

# Identificação e quantificação de fitormônios em biomassa de microalgas utilizando HPLC-PDA

Letícia Karen dos Santos<sup>1</sup>, Hugo Santana<sup>2</sup>, Simone Palma Favaro<sup>3</sup>, José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>4</sup>, Cesar Heraclides Behling Miranda<sup>5</sup>

## Resumo

A identificação e a quantificação de fitormônios em matrizes complexas, como biomassa de microalgas, pelo método atualmente utilizado, envolvem várias etapas de preparo da amostra, muitos consumíveis e análise por cromatografia de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada à espectrometria de massas (MS). Visando a simplificar e reduzir o custo analítico, este trabalho propõe um método que envolve etapas de extração, purificação, concentração e quantificação de fitormônios em um único extrato de biomassa de microalga, com a utilização de cartucho SPE C18 por UHPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (PDA). As fontes de biomassas constaram de três microalgas cultivadas em diferentes condições. O método apresentou boa linearidade para o ácido 3-indolacético (AIA) e o ácido salicílico (AS), principais alvos de interesse deste trabalho, com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) > 0,98. Análise de biomassa de algas crescendo isoladamente ou em cocultivo demonstrou que o método é sensível para detectar variações de concentrações de AIA e AS em função das condições de crescimento e competição entre elas.

**Termos para indexação:** ácido 3-indolacético, ácido salicílico, bioinsumos, estimuladores de crescimento vegetal, cromatografia líquida com arranjo de diodos.

## Introdução

Microalgas que produzem bioinsumos tais como fitormônios promotores do crescimento de plantas podem ser benéficas à produtividade agrícola. Os fitormônios são sinalizadores para indução de vários processos fisiológicos necessários ao metabolismo vegetal, incluindo compostos como ácidos abscísicos, auxinas, citocininas, giberelinas, estrigolactonas, brassinosteroides, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, além de polipeptídeos, aminoácidos, polissacarídeos e sideróforos (Toribio et al., 2020) e outros metabólitos secundários (Vaishampayan et al., 2001). Na literatura, destaca-se a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada à espectrometria de massa (MS) para identificação e quantificação desses compostos, em razão da sua elevada sensibilidade (Cao et al., 2016). Porém essa técnica envolve várias etapas de preparo da amostra, utiliza metanol 80% por 24 horas para extração e dois tipos de cartuchos (apolar SPE - Blond Elut Plexa PAX e polar SPE - Blond Elut Plexa PCX), além da necessidade de preparo de curvas analíticas com os padrões para calibração a cada vez que se usa a espectrometria de massas (MS) (Campos et al., 2020).

No presente trabalho, objetivou-se desenvolver um método alternativo para simplificação do procedimento de extração, purificação e concentração de fitormônios em amostras de microalgas, empregando-se UHPLC acoplado a detector de arranjo de diodos (PDA). Nessas condições, as amostras podem ser analisadas sem a necessidade de purificação completa do analito de interesse, o que aumenta a eficiência e a economia do processamento e da análise dos compostos de interesse. Em

<sup>1</sup> Tecnóloga em Biocombustíveis, doutora em Química, pesquisadora-colaboradora da Embrapa Agroenergia, leticia.santos@colaborador.embrapa

<sup>2</sup> Biotecnologia, doutor em Tecnologias Químicas e Biológicas, pesquisador-colaborador da Embrapa Agroenergia, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

<sup>3</sup> Agrônoma, doutora em Tecnologia de Alimentos, Pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.favaro@embrapa.br

<sup>4</sup> Farmacêutico, mestre em Ciência Farmacêuticas, Analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheiro-agrônomo, PhD em Microbiologia e Bioquímica do Solo, Pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

paralelo, com o objetivo de validar o método proposto, analisaram-se amostras de biomassa de microalgas selecionadas por apresentarem concentrações mensuráveis de ácido 3-indol-acético (AIA) e ácido salicílico (AS).

## Materiais e métodos

### Biomassa de microalgas

Utilizaram-se amostras de três acessos distintos de microalgas da coleção biológica da Embrapa Agroenergia, denominadas A, B e C, cultivadas em diferentes condições. Esses acessos, largamente contrastantes em morfologia, o que sugere pertencerem a diferentes espécies, ainda não foram identificados. O acesso A, que mostrou possuir concentrações mensuráveis de AIA e AS em análises em UHPLC-MS, foi cultivado individualmente, sendo inoculado em todos os casos no início do experimento; ou em mistura (cocultivo) com os acessos B e C, que foram inoculados em paralelo, no início do experimento, ou após 15 dias. O meio utilizado foi o BG11. As condições de cultivo foram: 1) condições controladas em laboratório, em bateladas de 1 L de meio em Erlenmeyer, temperatura ambiente constante a 25 °C, iluminação artificial por 12 horas/dia com luzes LED (500 Lux/m<sup>2</sup>) e aeração constante com ar comprimido na vazão de 4 cm<sup>3</sup>/min; 2) condições naturais, em casa de vegetação, em biorreatores com 20 L de meio, acrescidas de injeção de ar constante. Em todos os casos, a biomassa foi colhida após 30 dias da inoculação inicial, seca por liofilização e armazenada a -18 °C até o processamento e a análise.

### Fitormônios analisados

Como padrões de fitormônios, foram usados AIA; ácido 3-indolbutírico; ácido 3-indolpropionico; ácido abscísico; ácido jasmônico; ácido giberélico; AS; trans-zeatina; e trans-zeatina ribosídeo, todos da marca Sigma Aldrich. Preparou-se solução estoque de 1 mg/mL com acetonitrila 70% em água ultrapura, a qual foi mantida a -18 °C. Uma solução contendo todos os padrões na concentração de 10 µg/mL foi preparada a partir da solução estoque, e uma curva de calibração de AIA e AS foi construída a partir da solução estoque no intervalo de 0,5 µg/mL até 25 µg/mL.

### Extração dos fitormônios na biomassa de microalga

O teste de extração dos fitormônios nas amostras de biomassa das microalgas englobou os seguintes passos consecutivos: pesagem de 200 mg de amostra em tubos de 15 mL; adição de 2,5 mL de metanol 80% e agitação a 1.000 rpm no ThermoMixer por 5 min a 4 °C. Os tubos foram mantidos por 5 min no ultrassom a 20 °C, seguido de centrifugação a 18.928 x g por 5 min, transferindo-se a fração líquida (sobrenadante) para outro tubo Falcon de 15 mL. A biomassa sólida residual foi ressuspendida em metanol 80%, repetindo-se o procedimento de extração por mais duas vezes. Todas as alíquotas obtidas nas sucessivas extrações foram agrupadas, obtendo-se volume total de 7,5 mL, o qual foi seco no concentrador de amostra (Centrivap) a 40 °C overnight. Em paralelo, foi realizado um ensaio de extração utilizando-se a amostra fortificada (spiked) com 1 mL do mix de padrões na concentração de 10 µg/mL, além de um ensaio envolvendo todas as etapas de extração somente com o mix de padrões na concentração de 10 µg/mL.

### Separação dos fitormônios em cartucho de extração em fase sólida SPE C18-E

Para separação dos fitormônios presentes na biomassa, utilizou-se uma etapa de extração em fase sólida (SPE) utilizando-se cartuchos Strata C18-E (55 µm capacidade de 3 mL, ativados com acetonitrila e pré-condicionados com água). Os extratos concentrados foram ressuspendidos com 1 mL de água ultrapura, agitados no vórtex, e a mistura solubilizada foi carregada pelo cartucho, descartando-se o eluato. Repetiu-se o procedimento de ressuspensão com mais duas porções de

1 mL de água, sempre se descartando o eluato (etapa de lavagem). Para a eluição dos compostos de interesse, os extratos concentrados foram ressuspensos com três porções de 1 mL de mistura de acetonitrila:água. A cada ressuspensão, a mistura era carregada no cartucho, recolhendo-se e reunindo-se os eluatos em um tubo. Foram testadas as concentrações 50%, 70% e 75% de acetonitrila. Em seguida, os eluatos contendo os compostos de interesse foram evaporados no concentrador de amostra a 40 °C overnight. Depois, as amostras foram ressuspensas com 500 µL de acetonitrila 70%, transferidas para vials tipo taça e analisadas no UHPLC-PDA.

## Análise cromatográfica

A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra-alta performance (UPLC Acquity H-Class Waters, Estados Unidos) acoplado a um sistema de detector de arranjo de diodos (PDA). Os dados foram processados por meio do software Empower. As amostras foram analisadas na coluna ACQUITY Premier HSS T3 1.8µm VanGuard FIT 2.1 x 100 mm (Waters), na faixa de absorvância de 200 nm a 400 nm, com seleção no comprimento de onda de 210 nm e 220 nm. O volume de injeção foi 2 µL e a temperatura do forno foi mantida em 40 °C. O solvente (A) foi água ultrapura com 0,05% de ácido trifluoroacético e o solvente (B) foi acetonitrila com 0,05% de ácido trifluoroacético. As condições de eluição cromatográfica iniciaram o gradiente com 5% da solução B até 12 min, e 95% da solução B até 15 min, com o fluxo de 0,4 mL/min; entre 15 min e 17 min, o fluxo foi de 0,6 mL/min, com 100% da solução B; depois até 21 min, o fluxo foi 0,4 mL/min com 5% da solução B. Uma vez estabelecidas essas condições, analisaram-se as amostras e os padrões. Para verificação de eventuais perdas na etapa de lavagem das amostras e dos padrões, os eluatos descartados na preparação de cada uma delas foram reunidos e analisados.

## Resultados e discussão

As condições cromatográficas desenvolvidas neste trabalho proporcionaram a separação e a identificação de sete dos nove fitormônios analisados. Os tempos de retenção dos compostos apresentados na Figura 1, em minutos, foram os seguintes: pico 1 – trans-zeatina = 2,801; pico 2 – trans-zeatina ribosídeo = 3,088; pico 3 – ácido giberélico = 5,679; pico 4 – ácido 3-indolacético = 6,883; pico 5 – ácido salicílico = 7,117; pico 6 – ácido abscísico = 8,025; pico 7 – ácido 3-indolpropiónico = 8,321. Houve coeluição dos picos de ácido jasmônico e ácido 3-indolbutírico (picos 8+9), com tempo de retenção = 9,428, o que foi confirmado pela análise individual dos padrões desses fitormônios.

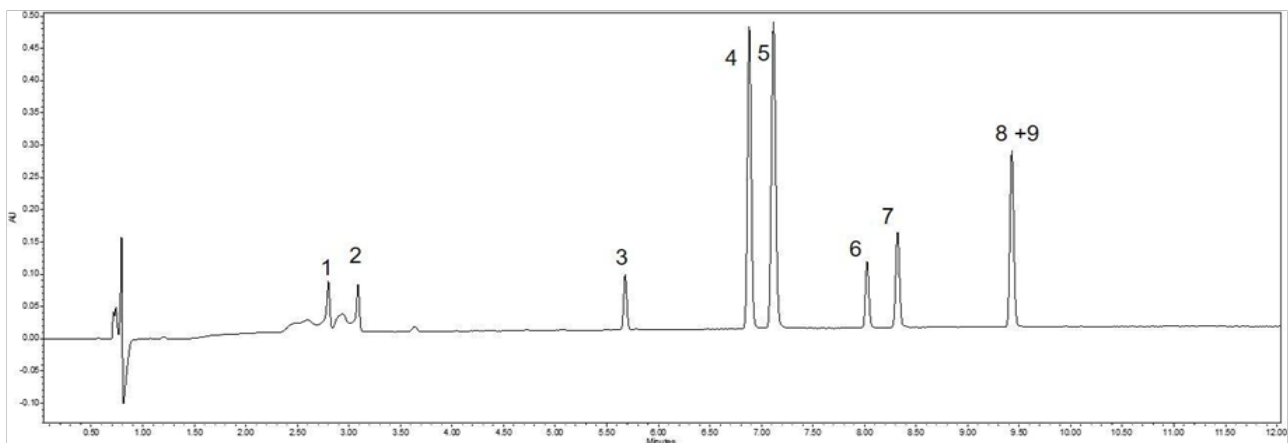


Figura 1. Cromatograma do mix de padrões de fitormônios 25 µg/mL em 210 nm.

A modificação realizada otimizou o processo de extração, que foi reduzido de 24 horas para 45 minutos, além de se usar apenas um cartucho, o SPE C18. Essa redução possivelmente foi por causa do rompimento das estruturas celulares com a agitação no Thermomix, seguida de ultrassom, com posterior concentração dos analitos no concentrador de amostras. Essa etapa não era feita no método anterior. A avaliação da fração aquosa dos eluatos da etapa de lavagem do cartucho com água mostrou que tal procedimento não causa perdas de fitormônios nas amostras e nos padrões. Essa etapa de limpeza é fundamental para garantir a vida útil da coluna cromatográfica, em razão da complexidade da matriz da amostra biológica, permitindo a remoção de uma quantidade significativa de compostos polares que não tem interesse analítico para o método proposto.

A melhor solução de acetonitrila:água para a eluição foi de 75%, que proporcionou recuperação acima de 99% para todos os fitormônios analisados. AIA, AS, abscísico, 3-indolpropionico, jasmônico e 3-indolbutírico apresentaram interações hidrofóbicas com a fase estacionária do cartucho, ocorrendo perdas na eluição quando se utilizou o extrator com menor força iônica. Suas recuperações foram reduzidas, variando de 49% (ácido 3-indolbutírico) a 70% (AIA), quando se utilizou acetonitrila:água 70%. Com acetonitrila:água 50%, a recuperação foi ainda menor, variando de 9% a 14% para esses mesmos fitormônios, ficando os demais em faixas intermediárias.

Após a otimização das condições experimentais de extração, foram construídas curvas de calibração para AIA e para AS, na faixa de 0,5 µg/mL a 25 µg/mL, em 210 nm, obtendo-se coeficiente de determinação ( $R^2$ ) > 0,98. A análise de biomassa algal demonstrou que a metodologia é sensível para detectar variação das concentrações desses fitormônios em função das condições de crescimento das microalgas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Concentrações (µg/g de biomassa seca) de ácido 3-indolacético (AIA) e ácido salicílico (AS) em microalgas cultivadas isoladamente ou em cocultivo, determinadas em HPLC-PDA.

Ambiente	Volume do biorreator (L)	Microalgas e dia da inoculação			AIA	AS
		A	B	C		
Controlado	1	1	-	-	1,59 ± 0,14	3,44 ± 1,15
Controlado	1	1	1	-	2,51 ± 0,21	16,66 ± 3,21
Controlado	1	1	15	-	2,84*	19,27*
Controlado	1	1	-	1	3,03 ± 0,39	11,23 ± 1,07
Controlado	1	1	-	15	1,32*	8,38*
Controlado	1	1	1	1	3,51*	29,41*
Controlado	1	1	15	15	1,60 ± 0,01	10,82 ± 1,14
Natural	20	1	-	-	1,07*	7,63*
Natural	20	1	15	-	2,16 ± 0,21	17,49 ± 2,82
Natural	20	1	15	15	2,40 ± 0,07	13,92 ± 0,37

\*Amostra única.

De maneira geral, o cocultivo da espécie A com qualquer uma das outras duas espécies avaliadas resultou em aumento da concentração de AIA e AS na biomassa algal resultante, tanto em condições controladas como em ambiente natural. É relatado que o AS favorece a competição de microalgas a variações ambientais (Xu et al., 2020), o que pode explicar esses aumentos nos cocultivos, uma vez que as microalgas estariam em competição e acionariam suas melhores estratégias de sobrevivência. Essa poderia ser uma forma de se obter maiores concentrações de fitormônios num processo de exploração de microalgas. Ainda não há reportado de tal efeito na literatura.

## Conclusão

O método proposto com HPLC/PDA apresentou potencial como procedimento eficiente para a identificação de fitormônios e quantificação dos ácidos 3-indolacético e salicílico em concentrações superiores a 0,5 µg/mg em biomassa algal, com redução do tempo de análise, economia de consumíveis e sem a necessidade de acoplar espectrometria de massas. A validação do método requer ainda outras etapas, mas os resultados obtidos indicam que o procedimento avaliado é promissor. O cocultivo de microalgas selecionadas pode induzir aumento da concentração de fitormônios na biomassa algal, especialmente ácido salicílico.

## Referências bibliográficas

- CAO, Z.-Y.; SUN, L.-H.; MOU, R.-X.; ZHANG, L.-P.; LIN, X.-Y.; ZHU, Z.-W.; CHEN, M.-X. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1451, p. 67-74, 2016.
- CAMPOS, C. G.; COSTA, P. P. K. G.; ABDELNUR, P. V.; MIRANDA, C. H. B. Desenvolvimento de método para identificação e quantificação de fito-hormônios produzidos por macro e microalgas utilizando UHPLC-MS/MS. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 6., 2020, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 188-194. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/218777/1/Desenvolvimento-de-me769todo-para-identificac807a771o-e-quantificac807a771o-de-fito-hormo770nios-produzidos-por-macro-e-microalgas.pdf>. Acesso em: 26/09/2023.
- TORIBIO, A. J.; SUÁREZ-ESTRESSA, F.; JURADO, M. M.; LÓPEZ, M. J.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, J. A.; MORENO, J. Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phyto-stimulating agents. **Biotechnology Reports**, v. 26, 2020.
- VAISHAMPAYAN, A.; SINHA, R. P.; HÄDER, D.-P.; DEY, T.; GUPTA, A. K.; BHAN, U.; RAO, A. L. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **The Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453-516, 2001.
- XU, Q.; SHI, M.; WANG, S.; QING, Y. Y. V.; QIN, W.; WANG, L. Study on the effect of exogenous salicylic acid on algae growth in the environment. **E3S Web of Conferences**, v. 165, 2020.