



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MARIA ISABEL DE CARVALHO SOLER

**Extração e separação do carotenoide luteína através da
cromatografia líquida de alta eficiência**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

São Carlos

2021

MARIA ISABEL DE CARVALHO SOLER

Extração e separação do carotenoide luteína através da cromatografia líquida de alta eficiência

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

São Carlos
2021



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 11/2021/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA ISABEL DE CARVALHO SOLER

EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DO CAROTENOIDE LUTEÍNA ATRAVÉS DA
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus São Carlos

São Carlos, 30 de junho de 2021

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientadora	Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
Membro da Banca 1	Dra. Silvia Helena Govoni Brondi
Membro da Banca 2	Dr. Alex Virgílio



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva**, Professor(a), em 06/07/2021, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **0437234** e o código CRC **8515AB71**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.012971/2021-73

SEI nº 0437234

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

Resumo

A química contribui com a produção de inúmeros produtos fundamentais à humanidade, e atualmente a produção desses compostos leva em consideração a sustentabilidade ambiental, ou seja, visa utilizar técnicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes, reagentes ou a geração de subprodutos nocivos à saúde humana ou ao ambiente. Dentre esses compostos estão presentes os carotenoides, grupo de pigmentos que desempenha papel fundamental na saúde humana, podendo destacar seu efeito na resposta imune, na comunicação intracelular e no combate a doenças relacionadas ao envelhecimento. Destaque deve ser dado a luteína, carotenoide presente em frutas e vegetais que é utilizado na indústria alimentar como corante e possui atividade biológica potencial na prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares e de degeneração retinal. A fonte industrial natural desse carotenoide são as flores da calêndula (*Tagetes erecta* L.) que possuem baixo conteúdo de luteína. Uma das fontes de obtenção da luteína e de diversos outros carotenoides são as microalgas, organismos com grande potencial biotecnológico que podem ser cultivados em ambientes controlados ou tanques abertos na presença de luz solar ou artificial. Para a obtenção da luteína através de microalgas é preciso extraí-la, através da quebra da parede celular e posteriormente purificá-la. O método de extração mais comumente utilizado é a extração com solventes e como os carotenoides são lipossolúveis é comum a realização de uma etapa de saponificação, com finalidade de remoção dos lipídeos que possam interferir na extração feita com solventes apolares. Após a extração, os carotenoides são separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Diante dos benefícios da luteína para a saúde, associado ao potencial das microalgas na produção deste carotenoide, o presente projeto estuda metodologias analíticas reportadas na literatura para extração da luteína de microalgas. As metodologias estudadas envolvem três processos cruciais: ruptura celular, saponificação e extração com solvente orgânico. Os métodos apresentados em Ceron *et al.* (2008) e em Utomo *et al.* (2008) relatam que a ruptura celular feita através da moagem resulta na melhor taxa de recuperação da luteína. O tratamento de saponificação mais utilizado nos estudos tem como agente alcalino o KOH em solução metanólica ou etanólica e Soares *et al.* (2016) constata que a etapa de saponificação em solução etanólica antes da extração da luteína com solvente, leva à simplificação do perfil cromatográfico da mistura de carotenoides.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura molecular da luteína.	8
Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia. . . .	13
Figura 3 – Ilustração de uma coluna cromatográfica.	14
Figura 4 – Componentes básicos de um equipamento para CLAE.	15

Lista de tabelas

Tabela 1 – Solventes mais utilizados na extração de carotenoides.	10
---	----

Sumário

1	Introdução	7
1.1	Importância da química na produção de compostos	7
1.2	Sustentabilidade ambiental: Química Verde	7
1.3	Carotenoides	7
1.4	Luteína e sua importância	8
1.5	Microalgas como fonte de Luteína	9
1.6	Extração dos carotenoides	9
2	Técnicas Analíticas	12
2.1	Cromatografia	12
2.2	Cromatografia líquida clássica	13
2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência	14
2.3.1	Instrumentação	15
2.3.2	Modos de separação	16
3	Tratamento da amostra	18
4	Validação do Método Analítico	19
5	Aplicações e Estudo de Caso da obtenção da Luteína a Partir das Microalgas	21
6	Conclusão	24
	Referências	25

1 Introdução

1.1 Importância da química na produção de compostos

A química contribui com a produção de inúmeros compostos fundamentais à humanidade e de grande importância comercial, como produtos alimentares, medicamentos, biocombustíveis, entre outros. Porém, essa produção gera uma quantidade significativa de subprodutos tóxicos que contaminam o ambiente e podem ser prejudiciais à saúde, o que vem aumentando a preocupação em aprimorar esses processos. Diante disso, a Química Verde foi proposta como um conceito responsável por desenvolver caminhos alternativos visando a diminuição de resíduos em diversos procedimentos. (PRADO, 2003)

1.2 Sustentabilidade ambiental: Química Verde

A Química Verde visa o desenvolvimento de tecnologias e materiais que propõem diminuir a poluição. A sua aplicação pode promover a passagem da abordagem tradicional de “comando e controle” à desejável “prevenção” de poluição, tornando desnecessárias as remediações dos impactos ambientais. (CORRÊA; ZUIN, 2009)

Segundo a WWVerde (2002) a Química Verde ou Green Chemistry pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes, reagentes ou a geração de produtos e subprodutos nocivos à saúde humana ou ao ambiente. Consiste na aplicação contínua de uma estratégia ambiental preventiva integrada aos processos, produtos e serviços para aumentar a eco-eficiência e reduzir os riscos ao homem e ao ambiente. Dentre os princípios da química verde propostos por Anastas e Warner (1998), os que estão mais relacionados à química analítica destacam-se: a prevenção da geração de resíduos, a utilização de reagentes mais seguros, o uso de sistemas mais eficientes de energia, a minimização ou eliminação de derivatização, a análise em tempo real para a prevenção da poluição e o emprego de práticas que minimizem acidentes. (KEITH; GRON; YOUNG, 2007)

1.3 Carotenoides

Os carotenoides são compostos de grande importância econômica e comercial. Eles compõem um grupo de pigmentos presentes na natureza, identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais. Esse grupo é amplamente distribuído na natureza, fornecendo coloração amarela, laranja ou vermelha a um grande número de vegetais, microorganismos e em alguns animais. (UENOJO; MARÓSTICA JUNIOR; PASTORE, 2007)

Os carotenoides também desempenham um papel fundamental na saúde humana, podendo destacar seu efeito na resposta imune, na comunicação intracelular e seus efeitos

benéficos contra doenças relacionadas ao envelhecimento, através do combate dos radicais livres. Há também alguns indícios de que os carotenoides em associação com outros componentes de frutas e vegetais apresentam efeito protetor contra algumas doenças crônicas, como o de cooperação entre o β -caroteno e as vitaminas C e E na proteção celular. (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000) Por apresentar essas características no combate de doenças, sua utilização também é explorada na indústria farmacêutica.

1.4 Luteína e sua importância

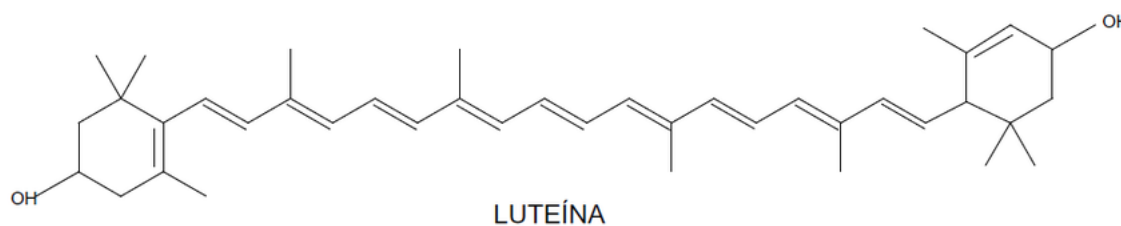
Diante da importância dos carotenoides para a saúde humana, destaque deve ser dado a luteína. A luteína (Figura 1) faz parte do grupo dos carotenoides pertencente às xantofilas não pró-vitamina A e se encontra presente em frutas, algas e vegetais (OLMEDILLA *et al.*, 1997), mais comumente em sua forma esterificada. Com grande potencial antioxidante, (CHOPRA; THURNHAM, 1993) alguns estudos mostram que este composto apresenta atividade biológica potencial na prevenção do câncer (KING *et al.*, 1997), de doenças cardiovasculares (DWYER *et al.*, 2000) e degeneração retinal (CHIU; TAYLOR, 2007) (GRANADO; OLMEDILLA; BLANCO, 2003).

Embora este carotenoide esteja presente em frutas e vegetais, sua ingestão diária é estimada em cerca de 1,5 mg/dia, teor este aquém das necessidades recomendadas que estão na faixa dos 5 - 20mg/dia. (COLEMAN; CHEW, 2007) Sendo assim, o consumo de suplementos de luteína é recomendável em alguns casos.

A luteína também é um corante alimentar muito utilizado na União Europeia e as vendas de luteína como aditivo alimentar nos Estados Unidos chegam a cerca de US \$ 150 milhões por ano. A fonte comercial natural de luteína pura é a calêndula (*Tagetes erecta* L.) porém, o conteúdo de luteína das flores dessa planta é baixo, 0,03% em peso seco, o que torna a busca por fontes alternativas interessante. (CERÓN *et al.*, 2008)

Diante desse cenário, temos os organismos algais como potenciais fontes deste carotenoide para suprir a demanda das indústrias farmacêuticas, nutracêuticas e alimentares.

Figura 1 – Estrutura molecular da luteína.



(SILVA *et al.*, 2010)

1.5 Microalgas como fonte de Luteína

Uma das fontes de obtenção de carotenoides, em especial da luteína, e de outros compostos naturais com alto valor no mercado mundial são as microalgas. São organismos com grande potencial biotecnológico já que a produção de sua biomassa é de interesse para a indústria alimentícia e seu cultivo pode ser feito em ambiente controlados ou tanques abertos, sempre na presença de luz, que pode ser solar ou artificial. (DERNER *et al.*, 2006)

No seu cultivo, uma atenção especial deve ser dada a fatores físico-químicos que controlam seu crescimento, como intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação. Portanto a composição bioquímica da biomassa algal, bem como a taxa de crescimento das microalgas são determinadas por estes fatores, associados com a espécie considerada. (MOURA JUNIOR *et al.*, 2006)(MEINERZ, 2007)

As microalgas são elementos de um grupo muito heterogêneo de organismos, predominantemente aquáticos e, geralmente, microscópicos unicelulares, procariontes ou eucariontes, dotados de pigmentos, responsáveis por coloração variada. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007)

Para extrair a luteína da alga cultivada, é preciso separar as células do meio de cultivo, realizar a quebra da parede celular afim de facilitar o depreendimento do analíto de interesse e então purifica-lá através da extração. (CHEN *et al.*, 2013) (KAO; CHEN; CHEN, 2011)

1.6 Extração dos carotenoides

Existe uma variedade de protocolos para a extração de carotenoides, mas como são estruturas complexas e diversificadas, alguns métodos acabam não sendo aplicáveis. O método mais comumente utilizado é a extração com solventes, que é realizada pela partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis, sendo geralmente um orgânico e um aquoso. Se o composto tiver lipofilicidade suficiente, ele será extraído pelo solvente mais orgânico. (CASS; DEGANI, 2019)

E como os carotenoides são lipossolúveis é comum realizar uma etapa de saponificação antes da extração, a qual tem a finalidade de remoção dos lipídeos que possam interferir na extração feita com solventes apolares. Esta saponificação é feita utilizando uma base em solução, como o hidróxido de potássio, em solvente polar, etanol, por exemplo, onde os carotenoides são posteriormente extraídos. A tabela (1) apresenta alguns solventes mais utilizados nesse tipo de extração.

Tabela 1 – Solventes mais utilizados na extração de carotenoides.

Amostra	Solvente de extração	Referência
Cenouras, grãos verdes e brócolis	Tetrahidrofurano	McINERNEY et al., 2007
Suco de tomate	Tetrahidrofurano	SÁNCHEZ-MORENO et al., 2006
Frutas vermelhas bulgarianas	Metanol:tetrahidrofurano (1:1, v/v)	MARINOVA;RIBAVORA, 2007
Calêndulas	Hexano	WANG et al., 2006
Palntas comestíveis da Tailândia	Hexano	CHANWITHEESUK et al., 2005
<i>Dunaliella salina</i>	Hexano:acetona:etanol (2:1:1, v/v/v)	HU et al., 2008
<i>Rhodotorula</i>	Éter etílico, acetato de etila e éter etílico/acetato de etila (1:1)	SQUINA; MERCADANTE, 2003

(SILVA et al., 2010)

A eficiência da extração depende da capacidade do solvente de solubilizar os pigmentos sem modificar sua estrutura. (SARKAR *et al.*, 2012) Portanto, a seleção de solvente é uma etapa importante, que deve apresentar alta eficiência e seletividade com os compostos extraídos. A maioria dos estudos de extração de carotenoides de microalgas envolvem uma única extração com solvente, mas em alguns estudos também foram utilizados sistemas de extrações binários, como em Aburai *et al.* (2010), que utilizou diclorometano (DCM) e metanol para a extração dos compostos.

Sendo o principal objetivo da extração a máxima recuperação, o solvente escolhido deve ser o menos polar da série e fornecer boa recuperação do analito com baixa extração dos interferentes. Se o composto for ionizável, o pH também deve ser levado em consideração. (CASS; DEGANI, 2019)

Outros fatores determinantes para o rendimento da extração dos pigmentos são: o tempo de contato entre a amostra e o solvente e a técnica (mecânica ou não mecânica) aplicada na quebra da parede celular. (HENRIQUES; SILVA; ROCHA, 2007)

A etapa de saponificação tem o objetivo de simplificar a separação dos pigmentos e obtê-los na forma livre, no entanto, este tratamento pode levar a degradação e perda de informações sobre o composto inicial. Por sua vez, os extratos não saponificados apresentam cromatogramas muito mais complexos. (ABURAI *et al.*, 2013); (KAO *et al.*, 2012); (SOARES *et al.*, 2016)

Após a extração, os carotenoides são separados por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) utilizando diferentes detectores, por exemplo, UltraVioleta, Espectrometria de Massas, entre outros. (KAO; CHEN; CHEN, 2011) (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2008)

2 Técnicas Analíticas

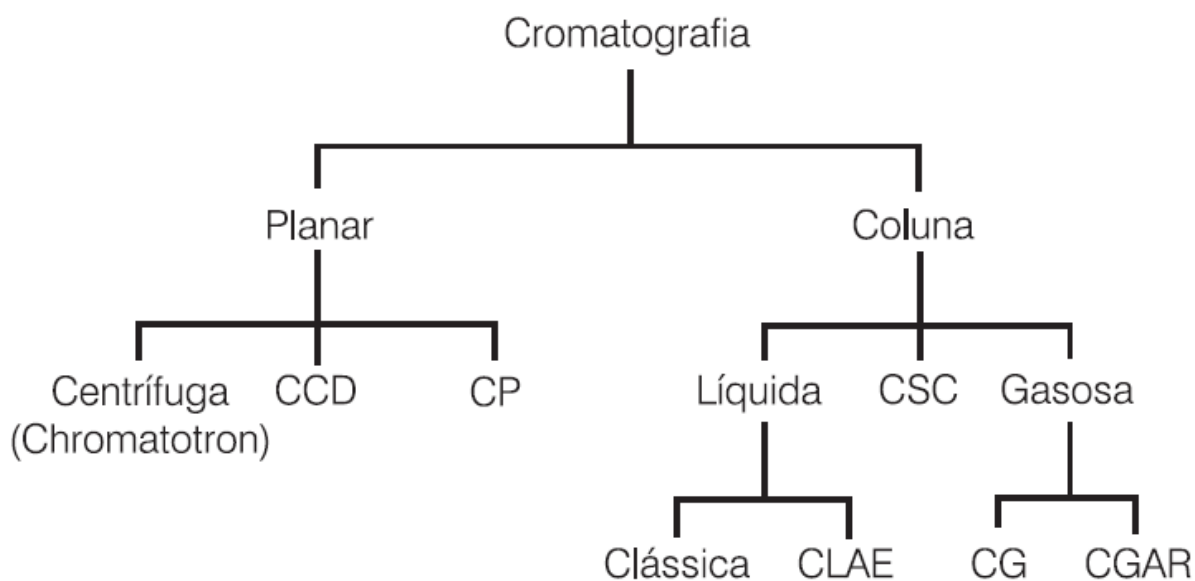
2.1 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentado na migração diferencial dos constituintes de uma mistura, que ocorre em função das diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Devido à grande diversidade de combinações entre essas duas fases, o método se torna-se aplicável em diversas áreas da química. A técnica pode ser utilizada para a identificação de compostos por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

Segundo A.L.G Degani *et al* (1998), podemos classificar a cromatografia em alguns subfatores, em relação à forma física do sistema empregado, planar (cromatografia em papel, cromatografia por centrifugação e a cromatografia por camada delgada) ou em coluna, que abrange diversos tipos. Em relação à fase estacionária utilizada: fases sólidas, líquidas e quimicamente ligadas, em relação ao modo de separação: adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou uma mistura desses mecanismos, e também podemos classificá-la em relação à fase móvel, em 3 tipos: a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica (CSC). Neste trabalho, ênfase foi dada à cromatografia líquida em coluna.

A cromatografia líquida possui uma classificação muito importante que se divide em cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel elui através de uma coluna apenas pela força da gravidade e na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na qual fases estacionárias de partículas menores são utilizadas, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A figura 2 esquematiza as subdivisões da cromatografia.

Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.

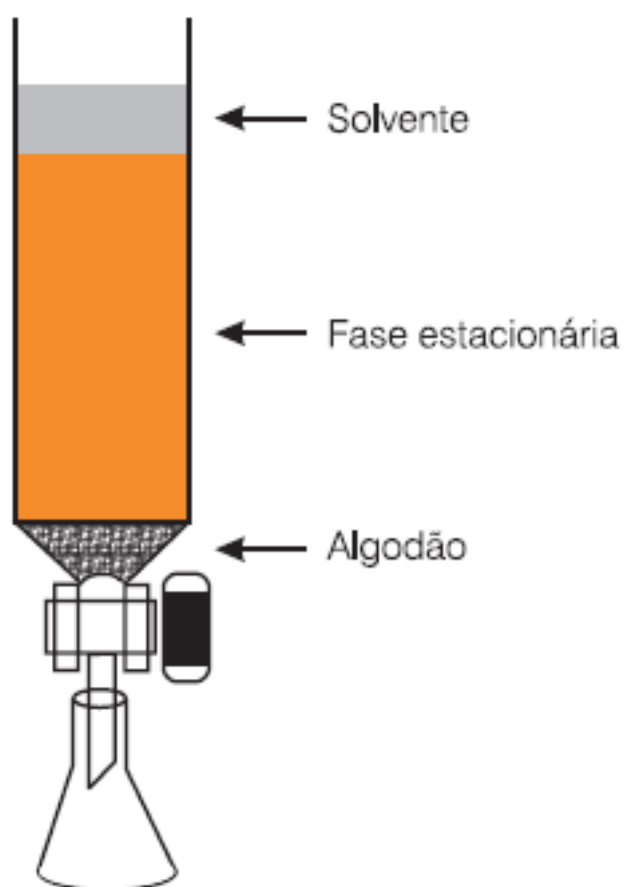


(DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

2.2 Cromatografia líquida clássica

A cromatografia líquida clássica é muito utilizada para o isolamento de produtos naturais e para a purificação de produtos de diversas reações químicas. As fases estacionárias mais comuns são a sílica e a alumina, porém, estes adsorventes podem ser utilizados também como suporte para uma fase estacionária em forma líquida. A figura 3 a seguir ilustra uma coluna cromatográfica empacotada com sílica. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

Figura 3 – Ilustração de uma coluna cromatográfica.



(DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

A separação dos componentes depende da sua adsorção pela fase estacionária, quanto mais fracamente o componente for adsorvido mais rápida será sua passagem pela coluna e vice-versa. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995)

A escolha da fase móvel é extremamente relevante, como as fases estacionárias a base de sílica utilizadas são extremamente polares, procura-se utilizar um solvente ou uma mistura de solventes com polaridade “média” em relação aos componentes da amostra, para que ele consiga eluir a amostra do ponto de aplicação, mas também tenha tempo suficiente para separá-la das impurezas. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

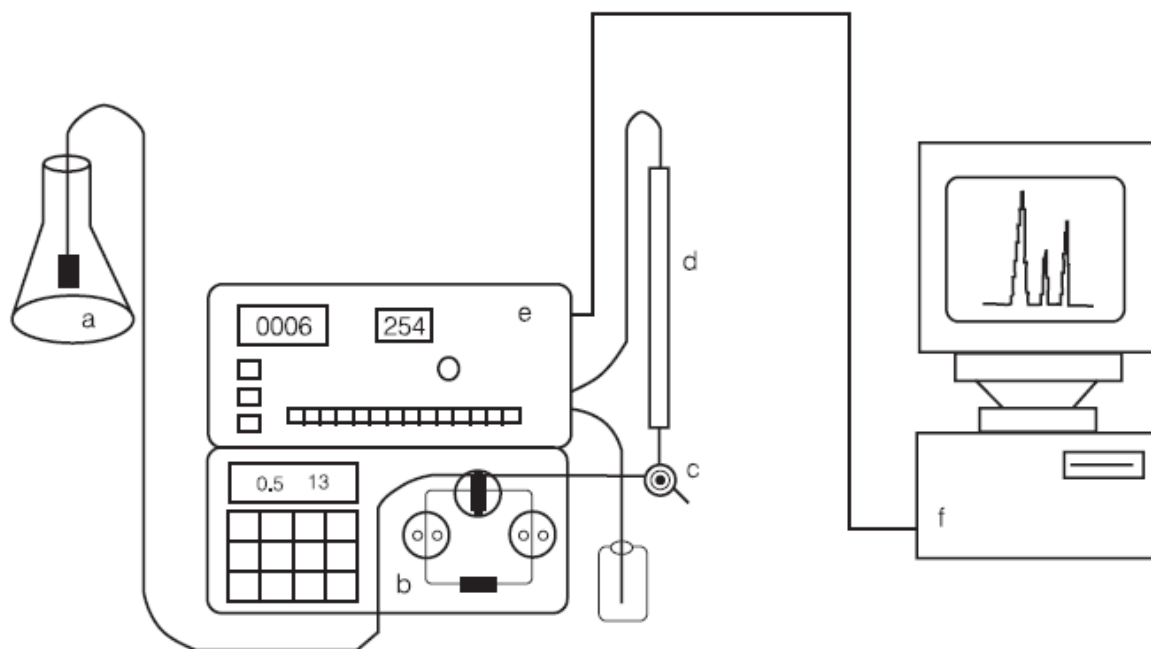
2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Com base na teoria da cromatografia gasosa, de que a eficiência de separação aumenta com a diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária, surgiu a base da teoria da Cromatografia líquida de alta eficiência. A principal diferença desse método para a cromatografia líquida clássica é a utilização de fases estacionárias menos permeáveis, com

micropartículas (10, 5 ou 3 μm) esféricas, o que tornou necessária a utilização de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel. (CASS; DEGANI, 2019)

A figura 4 mostra os componentes fundamentais de um equipamento para CLAE.

Figura 4 – Componentes básicos de um equipamento para CLAE.
Legenda: a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.



(DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

2.3.1 Instrumentação

As bombas cromatográficas utilizadas são as que produzem fluxo constante a uma pressão variável, o funcionamento delas baseia-se num pistão, movido por um motor elétrico. As válvulas de injeção possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, na posição LOAD a amostra é injetada na alça de amostragem e na posição INJECT libera a amostra para a coluna. As alças utilizadas geralmente são as de volume na faixa de 5-50 mL para injeções analíticas e 0,5-2 mL para preparativas. (CASS; DEGANI, 2019)

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente compostas de aço inoxidável, com diâmetro interno na faixa de 0,45 cm para separações analíticas e 2,2 cm para preparativas. O comprimento pode variar mas comumente colunas analíticas têm 5, 10 ou 15 cm e preparativas 25-30 cm. As colunas são reutilizadas por um grande número de injeções e são empacotadas com suportes de alta eficiência cromatográfica. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

Os detectores para CLAE são classificados em duas categorias: os não seletivos, que detectam propriedades existentes tanto na fase móvel como nos solutos; e os seletivos, que apenas detectam propriedades relacionadas ao soluto. O detector mais utilizado é o UV-Visível, que tem como princípio de funcionamento a absorção da luz visível, por parte da amostra, quando nela atravessa uma radiação magnética. Mas também são empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, eletroquímicos, de infravermelho, e recentemente os detectores de polarimetria para CLAE, que conseguem diferenciar compostos quirais através da rotação de seus estereoisômeros quando expostos à luz polarizada. (CASS; DEGANI, 2019)

Atualmente existem equipamentos totalmente computadorizados, divididos em módulos e podendo ser controlados por computador. Os softwares disponíveis já são capazes de detectar problemas de funcionamento e apontar necessidade de troca de peças. (CASS; DEGANI, 2019)

2.3.2 Modos de separação

Como visto anteriormente, podemos classificar a cromatografia líquida de acordo com a fase estacionária utilizada, levando-nos até a cromatografia de adsorção (fase estacionária sólida) e a cromatografia de partição (fase estacionária líquida). (CASS; DEGANI, 2019)

O mecanismo da separação por adsorção baseia-se na competição que existe para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária, entre as moléculas da amostra e as da fase móvel. Já na separação por partição, o mecanismo de distribuição baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária, portanto, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto os outros são transportados mais rapidamente pela fase móvel. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995)

Na cromatografia líquida de alta eficiência, as separações podem ocorrer por adsorção, partição ou ambos e o uso de suportes modificados quimicamente possibilitam a produção de uma grande variedade de colunas com diferentes propriedades e categorias diferentes de seletividade. Essas fases modificadas são chamadas de quimicamente ligadas e elas podem atuar tanto no modo normal quanto no modo reverso de eluição, isto é, podem atuar sendo mais polares que a fase móvel ou sendo menos polar que a fase móvel. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsílica) a mais utilizada, já para fins preparativos, fases que atuam no modo normal são preferidas, já que as fases móveis que atuam no modo reverso são constituídas por misturas aquosas. Devemos destacar também as fases estacionárias quirais, que integram um seletor quiral e possibilitam a separação direta de enantiômeros. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

A eluição cromatográfica pode ser realizada de dois modos: a eluição por gradiente,

que é realizada aumentando-se a força da fase móvel durante a separação cromatográfica, e a eluição isocrática, onde a força da fase móvel é constante.

3 Tratamento da amostra

Como dito anteriormente, as microalgas são organismos muito promissores para a produção de compostos de alto valor, como os carotenoides. No entanto, seu uso comercial é até agora dificultado pela falta de processos eficientes e atualmente viáveis para muito poucas cepas. Um dos fatores mais relevantes é o grande esforço para o processamento, por exemplo, da ruptura celular e da extração. (TAUCHER *et al.*, 2016)

Diante da sua importância, vários estudos foram realizados acerca da obtenção do carotenoide luteína e a maioria dos métodos de tratamento da amostra sugerem sua saponificação para um *clean up* da matriz, já que nela existem lipídeos que podem interferir na extração feita com solventes apolares. Nos estudos, após o tratamento da amostra, sua determinação é feita através do método de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-CLAE), devido à sua excelência eficiência de separação. (CHEN; TAI; CHEN, 2004)

A análise cromatográfica oferece um alto poder de resolução, sendo então a técnica mais utilizada também para carotenoides em geral. (KAO *et al.*, 2012) Para uma boa resolução cromatográfica, utiliza-se a eluição da fase móvel em gradiente e uma coluna C30 para uma separação simultânea de isômeros geométricos e de posição dos carotenoides. Marinova e Ribarova (2007) determinaram carotenoides em amostras de amora-preta utilizando-se uma fase móvel gradiente e uma coluna C18, e apenas 5 carotenoides foram separados em 20 minutos de análise. Em um posterior estudo utilizando amostras de suco de laranja concentrado e a eluição da fase móvel por gradiente, 27 carotenoides foram separados em 60 minutos utilizando uma coluna C30. Neste estudo, portanto, concluíram que a coluna C30 era mais adequada para essa separação. (MELENDEZ-MARTINEZ *et al.*, 2008).

Como o número de métodos analíticos de separação para carotenoides ainda é limitado, é fundamental o desenvolvimento de pesquisas acerca desses métodos de extração e análise. (KAO *et al.*, 2012)

4 Validação do Método Analítico

Após o desenvolvimento e otimização do método analítico que compreende a extração do analito de interesse e a análise cromatográfica, o mesmo necessita ser validado.

A validação de um método analítico é de extrema importância para garantir que o mesmo seja eficiente e produza resultados confiáveis. Os parâmetros a serem validados variam de acordo com: área de estudo, método utilizado, tipo de analito e de amostra e objetivo ao qual se destina o método desenvolvido. Os principais parâmetros de validação para análises cromatográficas são especificidade/seletividade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão. (BRITO *et al.*, 2003)(RIBANI *et al.*, 2004)

Segundo Cass e Degani (2019) deve estabelecer-se o modo que será realizado a medida da resposta do detector, que pode ser feito por meio da altura ou da área das bandas cromatográficas. A medida da altura da banda requer que a composição da fase móvel seja precisamente constante e a medida da área necessita de um fluxo extremamente preciso. Como atualmente as bombas não têm problemas de flutuação de fluxo, as medidas de área geralmente são preferidas.

A correlação entre a resposta do detector e a concentração do composto de interesse é chamada de calibração e a para a preparação de padrões construímos uma curva de calibração, ou seja, realizamos uma padronização, que pode ser feita de três modos:

Método do padrão externo: método mais utilizado e consiste na construção de uma curva de calibração a partir de soluções-padrão de concentrações conhecidas. Utiliza-se padrões com concentrações próximas às esperadas nas amostras, para assegurar a exatidão das medidas.

Método do padrão interno: abrange a adição de um padrão interno a cada amostra analisada. O padrão interno é um composto estável e puro, com retenção próxima a do analito e boa resolução em relação a este. Este método é usualmente escolhido quando a amostra requer um pré-tratamento rebuscado e nem sempre leva as medidas mais precisas por envolver dois picos ao invés de um.

Método da adição de padrão: baseia-se na adição de diferentes concentrações do analito à matriz. Este método é utilizado em casos onde não é possível a obtenção da matriz sem a presença do composto de interesse.

Para a validação do método analítico proposto temos de levar em consideração parâmetros como: a seletividade, que é a habilidade de separação do composto de interesse dos demais interferentes presentes na amostra; a linearidade, que é a capacidade do método de gerar resultados proporcionais à concentração do composto em questão; a exatidão, que é a relação entre o valor obtido pelo método e o valor de referência; a precisão, que é a habilidade do método de reproduzir o mesmo resultado sempre que o processo for executado; a robustez do método diante de pequenas variações no experimento, a

porcentagem de recuperação da amostra e a sensibilidade, que é a capacidade do método distinguir concentrações baixas. (CASS; DEGANI, 2019)

A avaliação da sensibilidade compreende a determinação dos limites de quantificação e detecção. O limite de quantificação é definido como a menor concentração do composto que pode ser medida com uma precisão especificada, dentro do critério de aceitação do método; e o limite de detecção é definido como a menor concentração do composto que produz uma resposta maior do que três vezes o ruído. (CASS; DEGANI, 2019)

5 Aplicações e Estudo de Caso da obtenção da Luteína a Partir das Microalgas

Dada a importância dos carotenoides, em específico da luteína, e os possíveis métodos de extração e purificação destes, os estudos a seguir apresentam métodos analíticos eficientes para a obtenção desses compostos. Ceron *et al.* (2008) desenvolveram um método analítico que permite a recuperação eficiente de luteína de biomassa de microalgas, sendo um método escalonável e aplicável industrialmente. O método utiliza a biomassa seca da microalga *Scenedesmus almeriensis* e compreende três etapas: a ruptura celular, o tratamento alcalino ou saponificação e a extração com solvente.

Na etapa de ruptura celular 3 métodos foram testados: maceração, moinho de bolas e ultrassom. Os resultados demonstraram que a ruptura celular é necessária e que a melhor opção entre os tratamentos testados no que diz respeito às aplicações industriais é a utilização de um moinho de bolas com alumina na proporção 1: 1 p/p como agente desintegrante por 5 min. Para a etapa do tratamento alcalino, os testes foram feitos variando a concentração da solução de KOH de 4% a 24% m/v. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20-22 °C) e utilizando frascos âmbar para evitar a degradação da luteína. A mistura do agente alcalino na solução foi feita sob agitação contínua afim de obter uma mistura o mais homogênea possível.

Ao fim, concluíram que as condições ideais foram obtidas usando 4% m/v de KOH para uma biomassa de concentração 100 g/L por 5 min. Tratamentos alcalinos mais longos ou o uso de concentrações mais altas de KOH reduziram o rendimento do processo. A extração foi realizada utilizando uma proporção de 1: 1 hexano para o volume da amostra, um total de oito etapas de extração são necessárias para recuperar 99% da luteína contida na biomassa processada. No entanto, o número ideal de etapas de extração é seis, 95% da luteína sendo recuperado.. (CERÓN *et al.*, 2008)

Soares *et al.* (2016) estudaram o melhor método de extração de luteína e β -caroteno para a microalga *Desmodesmus sp.* A avaliação foi feita considerando o melhor solvente ou mistura de solventes, pré-tratamento de biomassa seca e a saponificação em metanol e etanol. Os seguintes procedimentos foram avaliados: (i) extração da biomassa usando apenas hexano: etanol (1: 1, v / v), e (ii) pré-tratamento da biomassa seca com acetona seguido da extração da amostra usando hexano: etanol (1: 1, v / v).

Dois experimentos foram avaliados para a saponificação: o primeiro foi a saponificação alcalina em (i) metanol e (ii) etanol, seguido pela extração dos pigmentos livres com hexano: etanol (1: 1, v / v), e o segundo experimento testou a influência do pré-tratamento da biomassa com acetona antes da saponificação alcalina em (i) metanol e (ii) etanol seguido de extração de pigmentos livres com hexano: etanol (1: 1, v / v). Para a reação de saponificação, soluções de 8% (v / v) KOH metanólico e 8% (v / v) KOH etanólico foram testadas.

O método de análise cromatográfica foi baseado em Inbaraj *et al.* (2012): a fase

móvel CLAE-DAD foi (A) metanol: acetonitrila: água (84: 14: 2, v / v / v) e (B) diclorometano, usando as condições de gradiente: 100% A e 0% B por 14 min; 95% A por 25 min; 75% A para 30 minutos; 74% A por 35 min; 45% A por 50 min; e voltando a 100% A em 55 min, em 60 min de análise. A coluna foi mantida a 23 ± 2 °C. O volume de injeção do extrato foi de 20 μ L. A fase móvel foi bombeada em fluxo de 1 ml min⁻¹. O comprimento de onda de detecção foi ajustado em 450 nm.

Para a biomassa seca de *Desmodesmus sp.*, o sistema de extração bifásico hexano: etanol (1: 1, v / v) apresentou melhores rendimentos para a luteína e o β -caroteno quando comparados aos outros solventes testados. Mesmo que tenha proporcionado um aumento de extração de β -caroteno, o pré-tratamento de biomassa seca com acetona causou um decréscimo na extração de luteína, tornando esta etapa de pré-tratamento comercialmente inviável. Já a saponificação em solução etanólica antes da extração com solvente levou à simplificação do perfil cromatográfico da mistura convertendo pigmentos esterificados em pigmentos livres. O pré-tratamento com acetona por 1 h seguido da saponificação em solução etanólica e extração com hexano: etanol (1: 1, v / v) foi o melhor procedimento para a obtenção de melhores rendimentos ao extrair os pigmentos da biomassa seca. A análise cromatográfica permitiu identificar os principais pigmentos presentes na microalga *Desmodesmus sp.* como sendo: trans-zeaxantina, clorofila b, carotenos e a trans-luteína. (SOARES *et al.*, 2016)

Chao-Chin Hu *et al.* (2008) elaboraram uma metodologia analítica simples e com boa eficiência de separação, utilizando CLAE para determinar as formas trans e cis de carotenoides na *Dunaliella salina* cultivadas em Taiwan. A análise usou uma coluna C30 (250 x 4.6 mm, 5 μ L) e um sistema de solvente isocrático (taxa de fluxo = 1 mL/min) utilizando como solvente uma mistura de metanol-acetonitrila-água (84/14/2, v / v / v) e cloreto de metileno (75/25, v / v). O método de extração utilizado foi realizado sob atmosfera de gás nitrogênio utilizando como solvente hexano/acetona/EtOH (2/1/1, v / v / v) à temperatura ambiente por 24h. E a saponificação através da adição de KOH metanólico a 40% à temperatura ambiente por 8h. Os resultados mostraram que 7 carotenóides no extrato de algas puderam ser separados simultaneamente em 30 min e que eles foram detectados a 450 nm. (HU *et al.*, 2008)

Utomo *et al.* (2008) cultivaram células de *Chlorella sp.* ESP-6 em fotobiorreatores para a obtenção da biomassa e posterior extração da luteína. Utilizaram moagem, tratamento ultrassônico e tratamento de microondas como procedimentos de ruptura celular e concluíram que o processo de moagem recuperou mais luteína do que os demais. A extração foi feita com acetona e a mistura foi tratada com dietil éter seguido pela saponificação com 4% KOH metanólico. Posteriormente foi feita a adição de uma solução 10% v/v de NaCl, a fase orgânica foi coletada e seca no fluxo de nitrogênio.

Estudaram também a influência do procedimento de coagulação, testando a coagulação única antes da desidratação usando quitosana e o condicionamento duplo utilizando

cloreto de polialumínio e quitosana, técnica que foi proposta por Miron et al. (2002) para aumentar o fluxo de filtração e suavizar a incrustação do produto na superfície da membrana. Ao final do estudo concluíram que o processo aumentava efetivamente a eficiência de filtração da membrana, porém, a presença do coagulante tinha impacto adverso na recuperação da luteína devido a capacidade de atração dos grupos hidroxilas presentes nos dois grupos via ligações de hidrogênio. (UTOMO *et al.*, 2013; MIRÓN *et al.*, 2002)

6 Conclusão

Diante da importância de se obter uma extração eficiente de carotenoides, em específico da luteína, de fontes naturais, concluímos que o aprimoramento das metodologias analíticas já existentes é imprescindível.

Os trabalhos estudados compreenderam três etapas cruciais: ruptura celular, tratamento alcalino ou saponificação e extração com solvente.

Ceron *et al* (2008) concluiu que a melhor opção dentre os tratamentos testados para a ruptura celular e posterior extração da luteína foi a utilização do moinho de bolas. Utomo *et al* (2008) também constatou que a melhor taxa de recuperação da luteína foi obtida através do processo de moagem.

O tratamento alcalino mais utilizado nos estudos fez uso de KOH metanólico ou etanólico e Soares *et al* (2016) constatou que a etapa de saponificação em solução etanólica antes da extração da luteína com solvente leva à simplificação do perfil cromatográfico da mistura de carotenoides.

Referências

- ABURAI, N. *et al.* Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 237 – 243, 2013.
- BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, n. 13, p. 129 – 146, 2003.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação.** São Carlos: EdUFSCar, 2019.
- CERÓN, M. C. *et al.* Recovery of Lutein from Microalgae Biomass: Development of a Process for *Scenedesmus almeriensis* Biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11761 – 11766, August 2008.
- CHEN, C. *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1 – 10, 2013.
- CHEN, J.; TAI, C.; CHEN, B. Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 261 – 268, 09 2004.
- CHIU, C. J.; TAYLOR, A. Nutritional antioxidants and age-related cataract and maculopathy. **Experimental Eye Research**, v. 84, p. 229 – 245, 2007.
- CHOPRA, M.; THURNHAM, D. In vitro antioxidant activity of Lutein. . **In Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects**, p. 125 – 129, 1993.
- COLEMAN, H.; CHEW, E. Nutritional supplementation in age-related macular degeneration. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 18, p. 220 – 223, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 6. ed. [S.I.]: Editora da Unicamp, 1995.
- CORRÊA, A. G.; ZUIN, V. G. **Química Verde: histórico e sua inserção na agenda brasileira.** São Carlos: [s.n.], 2009.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, n. 7, 1998.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173 – 289, 2000.
- DERNER, R. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959 – 1967, December 2006.
- DWYER, J. H. *et al.* Oxygenated carotenoid lutein and the progression of early atherosclerosis. **The Los Angeles atherosclerosis study**, n. 103, p. 2922 – 2927, 2000.
- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 487 – 502, 2003.

- HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 1, p. 586 –, 2007.
- HU, C. C. *et al.* Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. **Food Chemistry**, v. 109, p. 439 – 446, 2008.
- KAO, T.; CHEN, C.; CHEN, B. Carotenoid composition in *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz as determined by HPLC–MS and affected by freeze-drying and hotair- drying. **Analyst**, v. 136, p. 3194 – 3202, 2011.
- KAO, T. H. *et al.* Determination of carotenoids in *Taraxacum formosanum* by HPLC-DAD-APCI-MS and preparation by column chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 144 – 153, 2012.
- KEITH, L.; GRON, L.; YOUNG, J. Green Analytical Methodologies. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2695 – 2708, May 2007.
- KING, T. *et al.* Metabolites of dietary Carotenoids as potential cancer preventive agents. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, p. 2135 – 2140, 1997.
- MEINERZ, L. I. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira**. 2007. 76 p. Dissertação (Mestrado) — Fundação Universidade Federal do Rio Grande.
- MELLENDEZ-MARTINEZ, A. *et al.* The complex carotenoid pattern of orange juices from concentrate. **Food Chemistry**, v. 109, p. 546 – 553, 2008.
- MIRÓN, A. S. *et al.* Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1015 – 1023, 2002.
- MOURA JUNIOR, A. M. *et al.* Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle. **Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 2, p. 142 – 148, 2006.
- OLMEDILLA, B. *et al.* Supplementation with Lutein (4 months) and a-tocopherol (2 months), in separate or combined oral doses, in control men. **Cancer Letters**, v. 114, p. 179 – 181, 1997.
- PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738 – 744, 03 2003.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. [S.l.: s.n.], 2007. v. 7.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, n. 27, p. 771 – 780, 2004.
- SARKAR, C. R. *et al.* A comparative study of carotenoid extraction from algae in different solvent systems. **Asian Journal of Plant Science & Research**, v. 2, n. 4, p. 546 – 549, 2012.

SOARES, A. *et al.* Improvement of the Extraction Process for High Commercial Value Pigments from *Desmodesmus* sp. Microalgae. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1083 – 1093, January 2016.

TAUCHER, J. *et al.* Cell disruption and pressurized liquid extraction of carotenoids from microalgae. **Journal of Thermodynamics & Catalysis**, v. 7, p. 1 – 7, 2016.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 03, p. 616 – 622, 02 2007.

UTOMO, R. P. *et al.* Lutein recovery from *Chlorella* sp. ESP-6 with coagulants. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 176 – 180, April 2013.