precisão e exatidão.

A seletividade foi avaliada pela injeção de uma solução contendo a mistura dos 21 L-aminoácidos e dos 6 ácidos orgânicos de interesse já derivatizados. Em seguida foram injetadas no sistema cromatográfico soluções do branco (solução contendo todas os reagentes em mesmo volume e concentração envolvidos na derivatização) e de cada aminoácido e ácido orgânico preparados individualmente para confirmar sua identidade através da sobreposição dos picos individuais em relação à solução injetada com a mistura.

A linearidade foi realizada a partir de uma solução-estoque de 8 mg/mL da qual foram preparadas diluições em oito níveis de concentração (160, 80, 40, 20, 10, 5, 1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) com três repetições em cada nível de concentração e analisadas para construção da curva de calibração. A equação da curva de calibração e o coeficiente de correlação foram obtidos para cada aminoácido e ácido orgânico. Para os cálculos da curva foi considerada a área de cada composto normalizada pela área do padrão interno DL-norleucina na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$.

LOD e LOQ dos analitos das soluções foram determinados pelo método da relação sinal/ruído. A relação sinal/ruído utilizada foi de 3:1 e 10:1 para LOD e LOQ, respectivamente (RIBANI et al., 2004).

A precisão foi avaliada a nível de repetibilidade e precisão intermediária. Para determinação da repetibilidade foram analisadas 6 repetições da mistura dos padrões nas concentrações de 40 µg/mL e 20 µg/mL sob as mesmas condições em um mesmo dia de análise, então foi realizada a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) das medidas.

A precisão intermediária foi avaliada a partir da análise de 6 repetições da mistura dos padrões nas concentrações de 40 µg/mL e 20 µg/mL sob as mesmas condições de análise em diferentes dias e diferentes analistas. Posteriormente foi realizada a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) das medidas.

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação. Os resultados foram obtidos pela comparação da análise de 6 repetições da amostra pura com 6 repetições da amostra contendo a mistura de padrões nas concentrações de 40 µg/mL e 20 µg/mL.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo STATISTICA versão 7.0 (USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tradicionalmente, lipídios de matrizes biológicas são extraídos pela combinação de clorofórmio, metanol e água para fins analíticos. Este método descrito por Bligh e Dyer é utilizado como referência entre os diferentes métodos de extração. Entretanto, apresenta a desvantagem da utilização de um elevado volume de solventes orgânicos potencialmente tóxicos (MERCER e ARMENTA, 2011). Assim, a extração dos compostos da microalga *C. vulgaris* foi realizada pelo método de Bligh e Dyer com redução de 80% no volume de solventes orgânicos e de amostra utilizada.

Além da redução no volume de solventes, a extração foi realizada com homogeneização em mesa agitadora como é descrito no método original (TR), homogeneização em ultraturrax seguido de mesa agitadora (TU), assistido por ultrassom (US) e abrasão em agitador tipo vórtex com adição de pérolas de vidro (VO), a fim de verificar a melhor forma de

extração dos metabólitos de interesse que se encontram no citoplasma da microalga, promovendo permeação ou ruptura da parede celular (ARAÚJO et al., 2013).

Os metabólitos extraídos por Bligh e Dyer com diferentes formas de extração do conteúdo intracelular e as respectivas áreas obtidas em GC-FID são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos da microalga *C. vulgaris* extraídos por Bligh e Dyer com diferentes formas de homogeneização para extração do conteúdo intracelular.

Metabólitos	Área do pico ($\times 10^5$)			
	TR	TU	US	VO
Aminoácidos				
Alanina	14,63 \pm 0,35 ^a	14,28 \pm 0,58 ^a	14,52 \pm 10,00 ^a	14,19 \pm 0,44 ^a
Glicina	5,12 \pm 0,60 ^a	4,24 \pm 0,33 ^a	5,08 \pm 0,78 ^a	4,39 \pm 0,20 ^a
Valina	4,09 \pm 0,31 ^a	3,94 \pm 0,15 ^a	4,06 \pm 0,25 ^a	3,93 \pm 0,15 ^a
Leucina	1,66 \pm 0,56 ^a	2,00 \pm 0,14 ^a	1,99 \pm 0,10 ^a	1,91 \pm 0,13 ^a
Isoleucina	1,17 \pm 0,06 ^a	1,14 \pm 0,07 ^a	1,18 \pm 0,06 ^a	1,11 \pm 0,05 ^a
Prolina	1,67 \pm 0,11 ^a	1,62 \pm 0,05 ^a	1,73 \pm 0,08 ^a	1,62 \pm 0,18 ^a
Serina	1,06 \pm 0,15 ^a	1,02 \pm 0,03 ^a	1,31 \pm 0,42 ^a	1,10 \pm 0,09 ^a
Fenilalanina	0,80 \pm 0,12 ^a	0,73 \pm 0,03 ^a	0,98 \pm 0,16 ^a	0,73 \pm 0,04 ^a
Ácido Aspártico	1,03 \pm 0,11 ^a	0,80 \pm 0,09 ^a	1,01 \pm 0,09 ^a	0,84 \pm 0,07 ^a
Ácido Glutâmico	6,94 \pm 0,56 ^a	6,44 \pm 0,39 ^a	7,11 \pm 0,49 ^a	6,56 \pm 0,57 ^a
Lisina	0,36 \pm 0,03 ^a	0,30 \pm 0,03 ^a	0,32 \pm 0,07 ^a	0,25 \pm 0,03 ^a
Ácidos orgânicos				
Succínico	6,40 \pm 0,21 ^{ab}	6,58 \pm 0,15 ^a	6,33 \pm 0,16 ^b	6,26 \pm 0,17 ^b
Málico	1,15 \pm 0,17 ^a	1,13 \pm 0,06 ^a	1,12 \pm 0,06 ^a	1,09 \pm 0,09 ^a
Ácidos graxos				
C12:0	0,88 \pm 0,05 ^a	0,89 \pm 0,04 ^a	0,91 \pm 0,11 ^a	0,95 \pm 0,15 ^a
C14:0	0,14 \pm 0,07 ^a	0,11 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,02 ^a	0,11 \pm 0,02 ^a
C14:1	0,53 \pm 0,08 ^a	0,51 \pm 0,05 ^a	0,65 \pm 0,11 ^a	0,55 \pm 0,13 ^a
C16:0	6,30 \pm 0,09 ^a	6,18 \pm 0,04 ^a	6,49 \pm 1,00 ^a	6,14 \pm 1,02 ^a
C16:1	0,33 \pm 0,01 ^a	0,30 \pm 0,01 ^a	0,34 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,05 ^a
C18:0	0,31 \pm 0,06 ^a	0,32 \pm 0,05 ^a	0,50 \pm 0,07 ^a	0,37 \pm 0,06 ^a
C18:1n9c	2,65 \pm 0,09 ^a	2,58 \pm 0,04 ^a	2,89 \pm 0,57 ^a	2,66 \pm 0,36 ^a
C18:2n6t	1,39 \pm 0,03 ^a	1,30 \pm 0,04 ^a	1,31 \pm 0,21 ^a	1,32 \pm 0,18 ^a
C18:2n6c	2,47 \pm 0,18 ^a	2,41 \pm 0,08 ^a	2,83 \pm 0,60 ^a	2,42 \pm 0,40 ^a
C18:3n6	0,40 \pm 0,05 ^a	0,37 \pm 0,02 ^a	0,43 \pm 0,09 ^a	0,37 \pm 0,05 ^a
C18:3n3	2,97 \pm 0,24 ^a	2,82 \pm 0,11 ^a	3,32 \pm 0,75 ^a	2,84 \pm 0,43 ^a
C20:2	0,40 \pm 0,02 ^a	0,36 \pm 0,02 ^a	0,44 \pm 0,09 ^a	0,39 \pm 0,05 ^a

Letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Valores expressos em média \pm desvio padrão (DP).

Gerken, Donohoe e Knoshaug (2013) relataram que diferentes espécies de microalgas e que até mesmo uma espécie cultivada em condições distintas apresentam paredes celulares com diferentes composições, a qual facilita ou dificulta sua permeabilidade. Ademais, solventes orgânicos apresentam capacidade de extrair compostos intracelulares, porém a eficiência de extração pode ser muito maior quando as paredes são rompidas ou enfraquecidas por mecanismos químicos ou mecânicos de ruptura.

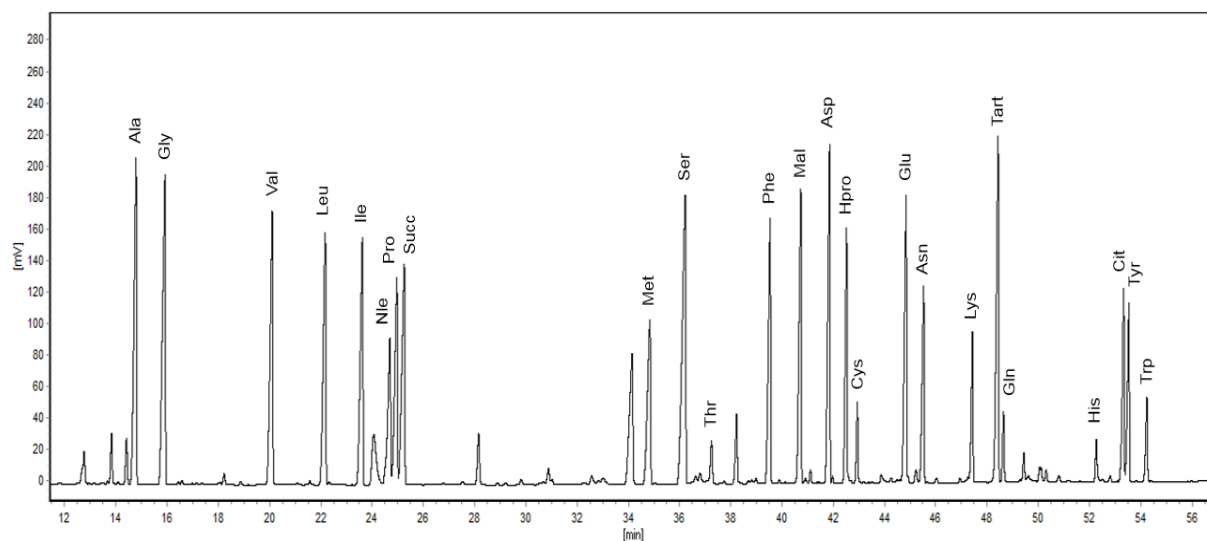
Entretanto, neste trabalho os compostos extraídos da microalga *C. vulgaris* não apresentaram diferença quando extraídos apenas pela homogeneização com solventes orgânicos (TR) em relação aos tratamentos TU, US e VO, com exceção do ácido succínico, que apresentou acréscimo em área para o tratamento TU e decréscimo nos tratamentos US e VO quando comparados ao TR. Devido à proximidade dos resultados obtidos, o tratamento TR foi o selecionado para desenvolvimento do trabalho devido sua praticidade e possibilidade de extração de várias amostras simultaneamente.

O método de Bligh e Dyer é eficaz para maioria das extrações de lipídios de microalgas, como também para análises de perfil de ácidos graxos (SHIN et al., 2014). Entretanto, não é comum a derivatização da outra fração de solventes orgânicos para análise dos metabólitos polares de microalgas, como também sua análise por GC, tornando necessário à validação de um método de derivatização que permita a análise desta fração pouco estudada pela técnica de GC.

Dentre os padrões de aminoácidos que foram utilizados para validação da derivatização, apenas a arginina não apresentou resposta na análise por GC-FID, visto que a derivatização completa da arginina é impedida pelo seu grupamento guanidina, para que esta reação ocorra é necessário a sua conversão preliminar à ornitina (SOBOLEVSKY et al., 2003). Já dentre os ácidos orgânicos, não foi detectado o ácido ascórbico, o qual é instável em meios básicos, calor e contato com o ar (SILVA, 2005), como também o ácido pirúvico, que por ser um α -cetoácido sofre facilmente decomposição, dimerização e descarboxilação (MAMER et al., 2013).

A maioria dos derivados de aminoácidos e ácidos orgânicos analisados por GC-FID apresentaram adequada resolução, com ausência de interferentes nos tempos de retenção da solução de padrões e também das amostras (Figura 1).

Figura 1. Separação cromatográfica em GC-FID da mistura de padrões (40 µg/ mL) dos 21 aminoácidos e dos 4 ácidos orgânicos estudados.



As curvas analíticas e as equações de reta que foram obtidas por GC-FID mostraram que os modelos de regressão linear foram adequados para as determinações analíticas. Foram obtidos coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 para todos os padrões em estudo (Tabela 2). Qiu et al. (2007), ao realizarem análise simultânea de aminoácidos e ácidos orgânicos por GC/MS também obtiveram R^2 superiores a 0,99. Krumpochova et al. (2015) ao compararem métodos de análise de aminoácidos conseguiram obter R^2 superiores a 0,99 tanto empregando cromatografia líquida de fase reversa e com interação hidrofílica acopladas a MS quanto cromatografia gasosa acoplada a MS.

Dentre os compostos polares analisados 14 apresentaram faixa linear de 0,5 a 160 µg/mL, 8 de 1 a 160 µg/mL e os restantes de 0,5 a 80 µg/mL e de 10 a 160 µg/ mL (Tabela 2). Os valores de LOD e LOQ variaram de 0,15 a 3 µg/mL e de 0,5 a 10 µg/mL, respectivamente (Tabela 2). Villas-Bôas et al. (2003) ao analisarem derivados de aminoácidos e ácidos orgânicos simultaneamente por GC/MS obtiveram LOD e LOQ próximos aos encontrados neste trabalho (0,04 a 6,25 µg/mL e 0,13 a 20,83 µg/mL, respectivamente).

Tabela 2. Tempo de retenção (Tr), equação da regressão linear e coeficientes de determinação das curvas analíticas dos aminoácidos analisados por GC-FID.

Compostos Polares	Tr	Eq. Calibração	R ²	Faixa Linear	LOD	LOQ
Alanina	14,31	$y = 0,032x + 0,0156$	0,999	0,5 - 160	0,15	0,5
Glicina	15,43	$y = 0,0332x + 0,0544$	0,9978	10 - 160	3	10
Valina	19,54	$y = 0,0268x + 0,0324$	0,9991	0,5 - 160	0,15	0,5
Leucina	21,59	$y = 0,0248x + 0,0112$	0,9993	0,5 - 160	0,15	0,5
Isoleucina	23,02	$y = 0,0248x + 0,0141$	0,9992	0,5 - 160	0,15	0,5
Prolina	24,10	$y = 0,0176x + 0,0148$	0,9994	0,5 - 80	0,15	0,5
Ácido succínico	24,35	$y = 0,0241x + 0,0563$	0,9973	0,5 - 160	0,15	0,5
Metionina	24,66	$y = 0,0168x + 0,0321$	0,9986	0,5 - 160	0,15	0,5
Serina	34,19	$y = 0,0317x + 0,0468$	0,9971	0,5 - 80	0,15	0,5
Treonina	35,55	$y = 0,002x + 0,0087$	0,9973	1 - 160	0,3	1
Fenilalanina	36,64	$y = 0,0214x + 0,0473$	0,9981	0,5 - 160	0,15	0,5
Ácido málico	39,04	$y = 0,0223x + 0,0501$	0,9984	0,5 - 160	0,15	0,5
Ácido aspártico	40,29	$y = 0,0240x + 0,0430$	0,9978	0,5 - 160	0,15	0,5
Hidroxiprolina	41,42	$y = 0,0273x + 0,039$	0,9994	1 - 160	0,3	1
Cisteína	42,09	$y = 0,0051x + 0,0191$	0,9987	1 - 160	0,3	1
Ácido glutâmico	42,52	$y = 0,0232x + 0,0607$	0,9983	0,5 - 160	0,15	0,5
Asparagina	44,44	$y = 0,0133x + 0,0373$	0,998	0,5 - 160	0,15	0,5
Lisina	45,11	$y = 0,0103x + 0,0259$	0,9982	1 - 160	0,3	1
Ácido tartárico	46,99	$y = 0,0232x + 0,0531$	0,9976	0,5 - 160	0,15	0,5
Glutamina	48,01	$y = 0,0261x + 0,0152$	0,9996	1 - 160	0,3	1
Histidina	48,20	$y = 0,0059x + 0,0028$	0,9975	1 - 160	0,3	1
Ácido cítrico	51,81	$y = 0,011x + 0,0188$	0,9968	0,5 - 160	0,15	0,5
Tirosina	52,93	$y = 0,0097x + 0,0518$	0,9962	1 - 160	0,3	1
Triptofano	53,11	$y = 0,0046x + 0,021$	0,9965	1 - 160	0,3	1

* Faixa linear, LOD e LOQ expressos em µg/ml.

A precisão do método foi avaliada a nível de repetibilidade e precisão intermediária (RSD). Os valores de RSD obtidos foram satisfatórios para todos os compostos polares, inferiores a 20 % (European Commission, 2007). Segundo Ribani et al. (2004), a precisão depende da amostra, da concentração do analito e da técnica empregada, podendo variar de 2 a > 20% em matrizes complexas.

A exatidão foi determinada por ensaios de adição e recuperação em dois níveis de concentração (20 e 40 µg/mL). São aceitáveis valores de recuperação de 70 a 120% com RSD inferiores a 20% (European Commission, 2007). Dentre os compostos polares analisados apenas a fenilalanina e a asparagina apresentaram valores de recuperação inferiores a 70% em um dos níveis de adição (59,3 e 61,65%, respectivamente) (Tabela 3). Tian et al. 2008, ao analisarem metabólitos de bactéria por GC-FID e GC/MS obtiveram valores de recuperação de 68,7 a 122,7%.

Tabela 3. Repetitividade, precisão intermediária e recuperação obtidas para os compostos polares por GC-FID.

Compostos Polares	Concentração (µg/mL)	Repetitividade	Precisão Intermediária	Recuperação (%)
Alanina	20	1,45	1,41	87,7
	40	2,03	2,42	104,3
Glicina	20	1,05	0,96	76,7
	40	2,11	2,23	103,3
Valina	20	2,87	2,77	102,4
	40	1,81	2,50	118,3
Leucina	20	1,76	1,79	102,1
	40	1,52	1,73	112,9
Isoleucina	20	1,82	1,83	104,2
	40	1,38	1,92	114,5
Prolina	20	3,30	3,14	84,8
	40	1,75	2,87	114,9
Ácido succínico	20	1,94	1,76	98,1
	40	2,23	2,78	114,2
Metionina	20	2,52	2,42	80,7
	40	2,71	3,77	105,1
Serina	20	3,42	3,30	115,2
	40	2,73	3,25	108,2
Treonina	20	12,17	15,05	85,8
	40	9,97	9,27	74,0
Fenilalanina	20	5,37	5,27	59,3
	40	7,07	6,91	114,3
Ácido málico	20	2,31	2,29	93,5
	40	4,94	6,36	80,2
Ácido aspártico	20	1,93	2,30	100,6
	40	6,22	8,18	90,5
Hidroxirolina	20	4,15	4,01	93,7
	40	7,24	9,28	81,3
Cisteína	20	13,29	12,57	104,7
	40	12,17	14,29	119,8
Ácido glutâmico	20	15,79	14,60	107,5
	40	11,24	16,90	115,7
Asparagina	20	4,88	5,17	84,9
	40	10,62	12,47	61,6
Lisina	20	6,93	6,48	111,0
	40	13,57	15,05	113,1
Ácido tartárico	20	7,61	12,98	113,4
	40	11,69	17,09	78,6
Glutamina	20	6,28	5,94	84,4
	40	11,85	12,50	119,2
Histidina	20	16,40	14,18	76,6
	40	16,16	15,02	117,9
Ácido cítrico	20	8,40	7,98	90,1
	40	10,29	14,98	76,5
Tirosina	20	8,87	8,45	101,8
	40	14,49	17,57	98,2
Triptofano	20	4,74	12,96	105,9
	40	18,99	16,64	101,3

Após o método de derivatização dos metabólitos polares para análise por GC atender os critérios de validação, foram avaliadas diferentes espécies de microalgas, duas algas verdes

unicelulares (clorofíceas), *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* e duas cianobactérias, *Aphanothece microscopica Nægeli* e *Phormidium autumnale* (Tabela 4).

Tabela 4. Metabólitos de diferentes espécies de microalgas.

Metabólitos	<i>A. microscopica Nægeli</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>P. autumnale</i>	<i>S. obliquus</i>
Aminoácidos				
Alanina	14,88	21,88	74,63	161,75
Glicina	111,88	105,88	21,88	47,00
Valina	8,13	10,38	11,38	23,25
Leucina	13,13	5,88	9,25	19,13
Prolina	26,75	246,00	10,38	20,38
Serina	7,25	5,63	6,00	34,75
Fenilalanina	7,75	5,88	7,00	11,38
Ácido aspártico	14,13	16,13	34,50	53,00
Ácido glutâmico	427,00	1249,63	249,13	1090,25
Tirosina	67,50	75,50	32,13	27,75
Ácidos orgânicos				
Ácido succínico	27,63	28,50	53,50	34,25
Ácido málico	9,13	12,38	102,88	22,25
Ácido cítrico	17,00	23,75	7,75	5,75
Ácidos graxos				
14:0	0,27	0,34	0,27	0,32
16:0	31,90	36,80	15,49	15,89
16:0	3,95	6,70	1,27	12,43
17:0	0,08	0,09	0,14	0,15
17:0	0,19	0,18	0,16	0,44
18:0	1,19	0,96	1,63	1,14
18:1n9c	1,71	1,04	6,12	3,87
18:2n6c	3,13	3,83	8,54	8,89
18:3n6	7,02	8,46	0,09	0,27
18:3n3	0,27	0,36	0,05	2,66
20:2	0,12	0,12	0,25	0,14
∑ SFA	33,44	38,19	17,52	17,49
∑ MUFA	5,85	7,92	7,56	16,74
∑ PUFA	10,54	12,76	8,94	11,96
n6/n3	37,17	34,10	164,04	3,45

* Valores de aminoácidos e ácidos orgânicos expressos em µg/g de biomassa.

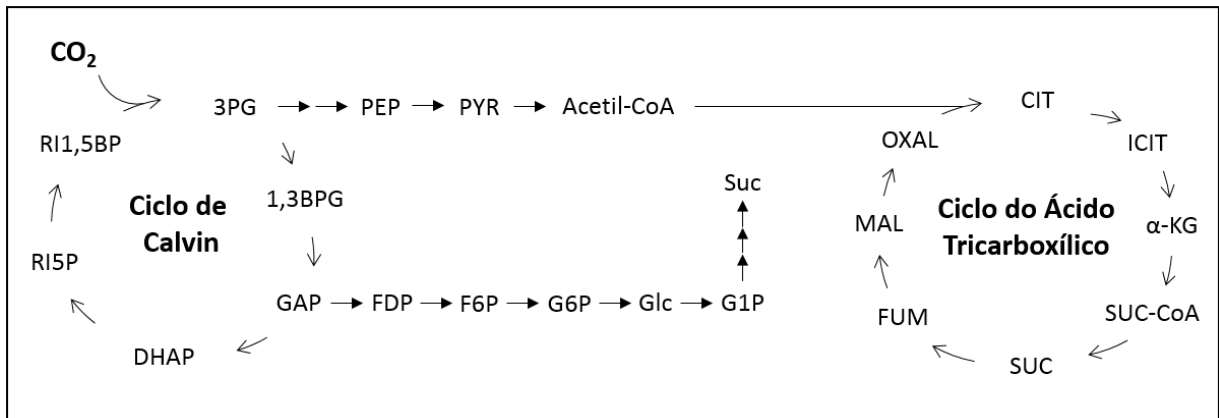
* Valores de ácidos graxos expressos em mg/g de biomassa.

O método permitiu a detecção de dez aminoácidos e três ácidos orgânicos. Adicionalmente, da fração apolar foram determinados onze ácidos graxos para as quatro espécies avaliadas, as quais foram mantidas em meio sintético BG11, a 25 °C com 15 µmol/m²/s de luminosidade e fotoperíodo de 12 h (escuro/claro).

O Ciclo de Calvin (fase escura da fotossíntese) é a responsável pela fixação do carbono inorgânico. O 3-fosfoglicerato (3PG) é primeiro produto estável formado por esta etapa da fotossíntese em clorofíceas e cianobactérias. Por ação enzimática o 3PG é convertido a fosfoenolpiruvato e este a piruvato e posteriormente a acetil coenzima A (acetil-CoA). Uma das moléculas formadas de acetil-CoA dá origem ao citrato e a partir de então são desencadeadas reações do TCA (Figura 2) (LI e LIAO, 2013).

Os ácidos succínico, málico e cítrico encontrados nas espécies de microalgas são importantes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), assim foi possível estabelecer relação entre este ciclo e o ciclo de Calvin característico de microrganismos fotossintéticos (Figura 2). Além de produção de energia esses ácidos orgânicos participam direta ou indiretamente de importantes rotas para formação de compostos microalgais de interesse, lipídios, proteínas, pigmentos (KANG et al., 2011; WAN et al., 2011; STEINHAUSER, FERNIE, ARAÚJO, 2012; BROMKE, 2013). A microalga *P. autumnale* apresentou concentrações superiores de ácido succínico e principalmente de ácido málico, em relação a *A. microscopica Nägeli*, *C. vulgaris* e *S. obliquus*.

Figura 2. Visão simplificada do metabolismo fotoautotrófico de microalgas.



3PG – 3-fosfoglicerato; 1,3 BPG – 1,3-bifosfoglicerato; GAP – gliceraldeído-3-fosfato; DHAP - fosfato de dihidroxiacetona; RI5P – ribulose-5-fosfato; RI1,5BP – ribulose-1,5-bifosfato; PEP – fosfoenolpiruvato; PYR – piruvato; ACETILCOA – acetil coenzima A; CIT – citrato; ICIT – isocitrato; α -KG – α -cetoglutarato; SUC-CoA – succinil coenzima A; SUC – succinato; FUM – fumarato; MAL – malato; OXAL – oxaloacetato; FDP – frutose difosfato; F6P – frutose-6-fosfato; G6P – glicose-6-fosfato; Glc – glicose; G1P – glicose-1-fosfato; Suc – sacarose. Fonte: Adaptado de Li e Liao, 2013; Wijffels, Kruse e Hellingwerf, 2013.

Os aminoácidos detectados são primários, monômeros que constituem as proteínas e polipeptídeos, além de serem intermediários do metabolismo. Entretanto, podem ser destacadas a leucina e a prolina, presentes nas espécies de microalgas analisadas, que além de apresentarem as funções comuns a todos aminoácidos, são consideradas também aminoácidos funcionais, por apresentarem atividade antioxidante (EGYDIO et al., 2013).

Independente de espécie, o perfil de aminoácidos apresentado pelas microalgas é bastante semelhante, caracterizado por baixas concentrações de aminoácidos básicos e uma prevalência de alanina, ácido glutâmico e ácido aspártico (SCHEUER, 1980). As concentrações de ácido glutâmico e aspártico podem representar 50% ou mais do teor total de aminoácidos presentes em microalgas (ZHANG et al., 2016).

O ácido glutâmico foi o aminoácido majoritário nas quatro espécies avaliadas e apesar do ácido aspártico ter sido detectado em concentrações inferiores, estes aminoácidos representaram mais 60% do perfil aminoacídico dessas microalgas. A alanina apresentou concentrações consideráveis nas microalgas *P. autumnale* e *S. obliquus*, enquanto para *A. microscopica* Nägeli e *C. vulgaris*, a glicina se destacou.

Os ácidos graxos saturados apresentaram as maiores concentrações, devido principalmente a presença do ácido palmítico (16:0), ácido graxo majoritário para todas espécies de microalgas. Nascimento et al., 2013, ao analisaram ácidos graxos de várias espécies de microalgas, incluindo *C. vulgaris* e *S. obliquus*, obtiveram perfis próximos aos reportados neste trabalho.

Com exceção da microalga *S. obliquus*, os ácidos graxos poliinsaturados apresentaram maiores teores do que os monoinsaturados. Os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados compreendem a fração lipídica de armazenamento das microalgas, enquanto os poliinsaturados fazem parte da fração estrutural destes microrganismos (OLOFSSON et al., 2012).

A *P. autumnale* apresentou a maior razão n6/n3, 164,04, seguida pelas razões da *A. microscopica* e *C. vulgaris*, 37,17 e 34,10, respectivamente, já a *S. obliquus* mostrou valor muito inferior as demais microalgas, 3,45. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), que recomenda razões n6/n3 de até 5:1, apenas a biomassa de *S. obliquus* tem capacidade de proporcionar benefícios à saúde (KUMARI et al., 2013).

CONCLUSÃO

O método de Bligh e Dyer com redução de 80% do volume de solventes orgânicos e de amostra e com homogeneização em mesa agitadora se mostrou adequado para extração simultânea de ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos de biomassa microalgal.

O emprego de cloridrato de hidroxilamina em piridina (20 mg/mL) e o derivatizante MTBSTFA permitiu a determinação de vinte aminoácidos e quatro ácidos orgânicos por GC com parâmetros de validação a níveis satisfatórios.

Assim, foi possível caracterizar a biomassa de diferentes espécies de microalgas em termos de ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos empregando GC. Esses metabólitos são importantes intermediários da biossíntese de compostos microalgais de interesse e a intensificação de pesquisas nesta área podem auxiliar no entendimento das distintas formas de assimilação de carbono e vias metabólicas desempenhadas por estes microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, G. S. et al. Extraction of lipids from Microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal Extraction method. **Ultrason. Sonochem.**, v. 20, p. 95-98, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 7, 1959.

BROMKE, M .A. Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms. **Metabolites**, v. 3, n. 2, p. 294-311, 2013.

CASTRO-PUYANA, M.; HERRERO, M. Metabolomics approaches based on mass spectrometry for food safety, quality and traceability. **Trends Anal. Chem.**, v. 52, p. 74-87, 2013.

DIETERLE, F. et al. NMR and MS methods for metabonomics. **Methods Mol. Biol.**, v. 691, p. 385–415, 2011.

EGYDIO, A. P. M. et al. Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Ind. Crop. Prod.**, v. 45, p. 373-376, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Documento n. SANCO/2007/3131*, 2007.

GERKEN, H. G.; DONOHOE, B.; KNOSHAUG, E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. **Planta**, v. 237, p. 239–253, 2013.

- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v.22, p. 475-476, 1973.
- KANG, Z. et al. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production. **Bioeng. Bugs**, v. 2, n. 6, p. 342-345, 2011.
- KOEK, M. M. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 307- 28, 2011.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Res.**, v. 6, p. 52-63, 2014.
- KRUMPOCHOVA, P. et al. Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, V. 114, P. 398–407, 2015.
- KUMARI, P. et al. Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. **Phytochemistry**, v. 86, p. 44–56, 2013.
- LEE, D. et al. Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. **Food Chem.**, v. 141, p. 3931-3937, 2013.
- LI, H.; LIAO, J. C. Biological conversion of carbon dioxide to photosynthetic fuels and electrofuels. **Energy Environ. Sci.**, v. 6, p. 2892-2899, 2013.
- MAMER, O. et al. The complete targeted profile of the organic acid intermediates of the citric acid cycle using a single stable isotope dilution analysis, sodium borodeuteride reduction and selected ion monitoring GC/MS. **Metabolomics**, v. 9, p. 1019-1030, 2013.
- MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.113, p. 539-547, 2014.
- MORALES-SÁNCHEZ, D. et al. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 1-9.
- NASCIMENTO, I. A. et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenerg. Res.**, v. 6, p. 1–13, 2013.
- OLOFSSON, M. et al. Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. **Energies**, v. 5, p. 1577-1592, 2012.
- OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening and postharvest shelf life. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 62, p. 7-16, 2011.
- PIZZUTTI, I. R. et al. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 4539–4552, 2009.

- QIU, Y. et al. Application of ethyl chloroformate derivatization for gas chromatography–mass spectrometry based metabonomic profiling. **Anal. Chim. Acta**, v. 583, p. 277–283, 2007.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v.111, p.1-61, 1979.
- SCHEUER, P. J. **Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives**. 3 ed. Academic Press: New York, USA, 1980. cap. 2, p. 97–99.
- SHIN, H. et al. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel**, v. 130, p. 66–69, 2014.
- SILVA F. O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. **Food Control**, v. 16, p. 55–58, 2005.
- SOBOLEVSKY, T. G. Comparison of silylation and esterification/ acylation procedures in GC-MS analysis of amino Acids. **J. Sep. Sci.**, v. 26, p. 1474-1478, 2003.
- STEINHAUSER, D.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different. **Trends Plant Sci.**, v. 17, n. 9, p. 503-509, 2012.
- TIAN, J. et al. Phenotype differentiation of three *E. coli* strains by GC-FID and GC–MS based metabolomics. **J. Chromatogr. B**, v. 871, p. 220-226, 2008.
- VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Simultaneous analysis of amino and non-amino organic acids as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Biochem.**, v. 322, n. 1, p. 134-138, 2003.
- WAN, M. et al. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 835–844, 2011.
- WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 24, p. 405-413, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Free amino acids and small molecular acids profiling of marine microalga *Isochrysis zhangjiangensis* under nitrogen deficiency. **Algal Res.**, v. 13, p. 207-217, 2016.
- ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 41, p. 1376- 1384, 2015.

Manuscrito 2**CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DA MICROALGA *SCENEDESMUS*
OBLIQUUS CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR**

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi caracterizar os ácidos orgânicos, os aminoácidos e os ácidos graxos ao longo do crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada fotossinteticamente com iluminação constante. Os metabólitos foram extraídos pela mistura de solventes orgânicos (metanol-clorofórmio) com volume reduzido. Os compostos apolares foram derivatizados por catálise ácida. A derivatização dos compostos polares foi realizada utilizando derivatizante N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) em meio alcalino. A análise de ambas classes de compostos foi realizada por GC. O ácido succínico apresentou concentrações constantes a partir das 120 h de cultivo, enquanto os ácidos málico e cítrico tiveram aumento significativo de concentração às 336 h. Com exceção da alanina, ácido glutâmico e asparagina que apresentaram ápice em 336 h, as maiores concentrações aminoácidos foram observadas entre 120 e 288 h, que correspondem a fase exponencial de crescimento e maior densidade celular. O perfil de ácidos graxos apresentou mudança significativa entre as análises de 0 e 120 h. Primeiramente o cultivo foi caracterizado pela elevada concentração de ácidos graxos (AG) saturados e compostos de cadeia curta e média, a partir de 120 h foi detectado maior concentração de AG insaturados e de cadeia longa (≥ 20 carbonos). Em face disso, foi possível obter melhor entendimento e estabelecer relação entre vias biossintéticas das microalgas.

Palavras-chave: aminoácidos, ácidos orgânicos, ácido graxos, cromatografia em fase gasosa.

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares dotados de clorofila e outros pigmentos, constituindo um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação da energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese (GAVRISHEVA et al., 2015). Além da alta eficiência de conversão fotossintética, a capacidade de se desenvolver em diversos ecossistemas, taxas rápidas de produção de biomassa e produção de ampla gama de compostos de interesse estão entre as vantagens das microalgas frente a outros organismo fotossintéticos (ZENG et al., 2011).

A biotecnologia de microalgas tem se desenvolvido e proporcionado diferentes aplicações comerciais. Os pigmentos microalgais são empregados na indústria de alimentos e cosméticos (SPOLAORE et al., 2006). Compostos bioativos, como antibióticos, antioxidantes e toxinas, produzidos por algumas espécies apresentam importância farmacêutica (GARCIA-CASAL et al., 2009). Além disso, a biomassa microalgal pode ser utilizada como suplemento nutricional, devido ao elevado teor proteico, de vitaminas e polissacarídeos. Como também, importância energética, com a produção de biodiesel a partir de espécies com elevada síntese de lipídios (HARUN et al., 2010).

Atualmente, pesquisas tem se concentrado em explorar técnicas e processos a fim de elevar as taxas de produtividade das microalgas e maximizar as características de interesse

destes microrganismos, teor proteico, lipídico e de pigmentos (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010). Para tal, é necessário conhecimento das vias biossintéticas fundamentais e precursores dos compostos alvo das microalgas, considerando condições de cultivo pré-estabelecidas (LAMERS et al., 2008).

A caracterização dos metabólitos é uma ferramenta eficaz para elucidação e entendimento das vias metabólicas desempenhadas pelas microalgas, além dos mecanismos de aquisição e acúmulo de carbono (WU et al., 2009). Dessa forma, o monitoramento dos metabólitos ao longo do desenvolvimento desses microrganismos fornece informações básicas a nível de metabolismo, pouco abordadas na literatura (WINCK, MELO, BARRIOS, 2013). Estas informações são importantes também para manipulação de processos a fim de aumentar a produtividade e modificar a composição da biomassa microalgal.

Em face disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar os ácidos orgânicos, os aminoácidos e os ácidos graxos ao longo do crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada fotossinteticamente com 24 h de iluminação.

MATERIAL E MÉTODOS

MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTURA

As culturas da microalga *Scenedesmus obliquus* (UTCC5), foram propagadas e mantidas em meio sintético BG11 (Ripka et al., 1979) em pH 8,0. As condições utilizadas foram 25 °C, 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luminosidade e fotoperíodo de 12 h (escuro/claro).

FOTOBIORREATOR

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator de coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro de 4 mm de espessura, com um diâmetro interno de 7,5 cm e uma altura de 75 cm, perfazendo um volume nominal de trabalho de 3,0 L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 1,5 cm de diâmetro, localizado no centro da coluna. O reator foi iluminado com 20 lâmpadas fluorescentes de 15 W, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. A alimentação dos gases foi provida através de ar comprimido e um cilindro de dióxido de carbono (CO_2) industrial. A mistura ar/ CO_2 foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de CO_2 , ar e a mistura entre os gases respectivamente.

OBTENÇÃO DOS DADOS CINÉTICOS

Os experimentos foram realizados em biorreatores, operando em regime intermitente, alimentados com 2,0 L de meio sintético BG11. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de 100 mg/L, temperatura de 26 °C, intensidades luminosas de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e aeração contínua de 1 VVM com injeção de ar enriquecido com 15% dióxido de carbono. Foi avaliada iluminação constante (24 h). A concentração celular foi monitorada a cada 24 h durante as fases de crescimento de microrganismo.

MÉTODOS ANALÍTICOS

A concentração celular foi determinada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,45 mm, seco a 60 °C por 24 horas (APHA, 1998). A intensidade luminosa foi determinada a partir de medidas na superfície externa do reator, através de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de $\pm 4\%$). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO_2 foram determinadas por rotômetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de $\pm 5\%$).

PARÂMETROS CINÉTICOS

A produtividade em biomassa (P_X) foi determinada através da relação entre a variação da concentração celular em um determinado intervalo de tempo, conforme indica a Equação 1:

$$P_X = \frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \quad (1)$$

ONDE:

X_i - concentração celular no t_i ;

X_{i-1} - concentração celular no t_{i-1} ;

t - tempo de residência;

EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

Os metabólitos foram extraídos pelo método descrito por Bligh e Dyer (1959) com modificações. Cerca de 100 mg de biomassa microalgal foram adicionados de 3 mL de metanol, 1,5 mL de clorofórmio e 1,2 mL de água destilada. A extração ocorreu através da

agitação das amostras por 30 min a 250 rpm em mesa agitadora (Q225M, Quimis – BR) a 250 rpm por 30 minutos, com os tubos dispostos horizontalmente. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada e novamente agitados em mesa agitadora por 4 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas (MTD III PLUS, Metroterm – BR) a 1370 g por 2 minutos para separação das fases. As fases orgânica e aquosa foram reservadas para análise dos metabólitos apolares e polares, respectivamente.

DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS APOLARES

A fase orgânica contendo os lipídeos foi transferida para tubos de ensaio de 10 mL com adição de 250 µL de padrão interno (Pi) com concentração de 4 mg/mL de tricosanoato de metila (C23:0Me) (Sigma-Aldrich - USA) em iso-octano. Os solventes foram evaporados em bomba de hidrovácuo (Q355J, Quimis - BR) e bloco de aquecimento (Concentrator e Dry, Technal - BR) a 40 °C. A derivatização foi realizada segundo o método descrito por Hartman e Lago (1973). Assim, a fração lipídica foi adicionada de 1 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio (0,4 M) e mantida em banho-maria (500, Fisatom – BR) a 100 °C por 10 min. Após, os tubos foram resfriados e adicionados de 3 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1 M) e novamente submetidos a 100 °C por 10 min. Em seguida, os tubos foram resfriados e adicionados de 2 mL de hexano, sendo homogeneizados em vórtex (MX-S, SCIOLOGEX – USA) por 30 segundos. Posteriormente, foi realizada a retirada da fase superior do tubo contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) dissolvidos em hexano para análise cromatográfica.

Os FAME dissolvidos em hexano foram analisados pela injeção de 1 µL em cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) da marca Varian, modelo Star 3400 CX (USA) e amostrador automático Varian, modelo 4200 (USA). Os FAME foram separados em coluna capilar CP-Wax 52 CB (Chrompack - NL) (50 m × 0,32 mm × 0,20 µm). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 15 psi. O injetor manteve-se no modo *splitless* por 0,6 min seguido de *split* com razão 20:1 e temperatura de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 50 °C, onde permaneceu 1 min, aumentando para 180 °C com taxa de 20 °C/min, após até 200 °C com taxa de aumento de 2 °C/min e então com taxa de 10 °C/min até atingir 230 °C mantendo-se em isoterma por 8 min. O detector manteve-se na temperatura de 240 °C. A identificação dos FAME foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos analitos com padrões FAME Mix-37 (Sigma-Aldrich

- USA). Os resultados foram expressos em massa de FAME/ massa de amostra, a partir do uso do Pi de massa conhecida e dos fatores de correção do FID.

DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS POLARES

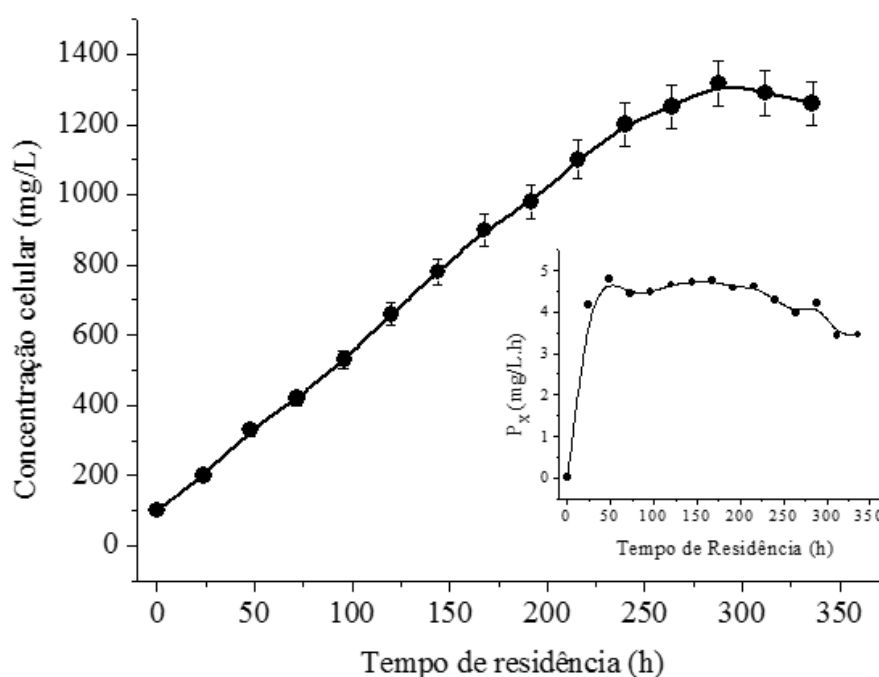
A derivatização dos metabólitos polares extraídos da biomassa microalgal foi realizada de acordo com o método descrito por OMS-OLIU et al. (2011). Foram secos 150 µL do sobrenadante do extrato metanólico e 150 µL da solução contendo o padrão interno DL-norleucina na concentração de 25 µg/mL em bomba de hidrovácuo (Q355J, Quimis - BR) e bloco de aquecimento (Concentrator e Dry, Technal - BR) a 60 °C. Então, foram adicionados 40 µL de cloridrato de hidroxilamina em piridina na concentração de 20 mg/mL e as amostras incubadas em banho seco a 38 °C por 90 minutos. Posteriormente, foram adicionados 60 µL de N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) e novamente incubadas a 38 °C por 30 minutos. As amostras foram transferidas para frascos de vidro de 200 µL e então analisadas.

As amostras foram analisadas pela injeção de 1 µL em cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) da marca Varian, modelo Star 3400 (USA) e amostrador automático Varian, modelo 8100 (USA). Os analitos foram separados em coluna capilar RTX-5MS (Restek - USA) (30m × 0,25 mm × 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 15 psi. O injetor manteve-se no modo *splitless* por 1 min seguido de *split* com razão 30:1 e temperatura de 320 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, onde permaneceu por 2 min, aumentando para 165 °C com taxa de 2 °C/min. Após, com taxa de 5 °C/min até atingir 200 °C e então até 280 °C com taxa de 3 °C/min mantendo-se em isoterma por 5 min. O detector manteve-se na temperatura de 320 °C. Os metabólitos encontrados nas amostras foram positivamente identificados pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa com os das soluções contendo os analitos padrão, obtidos em cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/MS) Shimadzu, QP-2010 Plus (JAP) nas mesmas condições cromatográficas descritas acima, utilizando hélio como gás de arraste, operando no modo de ionização por elétrons (EI) a 70 eV com varredura de 50 a 500 m/z. A quantificação foi realizada pelo método de padronização interna, comparando-se as áreas obtidas de soluções de concentrações conhecidas do padrão contendo a mistura dos aminoácidos e ácidos orgânicos com as áreas obtidas das amostras por meio de uma curva. Os demais parâmetros de mérito foram validados conforme descrito no Capítulo 1 desta dissertação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos parâmetros cinéticos da produção de biomassa de microalgas é um passo fundamental na consolidação do processo. Nesse aspecto, a Figura 1 apresenta a curva de crescimento e a dinâmica da produtividade celular da *S. obliquus* cultivada fotossinteticamente.

Figura 1. Curva de crescimento e produtividade celular da *S. obliquus*.



As culturas indicaram a ausência da fase de adaptação com a obtenção da fase estacionária em aproximadamente 264 h de cultivo. A máxima concentração celular obtida foi de 1320 mg/L o que corresponde a uma produtividade celular (P_x) média de 4,2 mg/L.h. Adicionalmente, foram registrados uma velocidade máxima específica de crescimento de $0,017 \text{ h}^{-1}$.

Foram observadas variações no teor de ácidos orgânicos ao longo das análises (Tabela 1). O ácido succínico apresentou concentrações constantes a partir das 120 h, enquanto os ácidos málico e cítrico tiveram aumento significativo de concentração às 336 h. A detecção destes ácidos nas análises realizadas ao longo do crescimento da microalga *S. obliquus*, evidencia a ocorrência do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (TCA) após a fixação do carbono inorgânico pelo Ciclo de Calvin na fotossíntese.

Tabela 1. Metabólitos endógenos da microalga *S. obliquus* ao longo do seu crescimento.

Metabólitos	0 h	120 h	288 h	336 h
Aminoácidos				
Alanina	0,162	0,905	0,751	0,960
Glicina	0,047	0,211	0,222	0,117
Valina	0,023	0,187	0,167	0,138
Leucina	0,019	0,248	0,216	0,076
Isoleucina	-	0,100	0,084	0,065
Prolina	0,020	0,921	0,995	0,071
Metionina	-	0,063	0,052	0,029
Serina	0,035	0,155	0,132	0,078
Treonina	-	0,201	0,269	-
Fenilalanina	0,011	0,110	0,098	0,035
Ácido aspártico	0,053	-	0,172	0,059
Ácido glutâmico	1,090	0,069	0,145	1,179
Asparagina	-	-	-	0,079
Lisina	-	0,109	0,060	0,074
Tirosina	0,028	0,072	0,075	0,065
Ácidos orgânicos				
Ácido succínico	0,034	0,276	0,275	0,211
Ácido málico	0,022	0,062	0,041	0,153
Ácido cítrico	0,003	0,002	0,003	0,087
Ácidos graxos				
C13:0	-	0,204	0,225	0,253
C14:0	0,316	0,660	0,478	0,511
C15:0	-	0,144	0,141	0,145
C16:0	15,894	22,813	18,514	14,212
C16:1	12,426	2,125	2,115	2,327
C17:1	0,436	-	-	-
C18:0	1,135	-	-	-
C18:1n9c	3,874	10,616	8,363	5,782
C18:2n6c	8,894	7,581	7,016	5,445
C18:3n6	0,266	0,914	1,455	1,137
C18:3n3	2,657	15,851	18,635	13,753
C20:1	-	0,103	0,099	0,075
C20:5n3	-	0,095	0,117	0,080
C22:1	-	0,050	0,056	0,060
Σ SFA	17,34	23,82	19,35	15,12
Σ MUFA	13,99	12,89	10,63	8,24
Σ PUFA	11,81	24,44	27,22	20,41
n6/n3	3,45	0,53	0,45	0,48

* Resultados expressos em mg/g de biomassa.

Os compostos que participam do TCA são precursores e fazem parte de importantes rotas metabólicas para síntese de produtos microalgais de interesse, como aminoácidos, ácidos graxos, pigmentos (Figura 2) (SASAKI et al., 2002; BROMKE, 2013; SAHU et al., 2013).

A fotossíntese das microalgas baseia-se principalmente no ciclo de Calvin em que a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) combina-se com o CO₂ para produzir duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) que é utilizado para a síntese da glicose e outros metabolitos (JOHN et al., 2011). Uma das moléculas de 3-PGA é convertida a fosfoenolpiruvato, a partir do qual são originados o piruvato e o acetil coenzima A (acetil-CoA). O acetil-CoA é então convertido a ácido cítrico, a partir do qual são desencadeadas reações subsequentes do TCA (LI e LIAO, 2013).

Com exceção da alanina, ácido glutâmico e asparagina, as maiores concentrações aminoácidos foram observadas entre 120 e 288 h, as quais representaram o crescimento e a maior densidade celular (Tabela 1). O ápice de concentração destes metabólitos coincide com a maior demanda proteica, necessária a multiplicação celular, visto que os aminoácidos são as unidades básicas das proteínas (EGYDIO et al., 2013).

Microalgas apresentam de modo geral uma composição de aminoácidos livres bastante semelhantes ao longo do crescimento, a qual é caracterizada por baixas concentrações de histidina e lisina e uma prevalência de alanina, ácido glutâmico e ácido aspártico. O perfil obtido para *S. obliquus*, apresentou estas características, com exceção do ácido aspártico que foi detectado em concentrações intermediárias aos outros compostos. O elevado conteúdo de alanina e ácido glutâmico é resultante da sua estreita relação com o metabolismo do ácido tricarbóxico (Figura 2) (SCHEUER, 1980).

As elevadas concentrações de ácido glutâmico podem estar relacionadas também a um importante derivado, o ácido 5-aminolevulínico (ALA). O ALA é o precursor de tetrapirroles de porfirina, tais como, a vitamina B12 e a clorofila, e também é um intermediário chave na regulação da biossíntese de tetrapirroles (Figura 2). A formação de ALA a partir do ácido glutâmico é específica de plantas superiores, algas e microalgas conhecida como via C5 (KANG et al., 2011).

Kovacik et al. (2010) reportaram o perfil de aminoácidos livres obtido ao fim do cultivo de *Scenedesmus quadricauda* empregando cromatografia líquida com detector fluorimétrico. Ao se comparar a análise feita por GC-FID em 366 h da *S. obliquus*, que também representa o fim do crescimento da microalga, foi possível verificar um perfil próximo, com destaque aos aminoácidos majoritários ácido glutâmico, alanina e glicina.

Os aminoácidos podem representar até um terço do carbono que é fixado pelas microalgas (MARKOU, VANDAMME, MUYLAERT, 2014). O nitrogênio (N) é incorporado as estruturas de carbono para a biossíntese dos aminoácidos primários, o ácido glutâmico e a glutamina, os quais servem como doares de N para a biossíntese dos principais compostos de N de organismos fotossintéticos, incluindo outros aminoácidos, bases de ácido nucléico, poliaminas, e as clorofilas (TORRE et al., 2014). Estes compostos são sintetizados a partir do 3-PGA, fosfoenolpiruvato, piruvato, α -cetogluturato e oxaloacetato (Figura 2).

Foram encontrados diferentes perfis de AG ao longo do crescimento da microalga *S. obliquus*. Em 0 h os AG saturados representaram a maior concentração do perfil, sendo o ácido palmítico (C16:0) o composto majoritário. Em 166 h foi possível observar o aumento na concentração de AG insaturados e também surgimento de compostos de cadeia longa (≥ 20 carbonos) com ápice de concentração destes compostos em 288 h, onde o ácido alfa-linolênico (C18:3n3) superou a concentração do até então majoritário C16:0 (Tabela 1). Tonon et al. (2002), também observaram diferenças nos perfis de AG de *Nannochloropsis oculata*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira pseudonana* e *Pavlova lutheri*, com maiores concentrações de AG insaturados na fase exponencial de crescimento.

No perfil de *S. obliquus* em 0 h não foram detectados AG de cadeia longa (≥ 20 carbonos), além de concentração inferior de insaturados, já em 166 h foi evidenciada a presença destes AG, indicando que as reações de alongamento e dessaturação de cadeia ocorreram neste intervalo de tempo.

A biossíntese de ácidos graxos em microalgas ocorre principalmente no cloroplasto e produz o C16:0 e o C:18-ACP (proteína carreadora de acila). Estes AG serão os precursores da síntese de lipídios. A síntese é iniciada pela conversão de acetil-coenzima A (CoA) a malonil-CoA, catalisado por acetil-CoA carboxilase (ACCase). Em seguida, a malonil-CoA-transacilase ACP (MAT) catalisa a transferência de malonil-CoA para malonil-ACP, doador de carbono para as reações subseqüentes de alongamento de cadeia (RISMANI-YAZDI et al., 2011).

Durante a elongação, o grupo malonil do malonil-ACP participa de uma série de reações de condensação com o acil-ACP (ou acetil-CoA) catalisadas pelas múltiplas isoformas da enzima de condensação, cetoacil-ACP sintase (KAS). A primeira reação de condensação é catalisada pela β -cetoacil-ACP sintase III e resulta na formação de um produto com quatro carbonos. Outra enzima de condensação é a β -cetoacil-ACP sintase I (KAS I), que produz cadeias de vários tamanhos (6 a 16 carbonos). Finalmente, a β -cetoacil-ACP sintase II (KAS II) é responsável pela elongação do C16:0-ACP e C18:0-ACP. Para a síntese de AG insaturados, uma dupla ligação é introduzida no grupo acila esterificado a ACP pela enzima acil-ACP dessaturase (RISMANI-YAZDI et al., 2011).

CONCLUSÃO

A caracterização dos metabólitos da *S. obliquus* ao longo do seu desenvolvimento permitiu maior entendimento de produtos formados em um cultivo fotossintético a partir do 3PG, primeiro produto estável obtido a partir da fotossíntese. Ademais, foi possível estabelecer relação entre algumas das vias biossintéticas deste microrganismo.

Este trabalho apresentou informações importantes para um maior entendimento do metabolismo das microalgas. Necessitando ainda mais estudos para avaliar a influência de diferentes condições de cultivo e também a determinação de uma maior gama de compostos, principalmente, os que envolvem reações base das vias metabólicas que podem ocorrer em sistemas microalgais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington: American Public Health Association, 1998.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 7, 1959.

BROMKE, M .A. Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms. **Metabolites**, v. 3, n. 2, p. 294-311, 2013.

EGYDIO, A. P. M. et al. Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Ind. Crop. Prod.**, v. 45, p. 373-376, 2013.

GARCIA-CASAL, M. N. et al. Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. **Br. J. of Nutr.**, v. 101, p. 79-85, 2009.

- GAVRISHEVA, A. I. et al. Mass-energy balance analysis for estimation of light energy conversion in an integrated system of biological H₂ production. **Biofuel Res. J.**, v. 6, p. 324-330, 2015.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Practice**, v.22, p. 475-476, 1973.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renew. Sus. Ener. Rev.**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.
- JOHN, R. P. et al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 186–193, 2011.
- KANG, Z. et al. Metabolic engineering to improve 5-aminolevulinic acid production. **Bioeng. Bugs**, v. 2, n. 6, p. 342-345, 2011.
- KOVÁCIK, J. et al. Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Plant Sci.**, v. 178, p. 307–311, 2010.
- LAMERS, P. P. et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 11, p. 631-638, 2008.
- LI, H.; LIAO, J. C. Biological conversion of carbon dioxide to photosynthetic fuels and electrofuels. **Energy Environ. Sci.**, v. 6, p. 2892-2899, 2013.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Res.**, v. 65, p. 186-202, 2014.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renew. Sus. Energ. Rev.**, v. 14, p. 217–232, 2010.
- OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening and postharvest shelf-life. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 62, p. 7-16, 2011.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **J. Gen. Microbiol.**, v.111, p.1-61, 1979.
- RISMANI-YAZDI, H. et al. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. **BMC Genomics**, v. 12, p. 148-165, 2011.
- SAHU, A. et al. Fatty acids as biomarkers of microalgae. **Phytochemistry**, v. 89, p. 53-58, 2013.
- SASAKI, K. et al. Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, n. 1, p. 23-29, 2002.

SCHEUER, P. J. **Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives**. 3 ed. Academic Press: New York, USA, 1980. cap. 2, p. 97–99.

SPOLAORE, P. et al. A. Commercial applications of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 101, p. 87-96, 2006.

TONON, T. et al. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Phytochemistry**, v. 61, p. 15-24, 2002.

TORRE, F. et al. Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. **J. Exp. Bot.**, v. 19, p. 5527-5534, 2014.

WINCK, F. V.; MELO, D. O. P.; BARRIOS, A. F. G. Carbon acquisition and accumulation in microalgae *Chlamydomonas*: Insights from “omics” approaches. **J. Proteomics**, v. 94, p. 207- 218, 2013.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino acids**, v. 37, p. 1- 17, 2009.

ZENG, X. et al. Microalgae bioengineering From CO₂ fixation to biofuel production. **Renew. Sus. Ener. Rev.**, v. 15, p. 3252– 3260, 2011.

4 CONCLUSÃO GERAL

- O método de Bligh e Dyer com redução do volume de solventes foi eficiente para extração simultânea de aminoácidos, ácidos orgânicos e ácidos graxos microalgais;
- A derivatização dos compostos polares empregando cloridrato de hidroxilamina em piridina (2 mg/mL) e derivatizante MTBSTFA atendeu satisfatoriamente os parâmetros de validação que foram avaliados;
- A técnica de cromatografia em fase gasosa equipada com detector de ionização em chamas (GC-FID) mostrou-se adequada para a análise simultânea de aminoácidos e ácidos orgânicos microalgais;
- A caracterização destes metabólitos microalgais ao longo do crescimento permitiu maior entendimento da fixação do carbono inorgânico em um cultivo fotossintético;
- Como também, possibilitou estabelecer relação entre algumas das vias biossintéticas das microalgas;

5 SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar o número de compostos monitorados em cultivos microalgais, principalmente marcadores de rotas metabólicas;
- Avaliar os metabólitos microalgais em diferentes cultivos, afim de relacionar a formação destes compostos às condições externas;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EVA, I. A. et al. Investigation of organic systems by ion-photon spectroscopy. **Quantum Electron.**, v. 41, n.6, p. 564-567, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RE nº 899**, de 29/05/2003.

AHMED, Z. et al. Lipid-pro: a computational lipid identification solution for untargeted lipidomics on data-independent acquisition tandem mass spectrometry platforms. **Bioinformatics.**, v. 31, n. 7, p. 1150-1153, 2015.

ALBUQUERQUE, T. G. et al. Trends in the Analytical methods for the determination of *trans* fatty acids content in foods. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 22, p. 543-560, 2011.

ALDAI, N. et al. Derivation of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85 p. 1073-1083, 2005.

ALMSTETTER, M. F.; OEFNER, P. J.; DETTMER, K. Comprehensive two- dimensional gas chromatography in metabolomics. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, p. 1993- 2013, 2012.

ARAPITSAS, P. et al. Studying the effect of storage conditions on the metabolite content of red wine using HILIC LC–MS based metabolomics. **Food Chem.**, In Press, 2015.

ARAUJO, G. S. et al. Extraction of lipids from Microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal Extraction method. **Ultrason. Sonochem.**, v. 20, p. 95-98, 2013.

ASIF, M. General chemistry, composition, identification and qualitative tests of fats or oils. **J. Pharm. Res. Opin.**, v. 1, n. 2, p. 52-64, 2011.

BECKER, J. et al. Top value platform chemicals: bio-based production of organic acids. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 36, p. 168-175, 2015.

BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2. ed. Chichester: John Wiley e Sons, 1993.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 7, 1959.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae- their development and commercialization. **J. Appl. Phycol.**, v. 25, p. 743-756, 2013.

CALLEJÓN R. M.; TRONCOSO A. M.; MORALES M. L. Determination of amino acids in grape-derived products: a review. **Talanta**, v. 81, p. 1143–1152, 2010.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review . **Trends Food Sci. Technol.**, v. 20, p. 557–566, 2009.

CHRISTOU, C. et al. GC/ MS analysis of organic acids in human urine in clinical settings: A study of derivatization and other analytical parameters. **J. Chromatogr. B**, v. 964, p. 195-201, 2014.

CRAVOTTO, G. et al. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrason. Sonochem.**, v. 15, p. 898– 902, 2008.

DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Cellular Metabolism and Disease: What Do Metabolic Outliers Teach Us? **Cell**, v.148, p. 1132-1144, 2012.

DEMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Tradução Adriano Brandelli, et al. – 4. Ed.- Porto Alegre: Artmed, 2010.

DIETERLE, F. et al. NMR and MS methods for metabonomics. **Methods Mol. Biol.**, v. 691, p. 385–415, 2011.

- DULF, F. V. et al. Comparative studies on fatty acid fingerprint from total lipids and phytosterol esters of some edible plant oils. **Bulletin USAMV**, v. 62, p. 225-230, 2006.
- EGYDIO, A. P. M. et al. Free amino acid composition of *Annona* (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Ind. Crop. Prod.**, v. 45, p. 373-376, 2013.
- FRANCISCO, E. C. et al. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 37, p. 1497- 1505, 2014.
- GOODACRE, R. Metabolomics of a superorganism. **J. Nutr.**, v. 137, p. 259S- 266S, 2007.
- GRIMI, N. et al. Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. **Bioresour. Technol.**, v. 153, p. 254- 259, 2014.
- HALIM, R. et al. Microalgal cell disruption for biofuel development. **Appl. Energy**, v. 91, p. 116–121, 2012.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 14, p. 1037– 1047, 2010.
- HARVEY, D. J. Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 879, p. 1196- 1225, 2011.
- HU, C.; XU, G. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. **Trends Anal. Chem.**, v. 53, p. 36-46, 2013.
- HURTADO-FERNÁNDEZ, E. et al. Quantitative characterization of importante metabolites of avocado fruit by gas chromatography coupled to different detectors. **Food Res. Int.**, v. 62, p. 801- 811, 2014.
- IBÁÑEZ, C. et al. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. **Trends Anal. Chem.**, v. 52, p. 100-111, 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**. Revisão 3. Rio de Janeiro, 2010.
- JAMERS, A.; BLUST, R.; COEN, W. Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena. **Aquat. Toxicol.**, v. 92, p. 114–121, 2009.
- JIMÉNEZ-MARTÍN, E. J. et al. Gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of free amino acids as their dimethyl-tert-butylsilyl (TBDMS) derivatives in animal source food. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 2456–2463, 2012.
- KLOOS, D. et al. Analysis of biologically- active, endogenous carboxylic acids based on chromatography- mass spectrometry. **Trends Anal. Chem.**, v. 61, p. 17- 28, 2014.
- KOEK, M. M. et al. Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 1272-1281, 2006.

- KOEK, M. M. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 307- 28, 2011.
- KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Res.**, v. 6, p. 52-63, 2014.
- KUMAR, M.; SHARMA, M. P. Status of biofuel production from microalgae in India. **J. Integr. Sci. Technol.**, v. 2, n. 2, p. 72-75, 2014.
- LEE, S. et al. Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data- processing approaches. **J. Chromatogr. B**, v. 878, p. 2983- 2988, 2010.
- LEE, D. et al. Comparison of primary and secondary metabolites for suitability to discriminate the origins of *Schisandra chinensis* by GC/MS and LC/MS. **Food Chem.**, v. 141, p. 3931-3937, 2013.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: SARVIER, 2006.
- LOPEZ- BUCIO, J. et al. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant. Sci.**, v. 160, p. 1- 13, 2000.
- MAGALHÃES, C. E. C. et al. Métodos de preparo de amostras: **Fundamentos Sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar**. Krug, F. J., ed.; CENA/USP: Piracicaba, 2010.
- MANDALAKIS, M.; APOSTOLAKI, M.; STEPHANOU, E.G. Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 143-150, 2010.
- MARTENS- LOBENHOFFER, J; BODE- BÖGER, S. M. Mass spectrometric quantification of L- arginine and its pathway related substances in biofluids: The road to maturity. **J. Chromatogr. B**, v. 964, p. 89- 102, 2014.
- MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1141, p. 271- 278, 2007.
- MORALES-SÁNCHEZ, D. et al. Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 1-9.
- OMS-OLIU, G. et al. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening and postharvest shelf-life. **Postharvest Biol. Tec.**, v. 62, p. 7-16, 2011.
- PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quim. Nova**, v. 5, p. 1190-1198, 2008.
- PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. Gas chromatography/ mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. **J. Chromatogr. B**, v. 871, p. 202-211, 2008.

PIZZUTTI, K. K. et al. Method validation and comparison of acetonitrile and acetone extraction for the analysis of 169 pesticides in soya grain by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 4539–4552, 2009.

POOLE, C. F. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1296, p. 2-14, 2013.

RASHID, N. et al. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 40, p. 760- 778, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

RODIER, C. et al. Chemical derivatization of amino acids for in situ analysis of Martian samples by gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 915, p. 199- 207, 2001.

RUIZ-MATUTE, A. I. et al. Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. **J. Chromatogr. B**, v. 879, p. 1226-1240, 2011.

RYCKEBOSCK, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 89, p. 189-198, 2012.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - A review. **J. Food Eng.**, v. 95, p. 240–253, 2009.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae – A review. **Food Res. Int.**, v. 48, p. 948-960, 2012.

SANTOS, R. R. et al. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrason. Sonochem.**, v. 22, p. 95-99, 2015.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatography- mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **J. Chromatogr. B**, v. 713, p. 61:90, 1998.

SHAIKH, Z.; QURESHI, P. Screening and isolation of organic acid producers from samples of diverse habitats. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 2, n. 9, p. 39-44, 2013.

SHIN, H. et al. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. **Fuel**, v. 130, p. 66- 69, 2014.

VANTHOOR-KOOPMANS, M. et al. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresour. Technol.**, v. 135, p. 142-149, 2013.

WANG, H. et al. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. **Bioresour. Technol.**, v. 128, p. 745-750, 2013.

WEI, F. et al. Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. **Ultrason. Sonochem.**, v. 15, p. 938–942, 2008.

WELLS, R. J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 843, p. 1–18, 1999.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 24, p. 405-413, 2013.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino acids**, v. 37, p. 1- 17, 2009.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction and health. **Adv. Nutr.**, v. 1, p. 31-37, 2010.

YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. Deletion of glucose oxidase changes the pattern of organic acid production in *Aspergillus carbonarius*. **AMB Express.**, v. 4, p. 54, 2014.