

# 1º Encontro Nacional de Química e Sustentabilidade

 14 a 15 de Julho de 2021

Desenvolvimento de metodologia HILIC-UHPLC-ELSD para análise simultânea de substratos e ácidos orgânicos provenientes de bioprocessos.

Desenvolvimento de metodologia HILIC-UHPLC-ELSD para análise simu...



Área

Produção de produtos químicos de alto valor agregado a partir de fontes renováveis

## Autores

Vieira, F.S. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Ribeiro, J.A.A. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Mendes, T.D. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Damaso, M.C.T. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Pacheco, T.F. (EMBRAPA AGROENERGIA) ; Rodrigues, C.M. (EMBRAPA AGROENERGIA)

## Resumo

A utilização de matérias-primas de origem vegetal é uma alternativa sustentável para obtenção de compostos químicos. Microrganismos podem ser utilizados em processos de bioconversão para obtenção de ácidos orgânicos, compostos de grande interesse comercial. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer uma metodologia analítica simples por HILIC-UHPLC-ELSD para analisar de forma simultânea substratos e produtos de conversão provenientes de bioprocessos, os quais incluem: glicerol, xilose, sacarose, glicose, frutose, lactose, ácido cítrico, ácido láctico e xilitol. Este método se caracteriza como uma importante ferramenta analítica usada na seleção de microrganismos e estabelecimento de processos de bioconversão dos substratos usados em compostos químicos de interesse.

## Palavras chaves

*Ácidos orgânicos; Bioconversão; HILIC-UHPLC-ELSD*

## Introdução

O interesse pela obtenção de produtos químicos de forma mais sustentável tem aumentado ao longo dos anos. Rotas renováveis para a produção de compostos químicos de interesse comercial, obtidos a partir de resíduos e coprodutos de processos agroindustriais, têm sido apontadas como uma forma sustentável e racional de valorizar e promover uma destinação mais adequada desses materiais, além de representar uma possibilidade para redução de custos (PAES e ALMEIDA, 2014). Ácidos orgânicos são produtos químicos de grande importância e com aplicações em indústrias, como as de cosméticos, farmacêutica e de alimentos (CHEN e NIELSEN, 2016). Dentre os compostos de interesse, destacam-se o ácido cítrico e ácido láctico, que possuem ampla utilização na indústria alimentícia como acidulante, flavorizante e antioxidante (SAUER et al., 2008). Ácidos orgânicos podem ser obtidos por via fermentativa por processos de bioconversão e a utilização de resíduos como fonte de carbono barata e renovável apresenta vantagens do ponto de vista ambiental e econômico (SAUER et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2018). Para a avaliação dos processos de transformação, é importante monitorar o consumo dos substratos utilizados pelos microrganismos, bem como a obtenção dos produtos formados e, possivelmente de subprodutos da bioconversão. Portanto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um protocolo analítico para viabilizar a avaliação da produção de ácidos orgânicos (ácido cítrico e ácido láctico) e, de forma simultânea, monitorar o consumo dos substratos (glicerol, xilose, sacarose, glicose, frutose, lactose e xilitol) por HILIC-UHPLC-ELSD.

## Material e métodos

As análises foram realizadas no sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (modelo Acquity H-class Waters®) acoplado ao detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD). Foram avaliadas duas colunas de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC): BEH Amida (2,1 mm X 100

mm; 1,7 µm) e a SeQuant Zic-HILIC (100 X 2,1 mm, 3,5 µm, 200 Å), com fase móvel composta por A – acetonitrila : água na proporção 80:20 e fase B – acetonitrila : água na proporção 40:60, ambas com tampão acetato de amônio. Diferentes condições de fase móvel com pH neutro, alcalino (pela adição de hidróxido de amônio 0,1 e 0,2%) e ácido (pela adição de ácido acético 0,2%) foram avaliadas. Para os estudos a temperatura da coluna foi mantida em 50°C e a vazão em 0,3 mL/min. O detector ELSD foi configurado com: gain: 200 e nebulizer mode: cooling. Drift tube e gas pressure foram otimizados para melhor detecção dos compostos. Para análise de amostras, foram usadas linhagens (fungos) produtoras de ácido cítrico em condições de processos pré- definidas (dados não apresentados por questões de privilegiabilidade).

## Resultado e discussão

Para detecção simultânea de compostos de diferentes características químicas (ácidos carboxílicos e açúcares) utilizou-se o detector espalhamento de luz evaporativo (ELSD), por ser considerado um detector universal capaz de detectar compostos com e sem grupos cromóforos e ainda por permitir eluição em gradiente. Foram avaliados diferentes sistemas cromatográficos. Com a coluna SeQuant Zic-HILIC avaliou-se o uso de fase móvel com pH neutro e ácido e com a BEH Amida com pH neutro, alcalino e ácido. A condição de fase móvel alcalinizada com 0,2% de hidróxido de amônio, utilizando mistura ACN:H<sub>2</sub>O, e tampão acetato de amônio 10 mM foi a que se mostrou mais adequada para analisar esse grupo de compostos. Os parâmetros do detector foram otimizados de forma a garantir uma boa detecção para todos os analitos. A temperatura do drift tube foi um parâmetro crítico para a detecção do glicerol. Valores mais brandos foram necessários visto que não há detecção em temperaturas mais elevadas (FONTES et al., 2016). Na Tabela 1 é apresentado o gradiente de eluição da fase móvel e os parâmetros do ELSD otimizados neste estudo. O método desenvolvido pode ser aplicado para análise simultânea dos ácidos gerados nos processos fermentativos e consumo dos substratos, conforme proposto. A Figura 1 mostra cromatogramas de amostras provenientes da bioconversão para produção de ácido cítrico por fermentação com 4, 8, 11 e 14 dias, em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Observa-se o aumento da intensidade de ácido cítrico concomitantemente à redução da frutose e glicose. Já a Figura 2 apresenta cromatogramas de amostras provenientes da bioconversão também com 4, 8, 11 e 14 dias, para produção de ácido cítrico, em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Figura 1.

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel e parâmetros do ELSD.

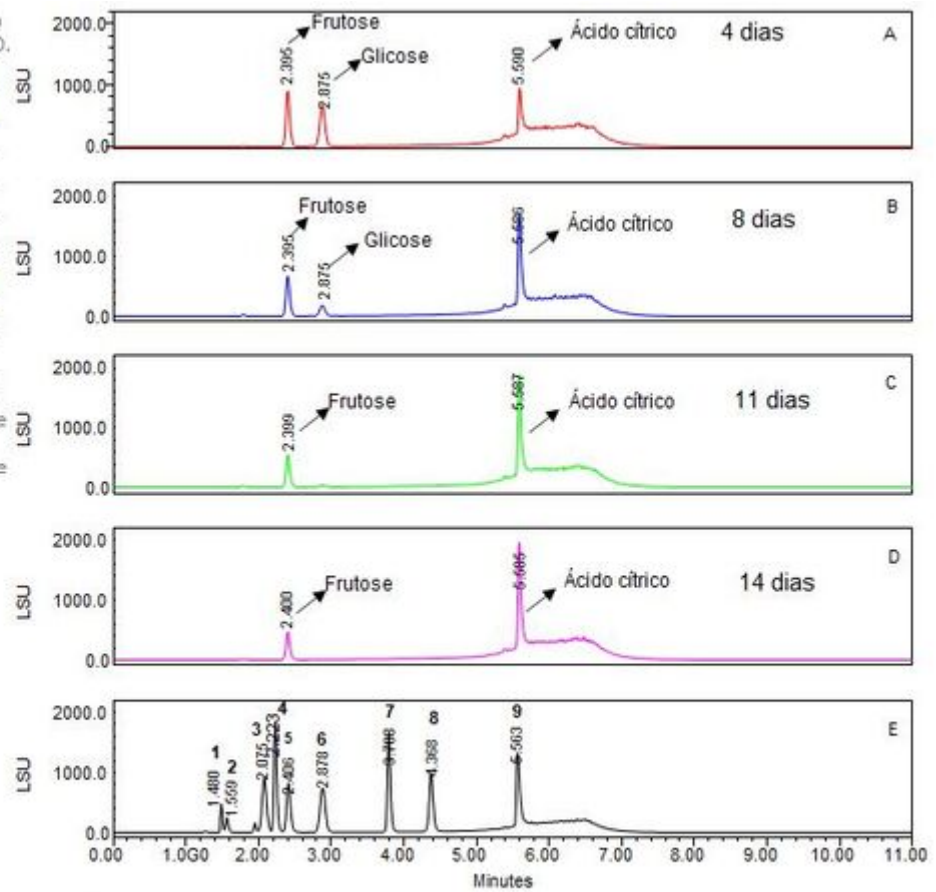
Gradiente de eluição		
Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
3	70	30
4	25	75
4 - 5	25	75
5 - 11	100	0

Parâmetros	
Gain	200
Gas pressure	35 psi
Nebulizer mode	cooling
Drift tube	40 °C

A = ACN:H<sub>2</sub>O (80:20) + acetato de amônio 10 mM + NH<sub>4</sub>OH 0,2%

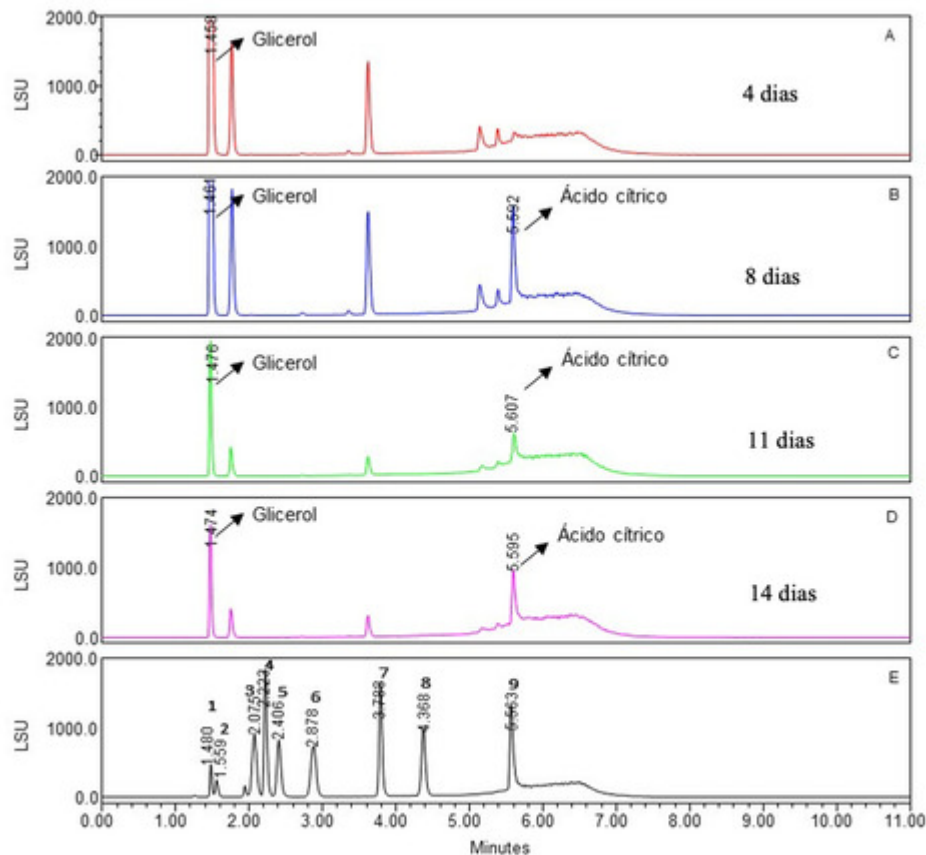
B = ACN:H<sub>2</sub>O (40:60) + acetato de amônio 10 mM + NH<sub>4</sub>OH 0,2%



Glicerol (1), ácido láctico (2), xilose (3), xilitol (4), frutose (5), glicose (6), sacarose (7), lactose (8) e ácido cítrico (9).

Cromatogramas HILIC-UHPLC-ELSD de bioconversão de sacarose P.A. em ácido cítrico (A - D), e cromatograma (E) mostrando os analitos investigados.

Figura 2.



Glicerol (1), ácido láctico (2), xilose (3), xilitol (4), frutose (5), glicose (6), sacarose (7), lactose (8) e ácido cítrico (9).

Cromatogramas HILIC-UHPLC-ELSD de bioconversão de glicerol em ácido cítrico (A - D) e cromatograma (E) mostrando os analitos investigados.

## Conclusões

Foi desenvolvido um método HILIC-UHPLC-ELSD capaz de analisar 2 ácidos carboxílicos, 1 poliol e açúcares de diferentes origens, além de glicerol. Este protocolo possibilita a identificação tanto de produtos quanto dos substratos utilizados e representa uma ferramenta analítica importante para os estudos de bioconversão. O protocolo analítico está sendo inicialmente validado em condições-padrão e posteriormente será também aplicado na quantificação de analitos em processos de bioconversão de matéria-prima vegetal (de natureza sacarina ou lignocelulósica) e glicerol nos produtos de interesse.

## Agradecimentos

Embrapa, CNPq, FAP-DF.

## Referências

CHEN, Y.; NIELSEN, J. *microorganisms*. Current opinion in biotechnology, v. 37, p. 165-172, 2016.

DE OLIVEIRA R. A.; KOMESU A.; ROSSELL C. E. V.; MACIEL FILHO R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical engineering journal*, v. 133, p. 219-239, 2018.

FONTES P. R.; RIBEIRO J. A. A.; COSTA P. P.; DAMASO M. C.; GONZALEZ W. D. A.; DOS SANTOS C. M. C.;

RODRIGUES C. M. Development and validation of a HILIC-UPLC-ELSD method based on optimized chromatographic and detection parameters for the quantification of polyols from bioconversion processes. *Analytical Methods*, v. 8, n. 9, p. 2048-2057, 2016.

PAES, B. G.; ALMEIDA, J. R. M. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2014.

SAUER, M.; PORRO D.; MATTANOVICH D.; BRANDUARDI P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in biotechnology*, v. 26, n. 2, p. 100-108, 2008.

## PATROCINADORES

---



(<http://crq3.org.br/>)

---

## APOIO

---



ABQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA.

☎ (21) 2224-4480    ✉ [abqeventos@abq.org.br](mailto:abqeventos@abq.org.br)

🌐 <https://www.abq.org.br> (<https://www.abq.org.br>)