

Desenvolvimento e aplicação de um método RP-UPLC-PDA para a análise simultânea de dez ácidos orgânicos derivados da bioconversão de glicerina

Flávia Soares Vieira¹, Augusto Lopes Souto², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Fernanda Justen⁴, Talita Gabriela Salles Ramos⁵, Karen Santos de Lima⁶, João Ricardo Moreira de Almeida⁷, Mônica Caraméz Triches Damaso⁸, Clenilson Martins Rodrigues⁹

Resumo

A glicerina é um coproduto da produção do biodiesel que possui baixo valor comercial. Sabe-se que microrganismos podem convertê-la em substâncias de maior valor agregado. Nesse contexto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer uma metodologia analítica simples e assertiva para identificar e quantificar ácidos orgânicos que podem ser obtidos nas etapas de bioconversão de glicerina. Utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (PDA), pretendeu-se avaliar a bioconversão da glicerina em ácidos orgânicos de forma rápida e eficaz. Ao empregar o sistema de eluição em gradiente constituído de solução tamponada com H_2PO_4 a 0,01 M (pH 2) e metanol, foi possível separar e identificar 10 ácidos orgânicos em 15 minutos de análise. Na etapa de quantificação dos compostos de interesse, foram geradas curvas analíticas pela técnica de calibração externa. As curvas apresentaram linearidade satisfatória com coeficiente de determinação $> 0,999$. A aplicação desse novo método cromatográfico foi capaz de auxiliar na prospecção de microrganismos produtores de ácidos orgânicos de valor agregado. Sendo assim, o método desenvolvido representa uma importante ferramenta analítica para avaliar a capacidade de

¹ Farmacêutica, mestranda em Química, Universidade Federal de Goiás, flavia.vieira@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pós-doutorando na Embrapa Agroenergia, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Bióloga, mestranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, fernanda.justen@colaborador.embrapa.br

⁵ Bióloga, doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, talita.ramos@colaborador.embrapa.br

⁶ Bióloga, Universidade de Brasília, karen.lima@colaborador.embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, joao.almeida@embrapa.br

⁸ Engenheira Química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

⁹ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

produção dessa classe de compostos-alvo a partir de processos de agregação de valor da glicerina.

Introdução

Na busca de novas fontes de energia, o biodiesel surgiu como uma alternativa de combustível sustentável. Pesquisas sugerem que o biodiesel seja menos poluente do que o diesel de origem fóssil, sendo uma importante forma de progresso tecnológico para limitar as emissões de gases do efeito estufa e diminuir a poluição ambiental. (QUISPE *et al.*, 2013). O biodiesel é comercialmente obtido a partir de óleos vegetais e gorduras por processos de transesterificação. No processo também é formado cerca de 10% de glicerina, coproduto de baixo valor comercial (QUISPE *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009).

A produção mundial de biodiesel tem aumentado rapidamente na última década. Entre as razões para esse aumento está a maior preocupação com os efeitos dos combustíveis fósseis sobre o meio ambiente. A crescente produção de biodiesel acarretará grandes excedentes de glicerina impura, trazendo novos desafios de como converter ou usar o glicerol, a fim de melhorar a viabilidade econômica da cadeia produtiva desse biocombustível (QUISPE *et al.*, 2013). Sabe-se que microrganismos podem naturalmente utilizar glicerol como fonte de energia/carbono e convertê-lo em produtos químicos de maior valor agregado (SILVA *et al.*, 2009).

Diferentes classes de substâncias podem ser obtidas a partir da bioconversão da glicerina, dentre elas os ácidos orgânicos (ASAD-UR-REHMAN *et al.*, 2008). Diversas metodologias têm sido empregadas para detecção de ácidos em diferentes matrizes, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA) a técnica mais utilizada em virtude da sua simplicidade, mas ainda muito morosa (AQUINO *et al.*, 2015; SHUI & LEONG, 2002). No entanto, há poucos estudos que utilizam cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) para monitorar um conjunto amplo de ácidos orgânicos de forma simultânea e rápida, sendo muito raro encontrar aplicações específicas para a área de biotecnologia.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de análise rápido e simples baseado em cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UPLC) para detectar e quantificar dez ácidos orgânicos de cadeia curta (C2-C6) e aplicar a metodologia analítica para monitorar a bioconversão de glicerol.

Materiais e métodos

Reagentes e materiais

Foram utilizados Metanol grau HPLC (J.T. Baker[®]), fosfato de potássio monobásico anidro (Sigma-Aldrich), ácido orto-fosfórico P.A. 85% (Vetec), e os padrões de ácidos orgânicos AO₁, AO₂, AO₃, AO₄, AO₅, AO₆, AO₇, AO₈, AO₉, e AO₁₀. Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Co., Bedford, MA, EUA).

Instrumentação

As análises foram realizadas no cromatógrafo UPLC-PDA modelo Acquity H-class (Waters) que consiste em um sistema de bombeamento de solvente quaternário, um degaseificador a vácuo, um gerenciador de amostra com termostato FTN (*Flow-Through Needle*), um forno de coluna equipado com pré-aquecedor de solvente (*pre-heater*) e detector de arranjos de fotodiodos (PDA), todos controlados pelo software Empower 3. As separações foram realizadas em coluna de fase reversa (C18) HSS T3 (2,1 X 150 mm, 1,8 µm, Waters[®]), equipada com pré-coluna com mesma composição de fase estacionária. A fase móvel utilizada foi: A) solução tampão fosfato monobásico de potássio 0,01 M (pH 2,0) e B) metanol. A separação foi realizada em eluição em gradiente à vazão de 0,3 mL/min. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C.

Resultados e discussão

Diferentes condições analíticas foram testadas a fim de se obter separação e resolução cromatográfica para todos os ácidos AO₁₋₁₀ no menor tempo de análise possível. Foram avaliados de forma unidimensional diferentes valores de pH, vazão de fase móvel, solventes e temperatura da coluna.

Os valores de pH utilizados foram 2,0; 2,2; 2,5; 3,0; 3,5 e a melhor separação/resolução foi obtida em pH 2,0. Nessa condição, os ácidos orgânicos estudados apresentaram-se, predominantemente, na forma não ionizada. Variou-se a composição do solvente orgânico entre metanol e isopropanol havendo perda de resolução dos picos com a utilização de isopropanol. Foram avaliadas as temperaturas do forno da coluna de 20 °C, 25 °C e 30 °C.

Optou-se por trabalhar na condição a 30 °C, pois menores temperaturas não trouxeram ganho na separação dos ácidos, além de terem aumentado o tempo de eluição de alguns analitos. Foram avaliados os modos de eluição gradiente e isocrático. A eluição em gradiente permitiu que os ácidos de diferentes polaridades fossem eluídos na mesma corrida cromatográfica, permitindo ainda ajustar a resolução dos picos por meio da variação da polaridade da fase móvel.

Para o estudo da vazão da fase móvel, foram estudados os valores de 0,3 mL/min e 0,4 mL/min. Verificou-se que a vazão a 0,3 mL/min forneceu um maior número de pratos teóricos para todos os ácidos, exceto para o último ácido orgânico eluído, AO₁₀.

Variou-se também a composição da fase móvel com alterações da proporção final do solvente orgânico entre 15% e 25%. Verificou-se que o uso do gradiente chegando a 25% de metanol trouxe melhorias para a resolução de todos os picos, em especial para o AO₁₀, resolvendo o problema de resolução que o uso da vazão de 0,3 mL trouxe para esse ácido. Na Tabela 1, é apresentado o gradiente de eluição otimizado para a fase móvel utilizada neste estudo e, na Figura 1, é ilustrado o perfil de separação dos dez ácidos orgânicos no método estabelecido.

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
1,50	100	0
5,00	95	5
8,00	75	25
9,00	75	25
9,01	100	0
12,00	100	0

A = Tampão KH₂PO₄ 0,01 M; B = Metanol

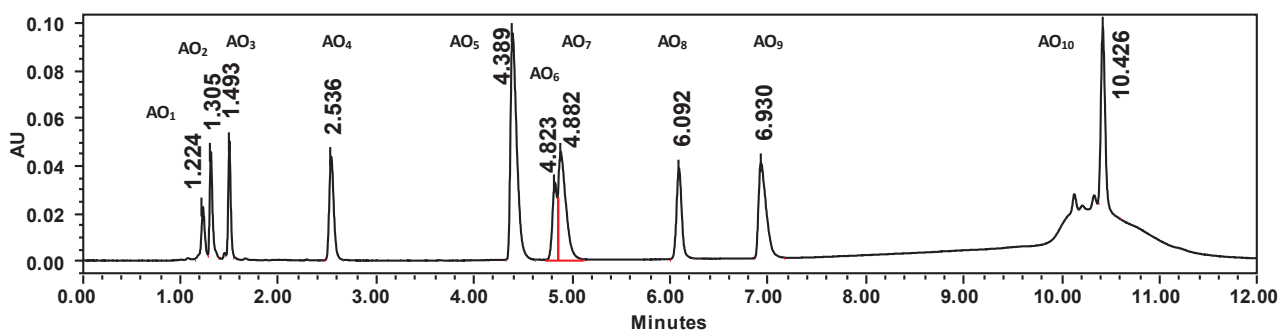


Figura 1. Perfil cromatográfico de separação dos dez ácidos orgânicos obtidos a partir da análise por RP-UPLC-PDA (210 nm).

Análises quantitativas

Soluções-estoque de cada um dos ácidos orgânicos estudados foram individualmente preparadas em diferentes concentrações. Os padrões dos ácidos AO₁ a AO₆, AO₈ e AO₉ foram diluídos em água ultrapura e os padrões dos ácidos AO₇ e AO₁₀ foram diluídos em água:metanol (2:8). Curvas analíticas foram preparadas a partir da diluição de volumes apropriados dos mix das soluções-estoque em água:metanol (2:8), para os AO₇ e AO₁₀ e em água Milli-Q para os demais ácidos orgânicos estudados. Na etapa de quantificação foram realizadas injeções em triplicata de cada um dos níveis da curva analítica.

Tabela 2. Dados de regressão linear para os ácidos orgânicos estudados.

Analito	Faixa linear	R ²
AO ₁	0,002 – 0,9 mg/mL	0,9998
AO ₂	0,02 – 2,0 mg/mL	0,9999
AO ₃	0,02 – 4,0 mg/mL	0,9999
AO ₄	0,02 – 6,0 mg/mL	0,9999
AO ₅	0,02 – 6,0 mg/mL	0,9999
AO ₆	0,125 – 5 µg/mL	0,9993
AO ₇	0,03 – 9,0 mg/mL	0,9999
AO ₈	0,2 – 150 µg/mL	0,9999
AO ₉	0,03 – 4,5 mg/mL	0,9999
AO ₁₀	0,18 – 20 µg/mL	0,9999

A linearidade de cada composto foi estabelecida a partir de curvas analíticas que foram construídas plotando a área do pico *versus* concentração dos padrões. Na Tabela 2, estão apresentados os valores da faixa linear e do coeficiente de

determinação linear (R^2) das curvas analíticas obtidas em 260 nm para o AO₁₀ e em 210 nm para os demais ácidos. Todas as curvas analíticas mostraram boa linearidade ($R^2 > 0,999$) como uma função área *versus* concentração dentro dos intervalos testados.

Aplicação do método RP-UPLC-PDA para a análise de ácidos orgânicos em amostras bioconvertidas

Para confirmar a aplicabilidade do método, alíquotas de amostras de glicerina submetidas a quatro diferentes processos de bioconversão por microrganismos foram centrifugadas, diluídas em água ultrapura e analisadas no sistema RP-UPLC-PDA. Foi identificada bioconversão com produção em níveis significativos de quatro tipos de ácidos orgânicos nas amostras analisadas durante o estudo. Os valores de concentração calculados a partir das equações de regressão linear para os ácidos orgânicos encontrados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de ácidos orgânicos em diferentes amostras geradas pela bioconversão de glicerina*, calculada a partir da aplicação do método RP-UPLC-PDA.

Analito	Amostra	Concentração
AO ₅	Processo 1	0,7 g/L
AO ₁	Processo 2	0,9 g/L
AO ₂	Processo 3	5,8 g/L
AO ₈	Processo 4	8,5 g/L

*Os processos de bioconversão não são descritos neste trabalho por razões de sigilo.

Conclusões

Neste estudo, foi possível estabelecer um método para análise rápida e simultânea de dez ácidos orgânicos por UPLC-PDA. Os parâmetros cromatográficos foram otimizados para fornecer a melhor resposta analítica para o método proposto. A técnica mostrou-se promissora para realizar *screening* de microrganismos eficientes na bioconversão de glicerina para produção de ácidos orgânicos de valor agregado. Dentre os processos mais efetivos avaliados, o método proposto indicou a produção dos ácidos AO₁, AO₂, AO₅ e AO₈ em concentrações que variaram de 0,7 g/L a 8,5 g/L. Dessa forma, o método proposto

se torna uma ferramenta analítica valiosa para estudos biotecnológicos de aproveitamento de biomassa e seus coprodutos, como demonstrado para o caso específico de agregação de valor à glicerina.

Apoio financeiro

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Referências

- AQUINO, A. C. M. S.; AZEVEDO, M. S.; RIBEIRO, D. H. B.; COSTA, A. C. O.; AMANTE, E. R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, Oxon, v. 172, p. 725–730, 2015.
- ASAD-UR-REHMAN; WIJESEKARA, R. G. S.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Susex, v. 83, n. 7, p. 1072–1080, 2008.
- QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, Jr J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 27, p. 475–493, 2013.
- SHUI, G.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 977, n. 1, p. 89-96, 2002.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, nº 27, p. 30-39, 2009.