



APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA SEPARAÇÃO/PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS POR ROTA MICROBIANA A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

CARLOS EMANOEL VIEIRA FLORES SOARES; JOSÉ ANTÔNIO AQUINO RIBEIRO; LARISSA ANDREANI; MÔNICA CAMEZ TRICHES DAMASO; CLENILSON MARTINS RODRIGUES

RESUMO

Ácidos orgânicos produzidos por rotas microbianas possuem diferentes potenciais biotecnológicos para serem explorados no setor industrial alimentício, químico, agrícola e farmacêutico. Durante a produção desses compostos, impurezas, contaminantes e pigmentos estão presentes nos meios fermentativos e dificultam a obtenção dos compostos com alta pureza, sendo este um dos principais gargalos do *downstream*. Neste estudo foram avaliados, em escala laboratorial, processos de purificação para o ácido láctico e ácido kójico, obtidos por meio de fermentações microbianas, as quais empregaram glicerol bruto (glicerina) coproduto do biodiesel como fontes de carbono nos bioprocessos. Para eliminação das impurezas foi empregada a técnica de separação por Extração em Fase Sólida / *Solid Phase Extraction* (SPE), utilizando neste estudo, cartuchos de sílica quimicamente modificada com octadecilsilano (RP18). A variável “concentração do solvente orgânico” foi o principal parâmetro avaliado e a taxa de recuperação foi empregada para apontar os melhores resultados. A eficiência dos tratamentos de purificação para os ácidos orgânicos foi avaliada por UHPLC-PDA, com o uso de uma coluna de fase reversa. Os resultados demonstram que o uso de cartuchos RP18 separam pigmentos e impurezas presentes nos extratos fermentativos de forma total ou parcial. Os resultados obtidos indicaram que distintas condições de separação dos pigmentos do meio fermentado e remoção dos interferentes foram alcançadas para os ácidos avaliados. Os protocolos de separação desenvolvidos demonstraram potencial para as etapas de purificação/separação de ácidos orgânicos de meios fermentativos, especialmente para impurezas de natureza pigmentar.

Palavras-chave: *Solid Phase Extraction*; UHPLC-PDA; ácido kójico, ácido láctico.

1 INTRODUÇÃO

Ácidos carboxílicos ou ácidos orgânicos são utilizados na indústria como produtos químicos de ampla aplicação, tais como tampões, conservantes e quelantes. Estes compostos podem ser produzidos via rota microbiológica usando fontes de carbono renováveis, por exemplo, os açúcares presentes em biomassas, utilizando fermentação em batelada ou batelada alimentada (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012; OECD, 2011; SAUER et al., 2008).

Nos últimos anos ocorreram avanços na produção de ácidos orgânicos a partir de rota microbiana, como é o caso da produção de ácido láctico e de ácido kójico, os quais podem ser produzidos a partir de fontes de carbono que sejam resíduos ou coprodutos agroindustriais,

como o glicerol bruto (glicerina) - um coproduto do biodiesel -, e a xilose do bagaço de cana-de-açúcar (TOIVARI et al., 2012; VIANNA et al., 2017).

Apesar da significativa melhora de obtenção dos ácidos orgânicos por rota microbiana, a purificação e a separação de impurezas presentes nos meios fermentados têm se mostrado um verdadeiro desafio, sendo ainda muito limitados os procedimentos capazes de garantir alta taxa de pureza e recuperação dos ácidos orgânicos. Mesmo quando processos de recristalização são empregados para a remoção de contaminantes, pigmentos ou partículas, muitas vezes, coexistem com o composto de interesse (HEYEN et al., 2020).

Neste sentido, a separação que emprega o uso da cromatografia em fase reversa, com a aplicação da técnica de SPE, se torna uma alternativa interessante para a separação e purificação de ácidos orgânicos produzidos por rotas microbianas, uma vez que altas taxas de recuperação são encontradas e, dependendo do tipo de aplicação final dos ácidos bio produzidos, o processo pode ser escalonado (MARONEZE et al., 2014).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da técnica de SPE na recuperação do ácido fólico e ácido láctico em matrizes complexas, os quais foram produzidos em meios fermentados distintos, sendo um estudo de caso de avaliação da produção de ácidos orgânicos gerados a partir de resíduos agroindustriais, especificamente, glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel com óleo de soja (glicerina).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS E MEIOS FERMENTADOS

A capacidade de separação e purificação por SPE foi avaliada para i) ácido láctico (AL), obtido pela fermentação de cepas de bactérias do tipo AT *Lactobacillus fermentum* e BRM CTAA179 *Lactobacillus plantarum* e ii) ácido fólico (AK), obtido por fungo filamentososo da espécie *Aspergillus flavus* NRRL 626. Ambas utilizaram o glicerol bruto (glicerina) de soja como fonte de carbono (VIANNA et al., 2017).

2.2 PROTOCOLOS DE SEPARAÇÃO DE INTERFERENTES E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS VIA SPE

A separação dos interferentes dos meios fermentativos foi conduzida utilizando cartuchos de fase reversa RP18 (1 g, octadecilsilano 22 %, 6 mL, Waters). Cada cartucho foi previamente ativado pela passagem de 8 mL de MeOH + ácido trifluoroacético (TFA) a 0,05 % (V/V), seguido pelo condicionamento com 8 mL de Água ultrapura + TFA a 0,05 %, com posterior aplicação dos fermentados aos cartuchos ativados (PHENOMENEX, 2011). A eluição foi realizada empregando três composições de eluentes para o ácido fólico e ácido láctico. Os eluentes foram preparados a partir de misturas binárias entre A: H₂O Milli-Q + TFA 0,05 %, e B: MeOH + TFA 0,05 %. Para garantir a completa eluição e avaliação de compostos fortemente retidos presentes na amostra, ao final do processo de SPE foi adicionada uma etapa de *washing* do cartucho com a passagem de acetonitrila pura.

Na Tabela 1 estão destacadas as três condições de eluição das amostras dos cartuchos de RP18-SPE (E1 a E3), sendo que para E1 foi investigada a seletividade de separação do ácido fólico e ácido láctico em função da concentração de MeOH (variável avaliada em três concentrações distintas: 3, 5 e 10 %). A capacidade de separação das impurezas e a obtenção dos ácidos orgânicos purificados foram mensuradas em termos da porcentagem de recuperação dos ácidos orgânicos a partir do uso da técnica de SPE. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Delineamento do processo de separação por SPE do ácido kójico e ácido láctico presentes em distintos bioprocessos de produção.

	Ác. Kójico	Ác. Láctico
	8 mL MeOH (x%)*	8 mL MeOH (x%)*
E2	8 mL MeOH 100%	8 mL MeOH 100%
E3	8 mL ACN 100%	8 mL ACN 100%

* Variável avaliada no processo de separação/purificação dos ácidos investigados. No estudo foi investigada a seletividade de separação das condições que empregaram eluição da amostra com metanol nas proporções de 3, 5 e 10 %. Em todas as composições de fase móvel foi adicionado 0,05 % de TFA.

2.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS E PADRÕES POR UHPLC-PAD

Os ácidos orgânicos foram determinados por *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* - UHPLC-PAD (Waters Acquity UPLC, Modelo H Class, *quaternary gradient pump*) equipado com coluna de fase reversa HSS T3 (2,1 x 100 mm, 1,8 μ m) e respectiva pré-coluna, pré-*heater*, amostrador automático termostaticado e controlado pelo software Empower Pro, versão 3. As curvas analíticas de calibração foram construídas a partir de padrões comerciais: ácido láctico e ácido kójico (Sigma-Aldrich), a fase móvel utilizada foi composta por ácido fosfórico 0,0125 % (A) e MeOH (B). Para cada análise, amostra ou padrões, foi injetado 1 μ L e definido os seguintes parâmetros do detector: faixa de aquisição: 200 - 400 nm, resolução: 1,2 nm; comprimento de onda analisado: 210 nm; limite de pressão: 15000 psi; vazão: 0,3 mL/min; temperatura da coluna: 35 °C, tempo de análise: 18 min. O gradiente de separação foi linearmente programado da seguinte forma: 0% B (0-1.9 min) 5% B (2-7 min), 35% B (7.1-13 min), 0% B (13.1-18 min).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias de recuperação dos analitos de interesse obtidas para as diferentes condições de eluição das amostras nos cartuchos SPE foram analisadas estatisticamente. Estes resultados foram avaliados usando o teste estatístico ANOVA, e as médias foram comparadas usando o teste de escala múltipla de Tukey. Os *P*-valores foram comparados entre as concentrações de MeOH. Para os demais resultados, as informações foram expressas como: média \pm desvio padrão (DP), coeficiente de variação e erro relativo. Todos os testes utilizaram o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando visualmente as informações da Figura 1, sugere que o processo de SPE, aplicado aos fermentados contendo os ácidos orgânicos, foi bastante eficiente para remover a carga de pigmentos observada na coloração original dos meios fermentados brutos (Figura 1, M). Os eluatos que concentraram maior teor dos ácidos recuperados revelaram significativa redução desta carga de pigmentos, sendo ácido láctico: E1 (Fig. 1A) e ácido kójico: E1 (Fig. 1B). Destaca-se ainda que parte dos interferentes foi recuperada na condição de eluição denominada “E2 (Fig. 1 A e B)”.

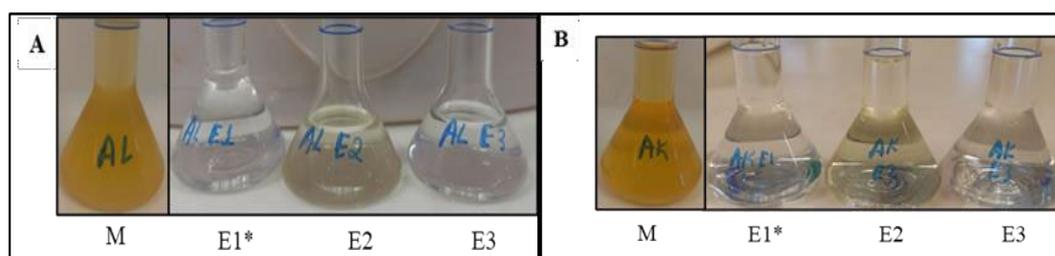


Figura 1: Eluatos coletados após a aplicação do processo de separação por SPE dos meios fermentados contendo os ácidos orgânicos investigados. A) Meio fermentado contendo ácido láctico (AL). B) Meio fermentado contendo ácido kójico (AK). M = Meio Fermentado. E: Eluatos coletados a partir da separação das amostras nos cartuchos de SPE. E1: amostra eluída com (i) MeOH 3% + TFA 0,05%, (ii) MeOH 5% + TFA 0,05% ou (iii) MeOH 10% + TFA 0,05%. E2: amostra eluída com MeOH 100%. E3: amostra eluída com ACN 100%. A figura apresenta a separação realizada com MeOH 10% para AK e com MeOH 5% para AL.

A eficiência de separação dos procedimentos indicados na Tabela 1 foi corroborada a partir das análises quantitativas dos ácidos por UHPLC-PDA. A Tabela 2 ilustra as amostras controle, com a concentração de cada ácido no meio fermentado original e as concentrações recuperadas após a realização do processo de SPE. A partir da avaliação dos dados (Tabela 2) é possível verificar que, para as três condições de separação, houve muita similaridade na faixa de valores recuperados em função da proporção de MeOH dos eluatos “E1” em comparação ao valor de referência: ácido kójico (recuperação entre 105-117%) e ácido láctico (recuperação entre 93-97%).

Tabela 2: Comparação das concentrações (expressas em mg/mL) e sua porcentagem de recuperação obtidas para os ácidos kójico e láctico após o tratamento das amostras por SPE.

	Ácido Kójico		Ácido Láctico	
	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)
Controle / Fermentado	34,37 ± 1,49	n.a	45,48 ± 0,00	n.a
E1: MeOH 3%	38,24 ± 4,48	111,26	42,62 ± 1,40	93,70
E2: MeOH 100%	0,54 ± 0,33	1,56	0,29 ± 0,26	0,64
E3: ACN 100 %	0,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00
E1: MeOH 5%	40,30 ± 5,30	117,25	44,13 ± 0,20	97,03
E2: MeOH 100 %	0,62 ± 0,32	1,83	0,08 ± 0,14	0,18
E3: ACN 100%	0,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00
E1: MeOH 10%	36,12 ± 2,00	105,10	43,62 ± 0,70	95,90
E2: MeOH 100%	0,00 ± 0,00	0,00	0,00 ± 0,00	0,00
E3: ACN 100%	0,12 ± 0,06	0,34	0,00 ± 0,00	0,00

n.a: não se aplica

Para indicar a escolha do processo de separação mais eficiente foi aplicado o tratamento estatístico com base em testes paramétricos de comparação múltipla das médias obtidas (one-way ANOVA *Post test* Tukey), considerando $p < 0,05$. Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que as médias recuperadas para o ácido kójico e ácido láctico não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 3: Análises Estatísticas de Tukey, erro relativo e coeficiente de variação dos ácidos orgânicos analisados via ANOVA.

	Ác. Láctico				Ác. Kójico		
	Área Pico Interferente (%) ¹	CV (%) ²	ER (%) ²	P-Valor ²	CV (%) ²	ER (%) ²	P-Valor ²
Controle/Fermentado	24,33	3,25	-	-	4,33	-	-
E1: MeOH 3%	8,3 ± 3,54	3,25	2,35	0,18 ^a	12,57	9,56	0,83 ^a
E1: MeOH 5%	11,99 ± 0,73	0,50	0,35	0,43 ^a	13,14	9,96	0,82 ^a
E1: MeOH 10%	19,92 ± 1,73	1,66	1,18	0,78 ^a	5,51	4,09	0,50 ^a

¹: Análise qualitativa referente ao pico interferente presente na amostra de ácido láctico que não foi completamente removido por nenhuma das condições avaliadas no tratamento do processo de SPE.

²: Análises estatísticas referentes a % de recuperação da tabela 2 “E1” para ácido láctico e ácido kójico.

^a: Valores não diferentes significativamente ao nível de confiança de 95% em uma comparação de p-valor <0,05(%).

Na condição de análise por UHPLC-PDA e com o uso da coluna HSS T3, a separação de alguns ácidos orgânicos é alcançada em intervalos de tempo menores que 10 minutos (ERGÖNÜL; NERGIZ, 2010). Nas amostras analisadas neste trabalho, o tempo de retenção para os ácidos orgânicos investigados foi de: tR = 1.710 min, para o ácido láctico e de tR = 4.127 min, para o ácido kójico, sendo ainda observados alguns interferentes (amostras controle) que eluem acima do tempo de retenção de 10 min., como demonstrado na Figura 3.

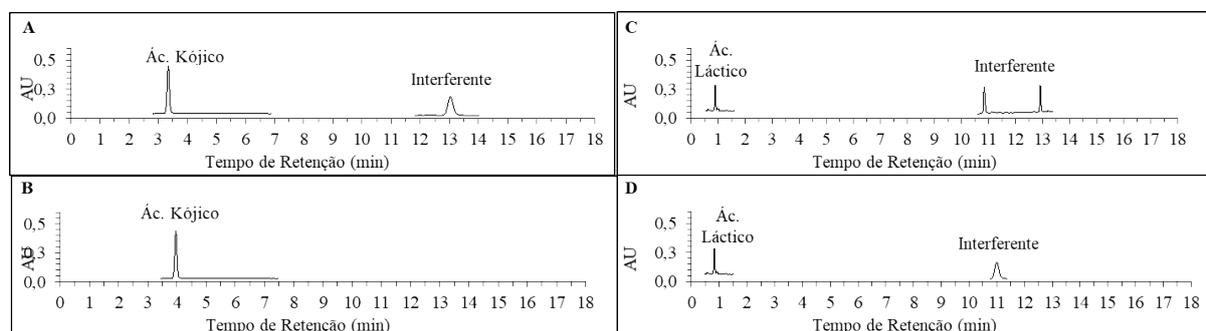


Figura 3: Cromatogramas adaptados para destaque dos picos do analito e do interferente, obtidos por UHPLC-PAD e exibidos em 210 nm para amostras controle e eluatos do SPE. A – ácido kójico presente no extrato fermentado bruto (amostra controle) com destaque para o interferente em tR = 13 min; B – ácido kójico presente no extrato fermentado após processo de SPE na condição de MeOH 10%, com eliminação do interferente; C - ácido láctico presente no extrato fermentado bruto (amostra controle) com destaque de interferentes em tR = 11 e 13 min; D – ácido láctico presente no extrato fermentado após processo de SPE na condição de MeOH 5%, com remoção parcial dos interferentes.

As informações extraídas a partir dos cromatogramas apresentados na Figura 3 corroboram com as observações que foram feitas em relação aos dados destacados na Figura 1, onde se verificou que além da carga de pigmentos removida durante o processo de SPE para os “E1” (Figura 1) os principais interferentes presentes nas amostras do fermentado foram removidos de maneira parcial, para o ácido láctico e de maneira total, para o ácido kójico (Figura 3). Além disso, conforme os dados apresentados na Tabela 3, em conjunto com os dados da Tabela 2, pode-se afirmar que os três tratamentos/condições de purificação do

ácido kójico e ácido láctico são processos eficientes para remoção de pigmentos e demais interferentes dos meios fermentativos investigados, tendo em vista que não houve diferença estatística significativa entre estes resultados.

Por outro lado, pode-se afirmar que dentro dos resultados alcançados, o processo mais eficaz para purificar o ácido kójico é o da condição E1 MeOH 10%, por eliminar todos os interferentes observados e ter os menores valores de coeficiente de variação (5,51 %) e erro relativo (4,09%), Tabelas 2 e 3. Essa observação se deu devido ao fato de que cada condição foi realizada em triplicatas técnicas

Para o ácido láctico, ao se observar os dados obtidos, nota-se que o coeficiente de variação e erro relativo foram menores na condição de eluição E1 MeOH 5% (Tabela 3). Considerando procedimentos de *downstream*, a condição mais eficaz a ser indicada é a E1 MeOH 3%, tendo em vista que nesta condição o teor remanescente (8,30%) do interferente não separado é o menor entre as três condições testadas (Tabela 3), o que pode vir a fornecer um produto final mais puro.

4 CONCLUSÃO

A aplicação de processos de separação que empregam a técnica de extração em fase sólida (SPE) para separar ácidos orgânicos de meios fermentados, com o uso de cartuchos de fase reversa do tipo RP18, indicou boa eficiência na remoção de interferentes, especialmente em relação aos pigmentos observados nos sobrenadantes dos meios fermentados. As três condições avaliadas geraram um conjunto de resultados que não diferiram estatisticamente entre si, podendo as três condições serem empregadas em etapas de purificação do ácido kójico e ácido láctico a partir das condições de fermentação estudadas.

As taxas de recuperação variaram de 105% a 117% para o caso do ácido kójico e de 93% a 97% para o ácido láctico. As análises realizadas por UHPLC-PAD revelaram que a purificação do ácido láctico foi parcial, sendo que uma das impurezas presentes no meio biotransformado permaneceu nas três condições de separação. No entanto, a condição E1 MeOH 3% é aquela que fornece um excelente teor de ácido láctico recuperado (93,07%) e maior capacidade de eliminação do componente interferente (apenas 8,3% da concentração presente no fermentado bruto).

Concluiu-se ao final que o processo de extração em fase sólida proposto foi eficaz para separar e quantificar os ácidos orgânicos obtidos por rotas microbianas, destacando ainda a alta taxa de recuperação a partir de amostras bastante complexas que empregaram resíduos agroindustriais como matéria-prima (glicerina bruta de soja e glicerol residual da produção de biodiesel).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa, FAP-DF (176/2020) e FINEP (Dendepalm) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ERGÖNÜL, P. G.; NERGIZ, C. Determination of organic acids in olive fruit by HPLC. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 28, n. 3, p. 202–205, 2010.

ERICKSON, B.; NELSON, J. E.; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176–185, 2012.

HAN, Y. et al. Quantification of the organic acids in hawthorn wine: A comparison of two

HPLC methods. **Molecules**, v. 24, n. 11, 2019.

HENNION, M. Thalidomide versus placebo in myeloid metaplasia with myelofibrosis: A prospective, randomized, double-blind, multicenter study. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3–54, 1999.

HEYEN, S. et al. Method development and validation for the quantification of organic acids in microbial samples using anionic exchange solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 27, p. 7491–7503, 2020.

MARONEZE, M. M. et al. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente e Água**, v. 9, n. 3, p. 445–458, 2014. OECD. **Future prospects for industrial biotechnology**. 1. ed. [s.l.] Future Prospects for Industrial Biotechnology, 2011.

SANNOMIYA, M. et al. Galloylquinic acid derivatives from *Byrsonima fagifolia* leaf extract and potential antifungal activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 297, n. June, p. 1–7, 2022.

SAUER, M. et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 100–108, 2008.

SUTO, M.; KAWASHIMA, H. Discrimination for sake brewing methods by compound specific isotope analysis and formation mechanism of organic acids in sake. **Food Chemistry**, v. 381, n. January, p. 132295, 2022.

TOIVARI, M. H. et al. Microbial d-xylonate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2012.

VIANNA, R. B. et al. Seleção de cepa produtora de ácido kójico a partir de glicerina bruta de soja. **IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: Anais**, v. 4, p. 101–106, 2017.