

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ÁCIDOS ORGÂNICOS DE *Aspergillus niger* E ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR.

João Victor Andrade, Giulia Stavrakas Miranda, Bruna Petri Fonseca, Adriely
Valerio de Macedo, Mário Ferreira Conceição Santos.

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto
Universitário, S/N - Guararema, Alegre - ES, 29500-000 – Alegre, ES, Brasil, ,
joao.andrade.75@edu.ufes.br, giustavrakas@gmail.com, brunapetri1999@gmail.com,
adrielymacedo13@gmail.com, mariosantos408@gmail.com.

Resumo

A partir do caldo fermentado e extratos de *Aspergillus niger*, identificar a presença de três ácidos orgânicos. Sendo utilizado eletroforese capilar para identificá-los. Onde foi possível obter um resultado notável, ao ser observado a presença de ácido oxálico, ácido cítrico e ácido tartárico no caldo fermentação, que são interessantes para o âmbito comercial uma vez que não necessita de métodos de extração oneroso para concentrá-los. Os resultados deste trabalho podem levantar uma nova perspectiva para os estudos desse fungo, assim como novas tecnologias de cultivo com importância comercial para produção de ácidos orgânicos os quais são muito utilizados na indústria química e na agricultura.

Palavras-chave: Eletroforese capilar. Ácidos orgânicos. HPLC. *Aspergillus niger*

Área do Conhecimento: Química.

Introdução

Desde o início da Eletroforese Capilar (CE, "*capillary electrophoresis*"), na década de 1980, o avanço desta técnica analítica de separação é, no mínimo, considerável. Parte deste crescimento pode ser atribuída às elevadas eficiências alcançadas, curtos tempos de análise e baixa geração de resíduos para a análise de amostras de importância ambiental, industrial, clínica, biomédica, entre outras. Ao passar dos anos, a eletroforese vem sendo utilizada para obter maior rendimento e reduzir os efeitos térmicos da aplicação de um campo elétrico. Para isso, os avanços fundamentais na eletroforese os avanços instrumentais nas técnicas de eletroforese permitiram a introdução de colunas capilares no sistema eletroforético, e isso foi denominado Eletroforese Capilar (CE).

Outra grande vantagem é a simplicidade da instrumentação, o que possibilita, em um mesmo equipamento, a realização dos mais variados modos de análise empregando a aplicação de tensão. Com isso, um grande número de "subtécnicas" de eletromigração em capilares surgiu com o objetivo de analisar variados analitos em matrizes complexas.

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação analítica que foi introduzida por Jorgenson e Lukacs (1981). Ela tem a enorme vantagem de ser compatível com os preceitos da química verde, sendo capaz de separar vários analitos de origem biológica, como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios e metabólitos secundários (KUBAN *et al.*, 2023). A eletroforese capilar, no entanto, não é uma técnica de separação trivial. Há diversos parâmetros que necessitam ser otimizados para que a separação seja ajustada. Essa técnica é ainda mais complicada do que a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), essa complexidade se origina das várias tecnologias que integram a instrumentação. A complexidade da HPLC vem das várias tecnologias que compõem a instrumentação, mas, depois que o equipamento é configurado, o processo cromatográfico flui sem a necessidade de modificações posteriores (JAGER E TAVARES, 2001).

O gênero *A. niger* tem se destacado principalmente pela sua capacidade de produzir ácidos orgânicos, com isso, o crescente estudo nessa área, onde destacamos o ácido cítrico e oxálico (BAKRI, M. M. *et al.*, 2019).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Diversos mecanismos têm sido propostos quanto à sua regulação e síntese, destacando a produção desses ácidos, que é influenciada por diversas condições ambientais, como o pH do meio, fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e micronutrientes. (PAPAGIANNI et al., 2005 XU et al., 1989; HAQ et al., 2003), despertando estudos com o objetivo de aumentar sua produção, mesmo na presença de álcoois (SAHA et al., 1999).

Há também pesquisas sobre a capacidade dos ácidos orgânicos em influenciar a solubilização de fosfatos inorgânicos (CUNNINGHAM; KUIACK, 1992), pois estes, secretados por microrganismos, podem diminuir o pH ou atuar como agentes quelantes de metais fosfatados inorgânicos, liberando o fosfato solúvel (SALIH et al., 1989; NAHAS, 1991) que podem beneficiar as plantas hospedeiras que habitam solas pobres. Assim este trabalho teve por objetivo verificar a presença de ácidos orgânicos no caldo fermentado e extrato bruto acetato de etila do fungo endofítico *Aspergillus niger* podendo este estudo indicar o melhor modo de extração e quantificação desses ácidos.

Metodologia

O equipamento de eletroforese capilar consistiu em CE LINEAR modelo 200 equipado com detector UV-Vis, capilar de sílica fundida (Polymicro) com um diâmetro interno de 75µm e um diâmetro externo de 375µm, sem revestimento interno com um comprimento efetivo de 24 cm. Estação cromatográfica (Data Apex Ltd, EUA).

Foi utilizada como fonte de alimentação de alta tensão CZE 100R (modelo Spellman CZE 30PN1000). Elétrodo de platina de pólo positivo e negativo. Suportes de madeira. Bomba peristáltica com 13 canais, Ismatec, modelo mp. A detecção foi efetuada por UV com um comprimento de onda de 214 nm para a determinação dos ácidos orgânicos.

Para a identificação do sinal dos ácidos orgânicos, em função do tempo de migração, foi utilizada uma solução individual do respectivo composto e, em seguida, as amostras foram analisadas. Para confirmar a identidade dos picos, adicionou-se à amostra uma solução do respectivo ácido e avaliou-se o aumento da altura do sinal do pico da seguinte forma: Ácido tartárico: 0,5 mL de extrato + 1 mL de solução-mãe de ácido tartárico 0,5000g/100mL e diluído em água destilada até um volume final de 3 mL; Ácido oxálico: 3,0 mL de extrato + 1 mL de solução-mãe de ácido oxálico diluído em água destilada até um volume final de 6 mL; Ácido cítrico: 3,5 mL de extrato + 1 mL de solução-mãe de ácido cítrico 0,5000g/100mL e diluído em água destilada até um volume final de 6 mL. O fungo *Aspergillus niger* foi isolado das folhas sadias de *Hancornia speciosa* (mangabeira).

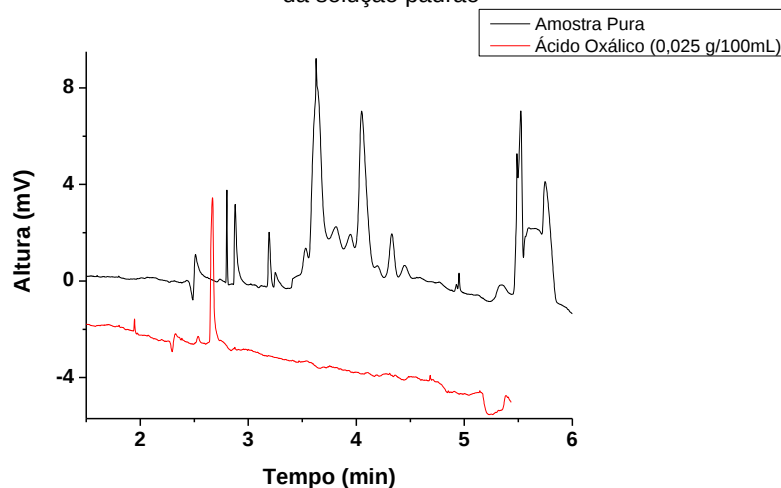
O isolado fúngico foi primeiramente repicado em placas de Petri contendo PDA e incubado por sete dias em temperatura ambiente. O isolado fúngico cultivado em PDA foi inoculado no meio líquido CBD (2000 mL). A cultura foi mantida estática em temperatura ambiente por 14 dias. Após o período de fermentação líquida, o caldo foi separado do micélio por filtração, e 1000 mL extraído 3X com acetato de etila e seco em rota-evaporador, fornecendo o extrato AcOEt (acetato de etila) com a massas de 177,3 mg. Após a obtenção do caldo fermentado e extratos AcOEt procedeu-se com as análises por eletroforese capilar para identificação dos ácidos orgânicos.

Resultados

O ácido oxálico foi identificado diretamente no caldo fermentado, uma vez que este é um composto polar e processos de extração baseados na partição líquido-líquido utilizando acetato de etila não seriam eficientes, devido ao baixo coeficiente de partição AcOEt/H₂O. Portanto as análises foram conduzidas por eletroforese capilar. O caldo fermentado foi filtrado e analisado por eletroforese capilar de zona e permitiu a identificação do ácido oxálico no caldo, pois mostra um pico com o mesmo tempo de migração da solução padrão e, quando performada a co-injeção, houve um aumento no pico, evidenciando a fortificação da amostra com o ácido oxálico padrão puro (figura 1).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

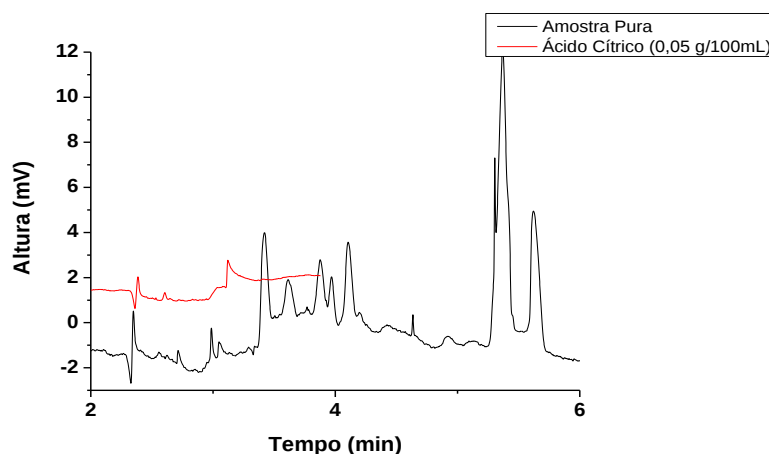
Figura 1 – Picos obtidos pela análise da eletroforese capilar de zona do ácido oxálico no caldo fermentado e da solução padrão



Fonte: os autores

O ácido cítrico foi identificado no extrato AcOEt. O fato que este ácido é um composto polar, e o solvente utilizado na extração foi o AcOEt, que apresenta polaridade média, sugere que apenas uma pequena parte do ácido cítrico foi extraída e a maior parte permaneceu na fração aquosa. Para a análise do ácido cítrico diretamente do caldo fermentado, sem processos de extração, foi desenvolvido um método de análise por eletroforese capilar. O método foi capaz de identificar o pico referente ao ácido cítrico (figura 2) pela migração e co-injeção da solução padrão pura. Porém precisa ser melhorada para conduzir o passo de quantificação.

Figura 2 – Eletroferograma do ácido cítrico sendo: A – amostra analisada, B – padrão – na concentração de 0.05g/mL.

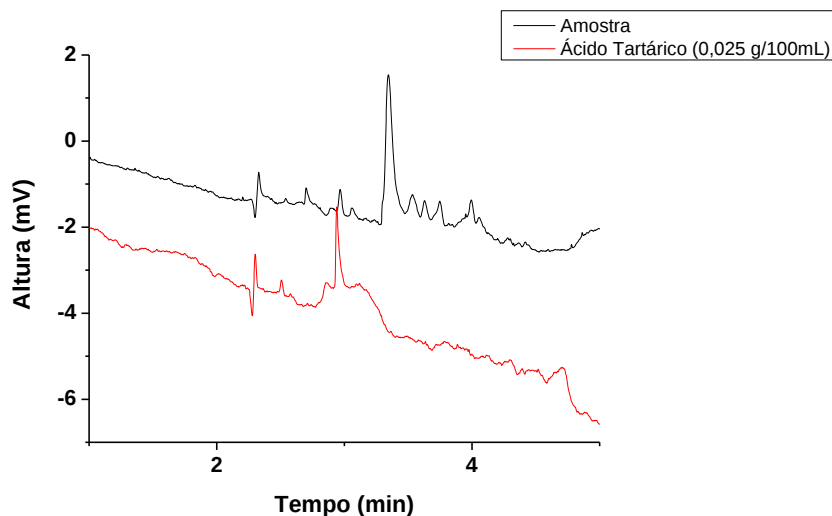


Fonte: os autores

O ácido tartárico também foi identificado no extrato AcOEt. O estudo do caldo fermentado por eletroforese capilar confirmou que *A. niger* produz ácido tartárico (figura 3) através da análise do pico referente a este ácido, assim como do tempo de migração e co-injeção da solução padrão pura.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Figura 3 – Eletroferograma do ácido tartárico sendo: A – amostra analisada, B – solução padrão – na concentração de 0,025g/100ml.



Fonte: os autores

Discussão

A caracterização dos ácidos oxálico, tartárico e cítrico no caldo fermentado revelou importantes informações sobre a produção desses compostos pelo fungo *A. niger*. Pois indicou que é mais eficiente trabalhar com o caldo fermentado aos invés do extrato por questão de detecção e concentração desses metabolitos. O método desenvolvido para identificação por eletroforese capilar mostrou-se eficiente, permitindo avaliar sua produção em função do tempo de cultivo. Entretanto, o método de eletroforese capilar desenvolvido precisará ser aprimorado para realizar a identificação do ácido cítrico (figura 2). Essa descoberta é de relevância comercial, e a identificação de novas cepas capazes de produzi-lo pode ser útil para fins de melhoramento genético. A descoberta de um simbiote capaz de produzir ácidos orgânicos responsáveis pela solubilização de fosfatos abre uma nova possibilidade para o manejo dessa cultura.

Conclusão

A identificação dos ácidos oxálico, tartárico e cítrico no caldo fermentado do fungo *A. niger* revelou sua produção desses compostos, sendo o período de doze dias o mais propício para obter a maior produção de ácido oxálico. A identificação do ácido cítrico também foi alcançada, embora o método de eletroforese capilar precise ser aprimorado para a identificação. Essa descoberta é de interesse comercial e pode ser útil para o melhoramento genético.

O ácido tartárico foi caracterizado e confirmado como sendo produzido pelo fungo *A. niger*. Em suma, os resultados obtidos permitem uma melhor compreensão da produção desses ácidos pelo fungo *A. niger* e sua relevância no contexto agrícola, especialmente em relação à solubilização de fosfatos no solo. A identificação de novas cepas produtoras desses ácidos pode ter implicações importantes para o manejo de culturas em solos pobres.

Referências

BAKRI, M. M. Tri-calcium and zinc phosphates solubilization by *Aspergillus niger* and its relation to organic acids production. **BioNanoScience**, v. 9, n. 2, p. 238-244, 2019.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

CUNNINGHAM, J e; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1451-1458, maio 1992.

GUTERRES, Sheila Barreto. **Estudo dos extratos dos frutos de *Sapindus saponaria* enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua aplicação em eletroforese capilar**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006. doi:10.11606/D.75.2006.tde-25042007-171916. Acesso em: 2023-09-06

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

KOSTAL, V.; KATZENMEYER, J.; ARRIAGA, E. A. Capillary electrophoresis in bioanalysis. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4533-4550, 2008. ISSN 0003-2700.

KUBÁŇ, Pavel; KUBÁŇ, Petr. Novos desenvolvimentos em miniaturização, amostragem, detecção e portabilidade da eletroforese capilar: uma visão geral da última década. **Tendências do TrAC em Química Analítica**, p. 116941, 2023.

PAPAGIANNI, M.; FRANK, W.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7178-7186, 2005.

PORTO, Brenda Lee Simas et al. Eletroforese capilar em análises fitoquímicas: Avanços e aplicações no período 2018–2021. **Tendências do TrAC em Química Analítica**, p. 116974, 2023.

SALIH, H.M., YAHYA, A.I., ABDUL-RAHEM, A.M. *et al.* Availability of phosphorus in a calcareous soil treated with rock phosphate or superphosphate as affected by phosphate-dissolving fungi. **Plant Soil**, v. 120, p. 181–185, 1989.