



AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS DA BIOMASSA REMANESCENTE DE UM SISTEMA *ALGAL TURF SCRUBBER* (ATS)

ALTMAYER, J. A.¹; SOUZA, M. P.²; RIZZETTI, T. M.³; DAHMER, M. N.⁴; HOELTZ, M.⁵; BENITEZ, L. B.⁶; SCHNEIDER, R. C. S.⁷

PALAVRAS-CHAVE: Bioproduto. Pigmentos. *Algal turf scrubber*. CLAE.

RESUMO

A biomassa proveniente de microrganismos contém recursos potencialmente renováveis e com a utilização correta pode-se gerar produtos de alto valor agregado, proporcionando ganhos ambientais e econômicos. Uma das classes de bioprodutos que apresenta grande potencial são os pigmentos naturais, os quais possuem atividades biológicas benéficas. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os pigmentos presentes na biomassa remanescente de um sistema *Algal Turf Scrubber* (ATS) instalado em um reservatório de água de superfície local. A análise e identificação dos pigmentos foram realizadas através das técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD). A espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-vis) e fluorescência com varredura foram também utilizadas para fornecer informações complementares dos extratos. A partir da análise por CLAE-DAD e com base na comparação dos tempos de retenção e dos espectros encontrados para cada pico cromatográfico foi possível estimar os possíveis pigmentos na biomassa. Como resultado, os pigmentos identificados foram: clorofila *a*, epímero da clorofila *a*, feoftina *a*₁ e feoftina *a*₂, diadinocromo, violaxantina e dois carotenoides desconhecidos.

EVALUATION OF THE EXTRACTION OF NATURAL PIGMENTS FROM THE BIOMASS REMAINING OF AN ALGAE TURF SCRUBBER (ATS) SYSTEM

KEYWORDS: Bioproduct. Pigments. *Algal turf scrubber*. CLAE.

ABSTRACT

Biomass contains potentially renewable resources; with the correct use, it is possible to generate value-added products, providing an environmental and economic profit. One of the main bioproduct class with great potential in this area are the natural pigments that have beneficial biological activities. In this context, the goal of this research focused on evaluating pigments present in the remaining biomass of an *Algae Turf Scrubber* (ATS) system installed in a local surface water reservoir. The analysis and identification of pigments were performed using thin-layer chromatography (CCD) and high efficiency with diode array detector (HPLC-DAD). Absorption spectroscopy in visible ultraviolet (UV-vis) and scanned fluorescence were also used to provide additional information on the extracts. From the analysis by HPLC-DAD and based on the comparison of the retention time and spectra found each chromatographic peak, it was possible to estimate the possible pigments in the biomass. As a result, the possible pigments identified were the chlorophyll *a*, epimer of chlorophyll *a*, *pheophytin a*₁ and *pheophytin a*₂, diadinochrome, violaxanthin, and two unknown carotenoids.

¹ Acadêmico do curso de Engenharia Química na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: joaoantonio1986@hotmail.com.

² Doutoranda em Tecnologia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: mairapsouza@yahoo.com.br.

³ Doutora em Ciências, e Pós-doutoranda em Tecnologia Ambiental na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: tielem@unisc.br.

⁴ Acadêmica do curso de Engenharia Química na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: mainarand@mx2.unisc.br.

⁵ Doutora em Microbiologia, e docente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: michelehoeltz@gmail.com.

⁶ Doutora em Microbiologia, e docente do Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: lislanne@unisc.br.

⁷ Doutora em Química, e docente do Departamento de Ciências, Humanidades e Educação, Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: rosana@unisc.br.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional aliado às altas demandas de recursos naturais faz com que a busca de meios sustentáveis e economicamente viáveis sejam crescentes, principalmente no setor biotecnológico. Neste contexto, a utilização da biomassa proveniente de sistemas de biorremediação pode ser vantajosa para avanços na área tecnológica e para o desenvolvimento de produtos sustentáveis.

Os sistemas de cultivo denominados *Algal Turf Scrubber* (ATS) são ecossistemas controlados que visam a biorremediação através do escoamento de águas residuais sobre uma superfície inclinada, a qual é coberta por uma camada produzida naturalmente, denominada biofilme, que pode ser formado por um conjunto de organismos e receber a denominação de biofilme perifítico (LIU; DANNEELS; VANORMELINGEN; VYVERMAN, 2016). O perifíton pode ser formado por algas fotoautotróficas bentônicas de água doce e procariontes, organismos heterotróficos, quimioautotróficos, fungos, protozoários, metazoários ou vírus (LARNED, 2010). Em sistemas ATS, aliado a biorremediação, tem-se a valorização da biomassa e com isso, podem-se reduzir os custos envolvidos no processo de produção de produtos de interesse comercial. A biomassa perifítica contém diversos bioprodutos (lipídeos, proteínas, pigmentos, carboidratos, antioxidantes, dentre outros) que são potencialmente renováveis e com a utilização correta podem gerar produtos de alto valor agregado. Dessa forma, encontrar uma utilidade para produtos ou subprodutos é uma maneira eficiente de proporcionar ganhos ambientais e econômicos (DE SOUZA; HOELTZ; GRESSLER; BENITEZ *et al.*, 2019). Com isso, a exploração de pigmentos como bioproducto torna-se uma opção atraente.

As microalgas são conhecidas por serem os principais fotossintetizadores da Terra, uma vez que produzem pigmentos importantes tais como: clorofila *a*, *b* e *c*, β -caroteno, astaxantina, xantofilas e ficobiliproteínas (BEGUM; YUSOFF; BANERJEE; KHATOON *et al.*, 2016). Os pigmentos naturais estão relacionados com importantes atividades biológicas, onde suas propriedades antioxidantes proporcionam efeitos benéficos à saúde, uma vez que protege contra danos oxidativos a componentes celulares, apresentando efeitos anti-inflamatórios (VOLP; RENHE; STRINGHETA, 2009). De acordo com Forgacs e Cserhati (2002), geralmente, os pigmentos naturais ocorrem em uma mistura complexa de vários compostos contendo moléculas com diferentes capacidades de adsorção e de hidrofobicidade. As diferenças em relação às características físico-químicas dos pigmentos tornam muitas vezes o desenvolvimento de métodos para a separação, identificação e quantificação ineficazes.

Devido a essas características, a extração de pigmentos na biomassa é de grande complexidade e engloba duas etapas fundamentais: o preparo de amostra e a análise instrumental, os quais são de extrema importância e interdependentes. Geralmente, o preparo de amostra para a extração de pigmentos consiste no emprego de solventes adequados seguido de uma disruptura celular. Porém, a extração simultânea de diversos pigmentos com um único solvente é complexa, uma vez que dependendo de sua estrutura química os pigmentos podem possuir características hidrofílicas ou hidrofóbicas. Para a extração de clorofila, os solventes mais utilizados são a acetona, o metanol, o etanol, o acetato de etila, a piridina e a dimetilformamida (STREIT; CANTERLE; CANTO; HECKTHEUER, 2005).

A fim de separar os pigmentos, a cromatografia em camada delgada (CCD) pode ser empregada devido à facilidade de separar os componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Esta técnica oferece múltiplas vantagens, tais como: fácil compressão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Atualmente, os instrumentos mais empregados para a determinação de pigmentos são a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), que permite a separação e a quantificação de pigmentos em amostras complexas. Com isso, para uma avaliação inicial a CCD é escolhida e, para fins de separação e quantificação a CLAE destaca-se como um dos métodos ideais.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes solventes de extração e métodos de análise para a extração de pigmentos da biomassa de perífiton obtida através de um sistema ATS. Além disso, as análises por UV-Vis, fluorescência e CLAE foram utilizadas para a identificação das principais bandas dos pigmentos extraídos, facilitando assim, a caracterização qualitativa dos mesmos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e preparo da biomassa

A biomassa perifítica foi coletada de um sistema ATS instalado em um reservatório de abastecimento de água, no Lago Dourado do município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. O preparo prévio da biomassa contou com a secagem em estufa e cominuição em moinho de facas de modo a facilitar o processo de extração. Todos os detalhes destas etapas estão descritos no estudo de Martini *et al.* (2019).

2.2 Extração e testes preliminares com Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a realização da CCD, foram adicionados 1 g de biomassa e 2 mL de acetona em um almofariz, após, homogeneizou-se essa mistura até a formação de uma pasta. Nesta pasta foram adicionados 10 mL de acetona e homogeneizados novamente. Em seguida, a solução orgânica foi filtrada a vácuo e transferida para um frasco âmbar. A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em camada delgada através da inserção de 1 gota do extrato de pigmento extraído. A amostra foi aplicada em placa cromatográfica de sílica (Macherey Nagel®) e os ensaios de eluição dos pigmentos foi realizado utilizando hexano:acetona em diferentes proporções (60:40, v/v), (65:35, v/v), (70:30, v/v) e (80:20, v/v). Em todas as placas, acompanhou-se a eluição da fase móvel, juntamente com a amostra até que a fase móvel atingisse a parte superior da placa. Após a eluição completa, as placas foram dispostas na bancada até a secagem total, e os resultados foram investigados de forma qualitativa.

2.3 Preparo de amostra para a extração de pigmentos na biomassa

Os ensaios de preparo de amostra consistiram na adição de 0,1 g de biomassa e 5 mL de solvente em um tubo de polipropileno de 50 mL. Em seguida, este tubo foi agitado em vórtex durante 1 min e sonificado em banho de ultrassom por 20 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 2600×g e o sobrenadante contendo os pigmentos foram transferidos para um frasco âmbar e levados para a análise.

Os solventes avaliados nos testes foram (1) acetona:água (80:20, v/v); (2) metanol 100%; (3) metanol:água (80:20, v/v); (4) etanol 100%; (5) etanol:água (80:20, v/v). Além disso, para verificar a eficiência da extração em uma única etapa, seguindo o procedimento descrito testou-se o preparo de amostra com a adição de 2,5 mL (de etanol 100%) em que o sobrenadante foi recolhido e a amostra remanescente foi re-extraída com 2,5 mL (de etanol 100%). Ao final os sobrenadantes desse ensaio foram homogeneizados e armazenados em um mesmo frasco.

2.4 Análises por Fluorescência, UV-Vis e CLAE

A determinação do melhor solvente para a extração de pigmentos, bem como para a verificação do perfil dos mesmos foi realizada por análises de fluorescência, UV-Vis e CLAE.

As análises espectroscópicas por fluorescência foram realizadas com o equipamento SpectraMax® M3. Os espectros foram obtidos com excitação no comprimento de onda 430 nm, varredura e emissão de 300 a 800 nm (SIMIS; HUOT; BABIN; SEPPÄLÄ *et al.*, 2012). Conforme o item 2.3, as amostras extraídas foram transferidas para as microplacas, incubadas durante 10 min e homogeneizadas por 1 min antes das análises.

As análises de espectrofotometria UV-Vis foram realizadas no espectrofotômetro UV/Vis Specord 210 Plus da marca Analytik Jena, empregando-se um monocromador de duplo feixe. A varredura foi realizada na faixa espectral de 300 a 800 nm (THRANE *et al.*, 2015). As análises foram realizadas em cubetas de vidro com o caminho óptico de 1 cm. Devido à alta concentração de pigmentos as amostras foram diluídas 10 vezes antes das análises.

Para as análises por CLAE empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos da Shimadzu equipado com bomba LC 20-AT, controlador SIL 20-A e detector SPD-M20A. A separação dos pigmentos foi realizada utilizando uma coluna com fase estacionária de octadecilsilano (250 x 4,6 mm, 5 µm) da Phenomenex e a temperatura mantida constante a 30°C. A vazão (0,6 mL min⁻¹) e o modo de eluição gradiente foram realizados conforme descrito por Mendes, Cartaxana e Brotas (2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Gradiente utilizado para a análise de pigmentos por CLAE-DAD.

| Tempo de retenção (min) | Fase móvel A | Fase móvel B | Fase móvel C |
|----------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| | Metanol:água (85:15, v/v)% | Acetonitrila:água (90:10, v/v)% | Acetato de etila 100% |
| 0 | 60 | 40 | 0 |
| 2 | 0 | 100 | 0 |
| 7 | 0 | 80 | 20 |
| 17 | 0 | 50 | 50 |
| 21 | 0 | 30 | 70 |
| 28,5 | 0 | 30 | 70 |
| 29,5 | 0 | 100 | 0 |
| 30,5 | 60 | 40 | 0 |
| 35,0 | 60 | 40 | 0 |

*o gradiente foi realizado conforme descrito por Mendes, Cartaxana e Brotas (2007).

Os extratos dos ensaios, item 2.3, foram transferidos para *vials* e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico. Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos entre 200 a 800 nm e os cromatogramas foram processados a 450 nm. A identificação dos picos foi feita conforme a ordem de eluição em coluna C18, baseando-se no artigo de Mendes, Cartaxana e Brotas (2007) no intuito de se obter um comparativo de resultados, uma vez que os equipamentos e as condições foram as mesmas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

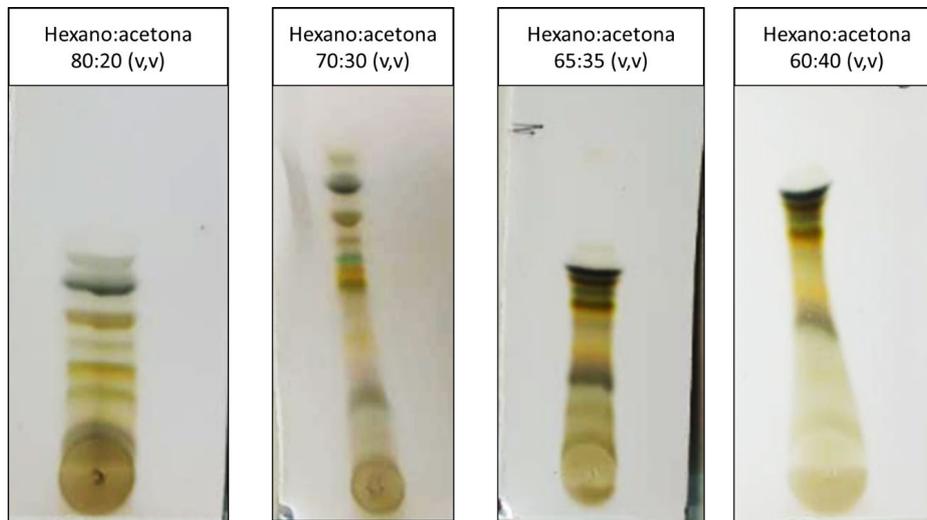
3.1 Cromatografia em Camada Delgada

Na Figura 1 podem ser vistos os cromatogramas dos ensaios com diferentes proporções de solvente utilizados na etapa de eluição da CCD. Como pode ser visto em todos os ensaios há uma diversidade de pigmentos presentes na biomassa enfatizando a complexidade de separação e identificação. Contudo, a composição de fase móvel que apresentou o maior número de pigmentos separados foi a mistura hexano:acetona (70:30, v/v) com uma separação de aproximadamente 12 pigmentos.

Estudos demonstram que a eficiência da extração de pigmentos está associada com o solvente que será utilizado e com o tipo de ruptura mecânica, devido à resistência celular do perifíton. Se a escolha não for correta, pode-se ter uma má interpretação dos resultados em relação aos pigmentos, logo, é necessário um método que extraia eficientemente os pigmentos de todos os grupos taxonômicos (HAGERTHEY; WILLIAM LOUDA; MONGKRONRSRI, 2006).

Hagerthey *et al.* (2006) desenvolveram um protocolo simples e eficiente para a extração de pigmento de um perifíton, comparando a capacidade de extração de quatro solventes (acetona, metanol, metanol/acetona e metanol/acetona/N,N-dimetilformamida). Os resultados demonstraram que a acetona permitiu uma melhor extração quando comparadas aos demais.

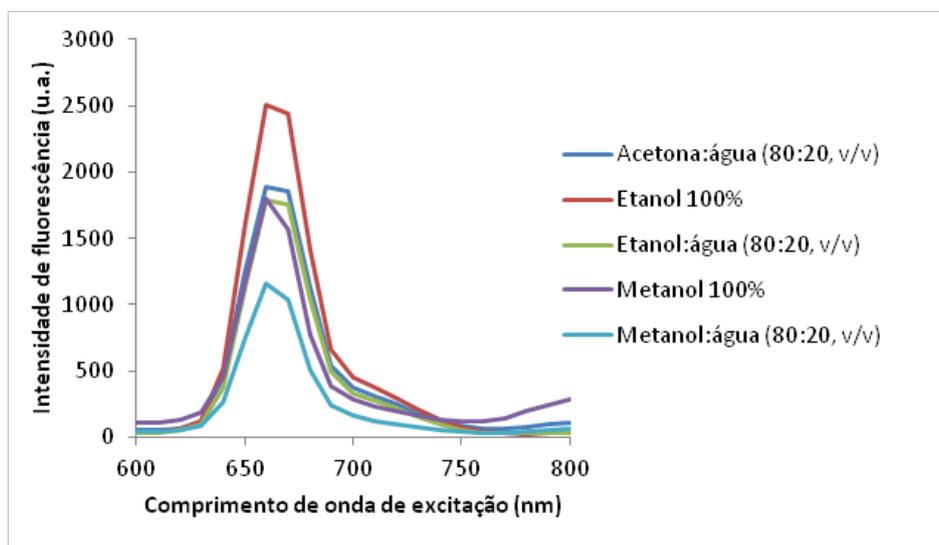
Figura 1. Cromatografia CCD com as diferentes proporções de solventes testados para a separação dos pigmentos da biomassa do sistema ATS.



3.2 Análise por fluorescência

A análise por fluorescência demonstrou duas bandas principais, uma em 425 nm e outra em 670 nm. Destaca-se que a banda em 425 nm está relacionada com a emissão dos solventes extratores visto que a leitura individual dos mesmos gerou bandas próximas a 420 nm. Já a banda em 670 mostrou ser predominante para todos os solventes extratores (Figura 2).

Figura 2. Espectro de fluorescência dos pigmentos extraídos com diferentes solventes na biomassa perifítica com excitação de 430 nm e sinal de emissão de 670 nm.

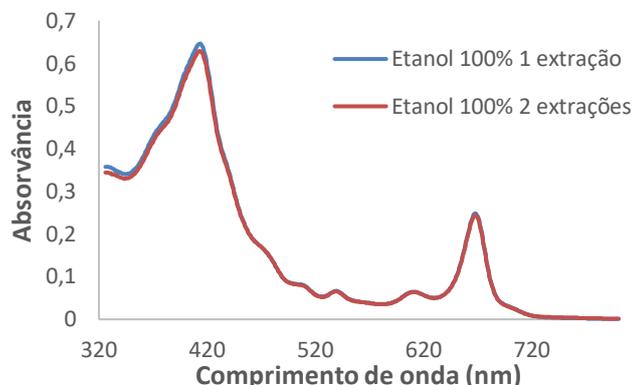


De acordo com Poniedzialek *et al.* (2017) a medição de clorofila por fluorescência pode fornecer informações sobre as mudanças que ocorrem durante a fotossíntese. Indiretamente, podem-se transmitir informações do estado celular e do estado de crescimento de organismos. A fluorescência da clorofila ocorre na região vermelha de luz visível, entre 675 e 685 nm. A fluorescência de pigmentos, como por exemplo, a clorofila a (Chla) é amplamente utilizada para a análise de biomassas fitoplanctônicas, uma vez que é uma medida não intrusiva e que pode ser realizada com alta resolução. A distribuição de Chla entre os fotossistemas I e II (PSI, PSII) é fundamentalmente diferente nesses grupos fitoplanctônicos (JOHNSEN E SAKSHAUG, 2007), e requer consideração em todos os aspectos das medições de fluorescência na comunidade fitoplanctônica (SIMIS; HUOT; BABIN; SEPPÄLÄ *et al.*, 2012).

3.3 Análise por UV-Vis

Para análise por UV-Vis, inicialmente, realizou-se a comparação entre uma única extração empregando 5 mL de etanol (100%) com um ensaio com 2 etapas de extração, ou seja, uma mesma amostra foi extraída duas vezes com 2,5 mL de etanol. Essa comparação foi realizada para verificar a influência da extração pigmentos em mais etapas (Figura 3).

Figura 3. Comparação da extração de pigmentos da biomassa perifítica através da análise por UV-Vis, com adição de 5 mL etanol em 1 etapa de extração e com de adição de 2,5 mL de etanol em 2 etapas de extração.



Conforme observado na Figura 3 não há diferenças entre os testes com 1 ou 2 extrações da amostra. Isto indica que utilizando o mesmo volume de solvente, em uma única extração é o suficiente para extrair os pigmentos e com isso pode-se evitar etapas adicionais desnecessárias. Após a realização deste teste, escolheu-se a utilização da mistura acetona:água (80:20, v/v) para a extração de pigmentos, conforme condições já definidas previamente por nosso grupo de pesquisa (de Souza *et al.*, 2020). Como resultado, após a extração de pigmentos na biomassa perifítica, foi verificado o mesmo perfil do estudo previamente citado, com bandas predominantes em 418, 555, 596 e 671 nm (de Souza *et al.*, 2020).

A extração de bioprodutos em uma biomassa perifítica é uma tarefa bastante complexa e vários parâmetros devem ser levados em consideração, como por exemplo, a variabilidade de organismos presentes na biomassa, espessura do biofilme bem como os teores elevados de água (BUFFAN-DUBAU E CARMAN, 2000;

HAGERTHEY *et al.*, 2006). A falta de nutrientes, variação em relação à exposição de luz e a amostragem em diferentes períodos sazonais também podem levar a uma considerável variabilidade na absorção e fluorescência (SIMIS; HUOT; BABIN; SEPPÄLÄ *et al.*, 2012).

Yazie *et al.* (2016) verificaram em seu estudo que o extrato da planta *Bougainvillea spectabilis* mostra picos principais de absorção, em 655 nm e em 420 nm o qual pode indicar que o extrato contém mistura de clorofilas (pico de absorção entre 400–500 nm e 600–700 nm). Além disso, o extrato também apresentou dois pequenos picos entre 476 e 545 nm os quais podem estar associados à presença de betalaínas. Já os espectros de absorção de *Euphorbia cotinifolia*, extraído com água destilada e etanol, apresentou pigmentos em três picos de absorção, de 418 - 655 nm que mostram o pico de absorção das características da mistura de clorofila e um terceiro pico de absorção em 532 nm, que pode estar associado à presença de antocianina, o qual representa um grupo de compostos fenólicos naturais.

3.4 Análise por CLAE-DAD

A identificação de pigmentos na biomassa por CLAE-DAD foi realizada utilizando o mesmo tipo de equipamento, coluna, fase móvel e gradiente empregada no artigo usado como referência (MENDES; CARTAXANA; BROTAS, 2007). A partir dessas condições foi possível comparar as áreas obtidas entre os solventes empregados indicando a escolha ideal, bem como identificar os tempos de retenção dos pigmentos e compará-los com o artigo de referência.

Na Figura 4 estão apresentados os cromatogramas de todos os ensaios empregando diferentes solventes na etapa de extração. Através desses cromatogramas foi possível observar a separação de pigmentos e que mesmo com diferentes solventes, alguns picos apresentaram tempos de retenção (t_r em min) similares, com média de A ($t_r = 13,36$), B ($t_r = 14,39$), C ($t_r = 16,12$), D ($t_r = 17,55$), E ($t_r = 25,37$), F ($t_r = 26,43$), G ($t_r = 28,32$) e H ($t_r = 28,82$).

Na Figura 5, pode-se verificar que as maiores áreas foram obtidas com o solvente acetona:água (80:20, v/v), para todos os analitos, seguido do metanol 100%. Isso concorda com o que foi encontrado pelas técnicas de espectrofotometria. Contudo, escolheu-se a acetona:água (80:20, v/v) como solvente de extração uma vez que os extratos de pigmentos em metanol são mais instáveis quando comparados à acetona (VAN LEEUWE; VILLERIUS; ROGGEVELD; VISSER *et al.*, 2006).

A análise de pigmentos de algas por CLAE 90% (v/v) de acetona em água como solvente de extração foi avaliado para a análise de plâncton natural formado por culturas de microalgas *Thalassiosira weissflogii* (*Bacillariophyceae*), *Emiliana huxleyi* (*Prymnesiophyceae*), *Phaeocystis globosa* e *Phaeocystis antarctica* (*Prymnesiophyceae*) e *Pyramimonas* sp. (*Prasinophyceae*) (VAN LEEUWE; VILLERIUS; ROGGEVELD; VISSER *et al.*, 2006). Os autores deste estudo observaram uma perda de 10% a 60% de clorofila em solvente de extração metanol enquanto as taxas de degradação do pigmento em acetona foram inferiores a 1% ao longo das 18 horas de armazenamento. Também, verificou-se que a eficiência de extração da acetona aumentou significativamente após liofilização antes da extração. Os pigmentos analisados foram dos grupos dos carotenos, clorofila e ficobilinas (VAN LEEUWE; VILLERIUS; ROGGEVELD; VISSER *et al.*, 2006).

Figura 4. Cromatogramas obtidos através da extração de pigmentos com diferentes solventes e posterior análise por CLAE-DAD.

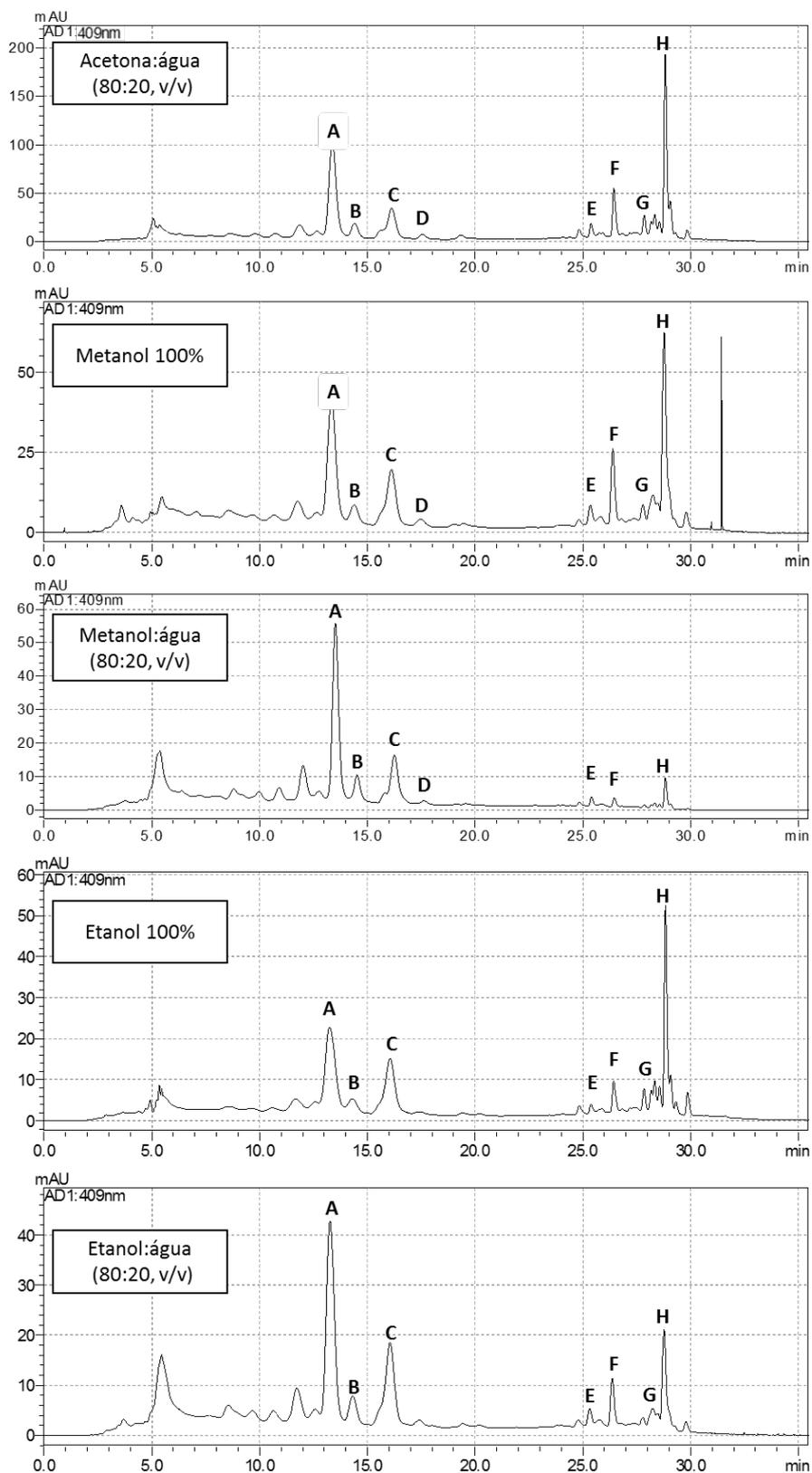
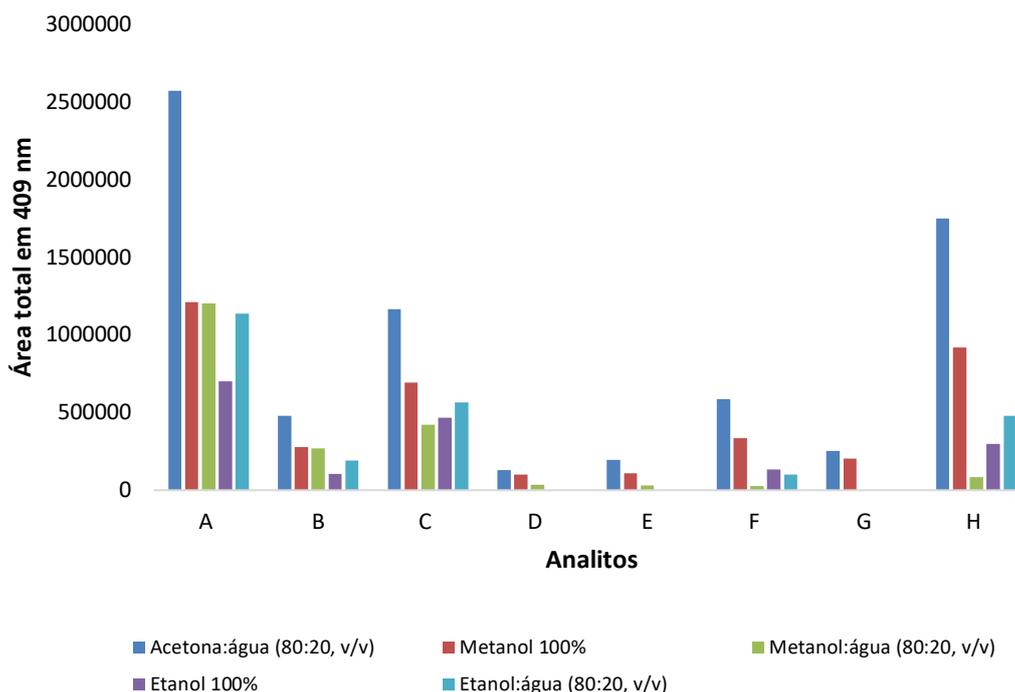


Figura 5. Resposta em área dos analitos obtida na análise por CLAE-DAD em diferentes solventes de extração.

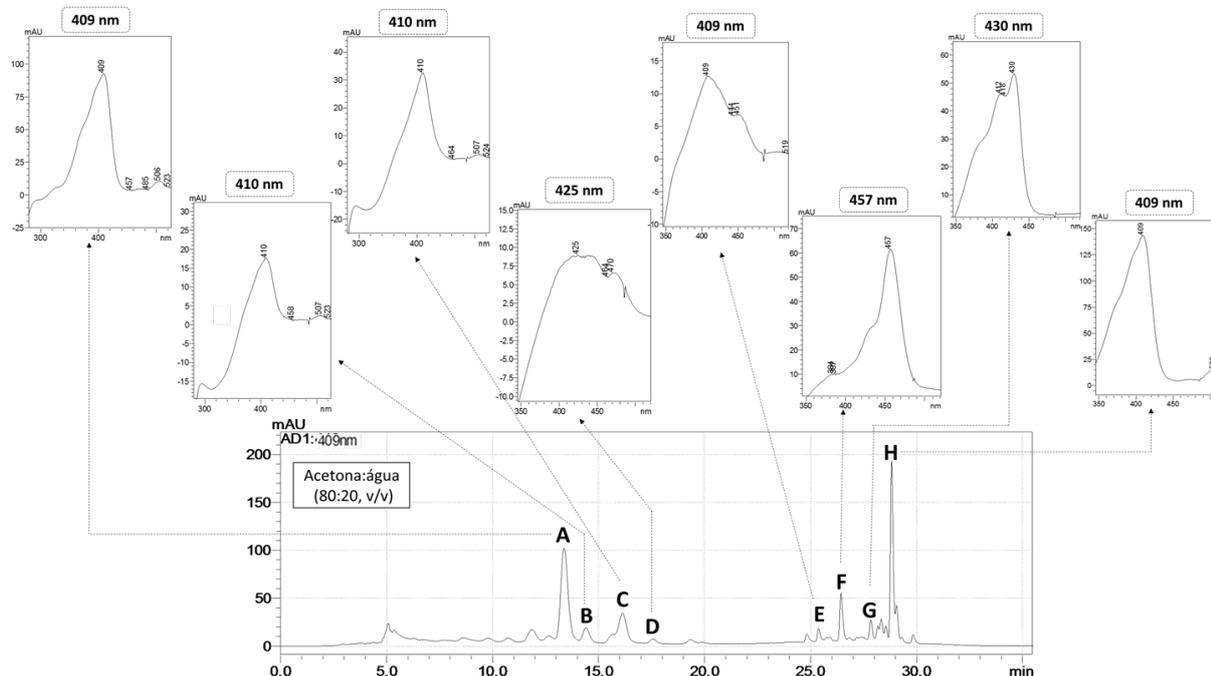
O uso do CLAE para a análise de pigmentos permite processar um grande número de amostras e separá-las de forma rápida e fácil. A clorofila *a* é geralmente encontrada em amostras de fitoplâncton, assim como outros pigmentos, p.ex. carotenoides (AGIRBAS; KOCA; AYTAN, 2017).

Szymczak-Żyła *et al.* (2008) mostraram em seu estudo que os métodos de extração com acetona (método 1) e metanol/acetona/dimetilformamida/água (método 2) apresentam um perfil semelhante para a extração de pigmentos em algas. Como resultado do trabalho, os autores observaram que a mistura de metanol/acetona/dimetilformamida/água (30:30:30:10, v/v/v/v) forneceu excelentes resultados para a extração de todos os pigmentos lipofílicos das microalgas cianobactérias filamentosas recalcitrantes e clorófitos presentes em perifíton. Em algas mais degradadas, contendo principalmente derivados de clorofila (p. ex., feofitina, pirofotofitina) o método de extração 1, somente com acetona, mostrou ser ligeiramente mais eficiente. Neste estudo verificou-se que os pigmentos predominantes foram do grupo das clorofilas e seus produtos de degradação.

Majdi *et al.* (2012) determinaram o conteúdo de pigmentos no intestino dos nematódeos *Chromadorina bioculata* (Schultze in Carus 1857) e *Chromadorina viridis* extraíndo as amostras com metanol e analisados por CLAE. Dentre os pigmentos encontrados, podem ser ressaltados a clorofila *c*, fucoxantina, diadinoxantina, beta carotenos, clorofila *a*, feoforbídeo e feofitina.

Conforme a figura 6, além dos tempos de retenção, analisamos os espectros de UV-VIS encontrados para cada pico cromatográfico na CLAE-DAD.

Figura 6. Espectro dos diferentes comprimentos de ondas dos pigmentos extraído com acetona:água (80:20 v/v)



Como pode ser visto na Tabela 2, verificou-se a possível presença dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a*, epímero da clorofila *a*, *feofitina a₁* e *feofitina a₂* e carotenos (diadinocromo, violaxantina e dois carotenoides desconhecidos). Ressalta-se que os tempos de retenção não são exatos, pois mesmo reproduzindo as mesmas condições de análise cromatográfica pequenas variações são toleráveis tendo em vista a alta sensibilidade da análise. Para um estudo mais detalhado das moléculas presentes seria necessário ter os padrões para a identificação concisa das moléculas, ou então um detector de massas, onde se poderia, através da comparação dos espectros, ter uma noção das estruturas moleculares.

Tabela 2. Comparação dos tempos de retenção encontrados em nosso estudo e no artigo de referência.

| Analito | Tempo de retenção médio (min) | Tempo de retenção Mendes, Cartaxana e Brotas (2007) (min) | λ (nm) | Possível pigmento |
|---------|-------------------------------|---|----------------|--------------------------------|
| A | 13,3 | 13,8 | 409 | Violaxantina |
| B | 14,4 | 14,2 | 410 | Carotenoide desconhecido |
| C | 16,0 | 16,5 | 410 | Diadinocromo |
| D | 17,5 | 17,4 | 425 | Carotenoide desconhecido |
| E | 25,4 | 25,8 | 409 | Clorofila <i>a</i> |
| F | 26,4 | 26,2 | 457 | Epímero da clorofila <i>a</i> |
| G | 28,3 | 28,2 | 430 | Feofitina <i>a₁</i> |
| H | 28,8 | 29,7 | 409 | Feofitina <i>a₂</i> |

4 CONCLUSÃO

As metodologias descritas, auxiliaram na otimização da extração e análise qualitativa dos pigmentos oriundos da biomassa estudada. Os testes com diferentes solventes e análises com instrumentações analíticas variadas foram essenciais para a otimização dos métodos, visto que os testes foram se complementando para a melhor interpretação dos resultados. O método de CCD, UV-Vis e fluorescência forneceram resultados exploratórios, enquanto a análise por CLAE foi a mais efetiva para a identificação dos pigmentos obtidos. Desta forma, foi possível avaliar a extração dos pigmentos da classe das clorofilas, carotenos e xantofilas em escala laboratorial. Isso demonstra que os pigmentos podem ser identificados qualitativamente de um modo simples e eficaz. A análise de pigmentos naturais é uma área que deve ser continuamente estudada, uma vez que pode trazer inúmeras vantagens para o setor biotecnológico devido a potencialidade antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-obesidade e neuroprotetora podendo ser de fundamental importância no setor alimentício, de fármacos e cosméticos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também gostariam de agradecer à ao CNPq e Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), TecnoUNISC, por meio do Centro de Pesquisa em Processos e Produtos Oleoquímicos e Biotecnológicos do MCTIC (01.0144.00/2010) e CNPq (310228/2019-0).

REFERÊNCIAS

- AGIRBAS, E.; KOCA, L.; AYTAN, U. Spatio-temporal pattern of phytoplankton and pigment composition in surface waters of south-eastern Black Sea. *Oceanologia*, 59, n. 3, p. 283-299, 2017.
- BEGUM, H.; YUSOFF, F. M. D.; BANERJEE, S.; KHATOON, H. *et al.* Availability and utilization of pigments from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, n. 13, p. 2209-2222, 2016.
- BUFFAN-DUBAU, E.; CARMAN, K. R. Extraction of benthic microalgal pigments for HPLC analyses. *Marine Ecology Progress Series*, 204, p. 293-297, 2000. ISSN 0171-8630
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Editora da UNICAMP, 2006. 452 p.
- DE SOUZA, M. P.; HOELTZ, M.; GRESSLER, P. D.; BENITEZ, L. B. *et al.* Potential of microalgal bioproducts: general perspectives and main challenges. *Waste and Biomass Valorization*, 10, n. 8, p. 2139-2156, 2019.
- DE SOUZA, M. P.; RIZZETTI, T. M.; HOELTZ, M.; DAHMER, M. *et al.* Bioproducts characterization of residual periphytic biomass produced in an algal turf scrubber (ATS) bioremediation system. *Water Science and Technology*, 2020, doi:10.2166/wst.2020.34.
- FORGACS, E.; CSERHATI, T. Thin-layer chromatography of natural pigments: new advances. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25, n. 10-11, p. 1521-1541, 2002.

HAGERTHEY, S. E.; WILLIAM LOUDA, J.; MONGKRONSR, P. Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *Journal of Phycology*, 42, n. 5, p. 1125-1136, 2006.

JOHNSEN, G.; SAKSHAUG, E. Biooptical characteristics of PSII and PSI in 33 species (13 pigment groups) of marine phytoplankton, and the relevance for pulse-amplitude-modulated and fast-repetition-rate fluorometry. *Journal of Phycology*, 43, n. 6, p. 1236-1251, 2007. ISSN 0022-3646

LARNED, S. T. A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. *Journal of the North American Benthological Society*, 29, n. 1, p. 182-206, 2010/03/01 2010.

LIU, J.; DANNEELS, B.; VANORMELINGEN, P.; VYVERMAN, W. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Research*, 92, p. 61-68, 2016.

MAJDI, N.; TACKX, M.; TRAUNSPURGER, W.; BUFFAN-DUBAU, E. Feeding of biofilm-dwelling nematodes examined using HPLC-analysis of gut pigment contents. *Hydrobiologia*, 680, n. 1, p. 219-232, 2012.

MARTINI, F. A.; RUBERT, A.; DE SOUZA, M. P.; KIST, L. T. et al. Periphytic biomass composition and exploitation from algae turf scrubber system. *SN Applied Sciences*, 1, n. 7, p. 765, 2019.

MENDES, C. R.; CARTAXANA, P.; BROTAS, V. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. *Limnology and Oceanography: Methods*, 5, n. 10, p. 363-370, 2007.

PONIEDZIAŁEK, B.; FALFUSHYNSKA, H. I.; RZYMSKI, P. Flow cytometry as a valuable tool to study cyanobacteria: A mini-review. *Limnological Review*, v. 17, n. 2, p. 89-95, 2017. ISSN 2300-7575.

SIMIS, S. G. H.; HUOT, Y.; BABIN, M.; SEPPÄLÄ, J. et al. Optimization of variable fluorescence measurements of phytoplankton communities with cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 112, n. 1, p. 13-30, 2012.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. D.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. *Ciência Rural*, 35, p. 748-755, 2005.

SZYMCZAK-ŻYŁA, M.; WILLIAM LOUDA, J.; KOWALEWSKA, G. Comparison of Extraction and HPLC Methods for Marine Sedimentary Chloropigment Determinations. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31, n. 8, p. 1162-1180, 2008.

THRANE, J.-E.; KYLE, M.; HAAINDE, S.; GRUNG, M.; ROHRLACK, T.; ANDERSEN, T. Spectrophotometric analysis of pigments: a critical assessment of a high-throughput method for analysis of algal pigment mixtures by spectral deconvolution. *PLoS one*, v. 10, n. 9, p. e0137645, 2015.

VAN LEEUWE, M. A.; VILLERIUS, L. A.; ROGGEVELD, J.; VISSER, R. J. W. et al. An optimized method for automated analysis of algal pigments by HPLC. *Marine Chemistry*, 102, n. 3, p. 267-275, 2006.

VOLP, A.; RENHE, I.; STRINGHETA, P. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição*, 20, n.1, p. 157-166, 2009.

YAZIE, Negese; WORKU, Delele; REDA, Abebe. Natural dye as light-harvesting pigments for quasi-solid-state dye-sensitized solar cells. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*, v. 5, n. 3, p. 13, 2016.