

Otimização de Processo de Determinação de Açúcares e Inibidores em Amostras Hidrolisadas de Microalga por meio de Análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Sofia Caroline M. Signorelli*, Dra. Telma Teixeira Franco, Dr Fernando Rodrigo Frederico.

Resumo

Esse projeto teve como objetivo a otimização do método de análise de açúcares, inibidores e ácidos orgânicos em HPLC já realizada em nosso laboratório tendo em vista a grande demanda da análise de amostras de microalga com o intuito da produção de bioetanol. Esse método demandou uma série de testes no cromatógrafo, para que obtivéssemos as melhores condições de temperatura interna e externa da coluna, tempo de corrida, volume de injeção, composição e vazão de fase móvel.

Palavras-chave

Açúcares, HPLC, Microalga

Introdução

A biomassa de microalga é fonte de diversos açúcares tais como xilose, glicose, dentre outros muito úteis como substratos para a produção, a partir da biomassa, de diversos produtos químicos de maior valor agregado, como por exemplo, o bioetanol, fonte de energia promissora tendo em vista o intenso desequilíbrio ambiental provocado pelo uso exacerbado de combustíveis fósseis.

No entanto, o tratamento anterior ao processo fermentativo, ao qual a microalga é submetida, gera compostos secundários, como o ácido acético, ácido lático, ácido levulínico e ácido fórmico, além de compostos indesejáveis, gerados pela decomposição de monossacarídeos, que atuam como inibidores do processo fermentativo, tais como o furfural e o 5 – Hidroximetil-furfural.

Visando a detecção e avaliação quantitativa e qualitativa dos açúcares presentes em uma amostra de biomassa de microalga hidrolisada, utiliza-se do *High performance liquid chromatography* (cromatógrafo líquido de alta performance) – HPLC.

No entanto, atualmente, utiliza-se de três corridas no cromatógrafo para a análise destes compostos, uma de açúcares, uma de inibidores e a terceira de ácidos orgânicos. Como o processo é demorado e a necessidade de resultados, de tais análises, é grande, visamos otimizar tal processo, realizando todas as análises em uma corrida única. Desta forma, é necessária uma coluna adequada e condições ideais de temperatura interna e externa da coluna, pressão da coluna, vazão, volume de injeção, tempo de corrida e fase móvel adequada para que obtenhamos a detecção de todos os compostos, de uma única vez, com uma separação de picos adequada para a posterior análise quantitativa e qualitativa.

Resultados e Discussão

Por meio de diversos testes com várias combinações de colunas, temperaturas, vazões de fase móvel e volume de injeção concluiu-se que as condições mais adequadas para a realização da corrida desejada, com açúcares, inibidores e ácidos orgânicos, seriam:

Tabela 1. Condições Adequadas para a corrida no HPLC

Coluna	SH1011
Temperatura Externa:	70°C
Temperatura Interna:	40°C
Volume de Injeção	2µL
Fase Móvel	Ácido Sulfúrico 0,01N
Vazão de Fase Móvel	0,8mL/min
Tempo de Corrida	45mim

Para a realização dos testes com as amostras reais de microalga, utilizamos da *chlorella vulgaris*. Visando realizar a corrida no HPLC foi necessário efetuar a quebra da parede celular da microalga, buscando a liberação dos açúcares, inibidores e ácidos orgânicos.

A quebra foi feita por meio da hidrólise ácida em autoclave. Para se obter as condições adequadas para o procedimento, foram feitos alguns testes, baseados na bibliografia[1], obtendo-se as seguintes condições: 0,31mL de ácido, 9,69mL de água, 0,60g de biomassa seca, tempo no autoclave: 50mim, temperatura do autoclave: 121°C

A quebra foi realizada com sucesso, o que pode ser confirmado por meio da visualização das células em microscopia.

Após a quebra, as amostras necessitaram ser centrifugadas e filtradas antes da injeção no HPLC.

A amostra de microalga apresentou quantidades significativas de glicose, xilose, HMF e furfural. Por meio do teste de glicose oxidase, confirmamos que a quantidade de glicose detectada por meio do método obtido de análise no HPLC foi coerente com o mostrado no teste de glicose oxidase, o que confirmou a eficiência do método.

Conclusões

Conclui-se que, por meio de uma corrida apenas, é possível a realização da análise de açúcares, inibidores e ácidos orgânicos de forma satisfatória, desde que se utilizem condições adequadas para tanto.

Agradecimentos

Agradeço a professora Dra.Telma Franco e ao Dr. Fernando Rodrigo Frederico por toda a ajuda que me proporcionaram neste projeto.

*PAULO FARIA. Dissertação Otimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol.2011.