

# Seleção de cepa produtora de ácido kójico a partir de glicerina bruta de soja

*Rebeca Baiocchi Vjanna<sup>1</sup>, Flávia Soares Vieira<sup>2</sup>, Augusto Lopes Souto<sup>3</sup>, Thaís Demarchi Mendes<sup>4</sup>, Patrícia Pinto Kalil Gonçalves da Costa<sup>5</sup>, Patrícia Verardi Abdelnur<sup>6</sup>, Clenilson Martins Rodrigues<sup>7</sup>, Mônica Caraméz Triches Damaso<sup>8</sup>*

## Resumo

Paralelamente ao crescimento mundial da produção de biodiesel, tem-se o aumento do seu principal coproduto, a glicerina. O excesso desse coproduto tem gerado uma redução substancial no seu valor de mercado. Nesse sentido, cresce o interesse por oportunidades de agregação de valor a essa matéria-prima, seja por processos químicos ou bioquímicos. Esse trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar cepas de fungos filamentosos para produção de químicos de valor agregado, mais especificamente ácido kójico, a partir da bioconversão de glicerina bruta de soja. Em trabalhos anteriores, cepas de fungos filamentosos pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia foram avaliadas com base no crescimento em meio contendo somente glicerina bruta de soja ou padrão como fontes de carbono. Cepas com diferentes perfis de crescimento foram selecionadas com base no Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para bioconversão de glicerina bruta de soja. No presente trabalho, amostras geradas por fermentação submersa, utilizando as referidas cepas, foram avaliadas por espectrometria de massas por infusão direta. Verificou-se que uma cepa isolada de torta de pinhão-manso foi capaz de produzir ácido kójico. Testes quantitativos, realizados por cromatografia líquida de ultra eficiência, demonstraram que, após 5 dias de cultivo, o fungo produziu  $3,9 \pm 0,7$  g/L do ácido. Após 10 dias de cultivo transcorridos, foram produzidos  $11,4 \pm 1,5$  g/L, enquanto todo o glicerol havia sido consumido.

**Palavras-chave:** glicerina. biodiesel. agregação de valor. cepas fúngicas. ácido kójico.

## Introdução

Visando atender à alta demanda por combustíveis e conciliar o desenvolvimento social com a preservação de ecossistemas, a crescente procura por alternativas e matrizes energéticas renováveis induziu ao aumento na produção de biocombustíveis, como biodiesel e, por consequência, do seu principal coproduto, a

<sup>1</sup> Graduanda em Biologia, Universidade de Brasília, rebeca.baiocchi@colaborador.embrapa.br.

<sup>2</sup> Farmacêutica, mestranda em Química, Universidade Federal de Goiás, flavia.soares@colaborador.embrapa.br

<sup>3</sup> Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

<sup>5</sup> Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

<sup>6</sup> Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

<sup>7</sup> Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

<sup>8</sup> Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

glicerina. Com a maior disponibilidade de glicerina, seu valor de mercado diminuiu significativamente.

Segundo Schultz et al. (2014), as aplicações mais usuais da glicerina bruta atualmente estão concentradas nas áreas de cosméticos, saboaria e fármacos, que requerem um grau de purificação; para exportação, em especial, para a China; e utilização em caldeiras e fornalhas industriais. Para tornar a cadeia de produção do biodiesel mais sustentável e economicamente atrativa, diferentes formas de aproveitamento da glicerina vêm sendo exploradas e estudadas.

De acordo com o trabalho de Almeida et al. (2012), o aproveitamento da glicerina, por via microbiana, possibilita a produção de compostos químicos de alto valor agregado para a indústria, tais como: 1,3-propanodiol, 2,3-butanediol, etanol, n-butanol, cetonas, poliois e ácidos orgânicos.

O interesse pelo ácido kójico, metabólito comumente produzido na fermentação aeróbica de fungos, vem crescendo rapidamente, principalmente na indústria de saúde e cosméticos. Suas aplicações se estendem desde atuar como matéria-prima para produção de cremes de clareamento de pele e dentes, bem como filtros solares, a ser portador de propriedades antibióticas, antifúngicas e analgésicas na Medicina. Além disso, é considerado um bom agente quelante na produção de inseticidas e precursor de potenciadores de sabor, tais como maltol e etil-maltol (MOHAMAD et al., 2010).

O presente trabalho teve como objetivo selecionar e avaliar a produção de compostos químicos por cepas de fungos filamentosos, em especial o ácido kójico, a partir da bioconversão da glicerina bruta, coproduto do biodiesel, utilizando métodos analíticos de espectrometria de massas por infusão direta (DIMS) e de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC).

## Materiais e Métodos

### Materiais

Os padrões de ácido kójico e de glicerol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. As gliceras brutas de soja foram gentilmente cedidas pela empresa CESBRA Química S.A., localizada em Volta Redonda, RJ, e pela usina ADM, Rondonópolis, MT.

### Seleção de cepas e bioconversão da glicerina bruta

No trabalho de Da Silva et al. (2014), cento e duas cepas (102) de fungos filamentosos pertencentes à Coleção de trabalho da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), denominada “Microorganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias”, foram avaliadas em relação ao crescimento em glicerina bruta de soja e glicerina padrão. O Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado para cada uma dessas linhagens. Com base nos valores de IVCM obtidos, as cepas foram divididas em grupos: alto, médio e baixo.

No presente trabalho, cepas representando cada um dos grupos foram submetidas ao processo de bioconversão utilizando glicerina bruta de soja como única fonte de carbono. Os experimentos de bioconversão foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo, tendo como única fonte de carbono glicerina bruta de soja, coproduto do biodiesel. Adicionalmente, o meio continha sais, o pH foi ajustado e foi esterilizado a 121 °C por 20 min. Os

Erlenmeyers, em duplicata ou triplicata, foram inoculados com discos ou esporos de fungos filamentosos crescidos em meio complexo e, em seguida, incubados em agitador rotatório por 10 dias.

Após 5 e 10 dias de cultivo, em condições adequadas, alíquotas foram retiradas e centrifugadas (2902 x g, por 10 min, a 4 °C).

### **Espectrometria de massas por infusão direta**

As amostras obtidas a partir da bioconversão de glicerina por fungos filamentosos foram, primeiramente, homogeneizadas em vortex por 10 s. Em seguida, foram diluídas em *vials* de 1,5 mL, na proporção de 1 µL de amostra para 1.000 µL de metanol:água (1:1). Posteriormente, foram analisadas por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS – *Direct Infusion Mass Spectrometry*), utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) e analisador tipo TOF (*Time of Flight*) (Maxis 4G, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo positivo, ESI(+)-MS, utilizando formiato de sódio como calibrante. As amostras foram injetadas em triplicata, para verificar a reprodutibilidade das análises. O tempo total de análise de cada amostra, incluindo o branco, calibrante e amostra, foi de 5 min por injeção. O pré-processamento dos dados foi executado pelo software “*Profile Analysis*” 2.1 (Bruker Daltonics), a partir da calibração por HPC (*High Precision Calibration*) e normalização pelo maior valor do *bucket* analisado. A faixa de íons de interesse explorado foi de *m/z* 70 a 1.000. Os dados processados foram exportados no formato ASCII para o software “*The Unscrambler*” 10.0 (CAMO Process), para posterior análise quimiométrica utilizando análise de componente principal (PCA).

### **Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência para quantificação de ácidos orgânicos e de glicerol**

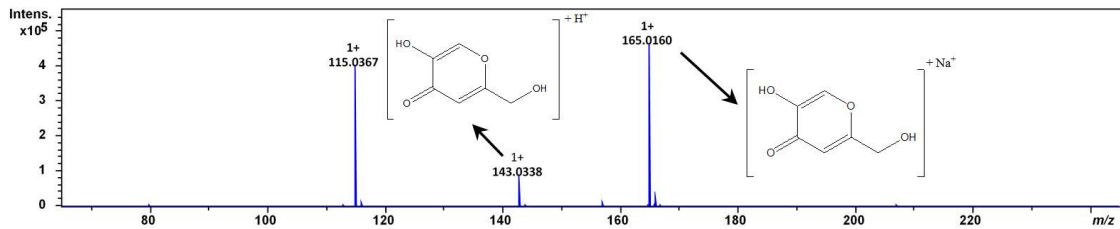
Para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos pelos microrganismos, foi utilizado um cromatógrafo a líquido, modelo Acquity H-Class UHPLC (WATERS®), com coluna Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 x 150 mm), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-PDA). A eluição foi realizada em modo gradiente, com a fase móvel constituída de A) água tamponada com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,01 M (pH 2,0) e B) metanol. Para o monitoramento do consumo de glicerol pelos microrganismos, foi utilizado o mesmo cromatógrafo a líquido, com coluna Acquity BEH amida (1,7 µm, 2,1 x 150 mm), acoplado a detector de índice de refração (RID). A eluição foi realizada em modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por acetonitrila e água na proporção 90:10 e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

### **Resultados e Discussão**

Amostras de glicerol bioconvertidas por cerca de 10 fungos filamentosos foram analisadas por DIMS, cujos dados espectrais foram submetidos à análise de componente principal (PCA). Dessa forma, foi possível selecionar íons que se destacavam principalmente devido a sua alta intensidade em relação aos demais. A partir da utilização de base de dados pública de metabolômica, foi possível correlacionar esses íons com possíveis compostos de alto valor agregado, como polióis e ácidos orgânicos, os quais foram confirmados por UHPLC, a partir de experimentos

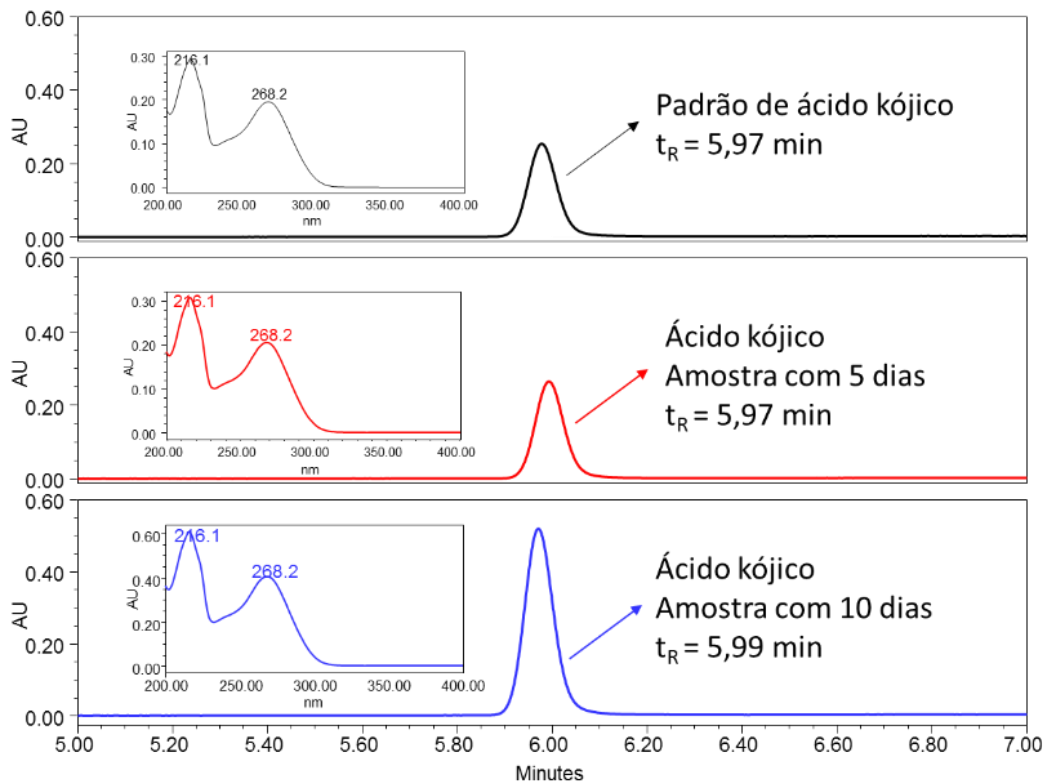
de comparação de espectros, tempo de retenção, bem como por coinjeção de padrões.

Após análise por DIMS das amostras de glicerina biotransformada por uma cepa fúngica isolada de torta de pinhão-manso, foi possível identificar a presença dos íons  $m/z$  143,0338 e  $m/z$  165,0160, correspondentes ao ácido kójico na forma protonada  $[M+H]^+$  e como aduto de sódio  $[M+Na]^+$ , respectivamente (Figura 1). O íon  $m/z$  115,0367 corresponde à molécula de glicerol, presente na glicerina, na forma de aduto de sódio  $[M+Na]^+$ .



**Figura 1.** Espectro de massas por ESI(+)-MS da amostra de glicerina biotransformada por cepa isolada de torta de pinhão-manso.

Posteriormente, visando confirmar e quantificar a produção do ácido, as amostras foram analisadas por UHPLC-PDA (Figura 2) e o consumo de glicerol por UHPLC-RID (Tabela 1).



**Figura 2.** Cromatograma da amostra de glicerina biotransformada por cepa isolada de torta de pinhão-manso obtidos em 210 nm.

A Figura 2 apresenta os cromatogramas com a identificação de ácido kójico nas amostras com 5 e 10 dias de cultivo e o cromatograma do padrão analítico de ácido kójico na concentração de 0,08 g/L. A partir da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorção na região do ultravioleta, foi possível confirmar a presença desse ácido nas amostras.

A Tabela 1 apresenta as quantidades de ácido kójico e glicerol após 5 e 10 dias de cultivo.

**Tabela 1.** Ácido kójico produzido e glicerol residual, após bioconversão de glicerina bruta de soja por cepa fúngica.

Dias	Ácido kójico (g/L)	Glicerol residual (g/L)
5	3,90±0,70	24,96±0,57
10	11,40±1,50	0

A cepa isolada de torta de pinhão-mansão apresentou consumo total do glicerol presente na glicerina após 10 dias e a produção concomitante do ácido kójico (Tabela 1). No estudo realizado por Coelho (2011), a produção de ácido kójico por cepa fúngica comercial de *Aspergillus flavus* NRRL 626, por meio da bioconversão de glicerina bruta de soja, foi de 18 g/L após 22 dias de cultivo. A cepa isolada de torta de pinhão-mansão, avaliada neste trabalho, teve maior produtividade 0,048 g/L h do que a avaliada por Coelho (2011), que foi de 0,034 g/L h, o que demonstra maior potencialidade da cepa isolada.

## Conclusões

Concluiu-se que a cepa isolada da biodiversidade brasileira, a partir da torta de pinhão-mansão, foi capaz de consumir glicerina bruta de soja, como única fonte de carbono, e produzir ácido kójico. Essa informação foi confirmada por 2 métodos analíticos, DIMS e UPLC-PDA. A cepa consumiu todo o glicerol presente na glicerina após 10 dias de cultivo e a produtividade foi maior do que a obtida por cepa comercial. Sendo assim, sugere-se que a cepa isolada neste trabalho é promissora e possui potencial para agregação de valor à glicerina.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CESBRA Química S.A. e à ADM, pela doação da glicerina bruta de soja, ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro e à Embrapa Agroenergia pela infraestrutura de pesquisa.

## Referências

ALMEIDA, J. R. M.; FÁVARO, L. C. L.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnology for Fuels**, v. 5, artigo 48, 2012.

COELHO, R. S. **Produção de ácido kójico: estudo e otimização de processo e utilização de matérias primas de baixo custo**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Orientador: Ranulfo Monte Alegre.

DA SILVA, R. M. C.; PEREIRA, C. B.; POLETTO, C. M.; DAMASO, M. C. T. Avaliação do crescimento de fungos filamentosos em glicerina, coproduto do biodiesel, como única fonte de carbono. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 1., 2014, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2014. p. 45-46.

MOHAMAD, R.; MOHAMAD, M. S.; SUHAILI, N.; SALEH, M. M.; ARIFF, A. B. Kojic Acid: applications and development of fermentation process for production. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 24-37, 2010.

SCHULTZ, E. L.; SOUZA, D. T. de; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 7, 2014.