

Artículo científico

Detecção de ácidos glicônicos totais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em matriz derivada de cultivo microbiano (CLAE)**Detection of total gluconic acids in matriz derived from microbial cultivation by High Performance Liquid Chromatography Efficiency (HPLC)**

C.N. Rossi; K.R.S. Teixeira*

Laboratório de Genética e Bioquímica, Embrapa Agrobiologia,
Rodovia BR 465, km 7, CEP 23.891-000, Seropédica, RJ, Brasil

* **Endereço para correspondência:** katia.teixeira@embrapa.br, carolina.rossi@embrapa.br

Resumo

A capacidade de produzir ácidos orgânicos e tolerar à acidez é peculiar da bactéria fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Além da importante aplicação industrial, diversos ácidos orgânicos, entre eles os ácidos glicônicos, tem sido relatados como responsáveis pela solubilização de diversos compostos encontrados em forma não assimilável no solo. Neste contexto a utilização de métodos que permitam quantificar a produção desses ácidos é essencial para estabelecer seu papel na promoção de crescimento vegetal. No entanto, devido a grande semelhança estrutural entre o substrato (D-Glicose) e os ácidos glicônicos, a determinação específica e quantitativa destes compostos em relação a seu açúcar precursor tem sido limitada mesmo em análises empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O protocolo apresentado propõe o uso de dois métodos de detecção para definir a quantidade de glicose e ácidos glicônicos em amostras derivadas de cultivos *in vitro* de *G. diazotrophicus*: por método enzimático-colorimétrico (comercial) e detecção por CLAE. Embora não tenha sido possível a separação do ácido D-glicônico de seus ceto derivados, o método demonstrou baixa interferência da presença de D-glicose e alta linearidade de resposta para detecção de ácidos glicônicos totais. Análise quantitativa destes compostos em amostras de sobrenadantes permitiu definir que 33,10 mg de ácidos glicônicos totais ml⁻¹ foram produzidos durante o cultivo de *G. diazotrophicus*. As condições cromatográficas estabelecidas neste estudo constituem uma ferramenta para identificação e caracterização de microrganismos capazes de promover a solubilização de fosfato e outros minerais por meio da síntese de ácidos glicônicos.

Palavras-chave: oxidação incompleta da glicose, ácido orgânicos e cetoderivados, quantificação, validação.

Abstract

The ability to produce organic acids and tolerates acidity is peculiar of the nitrogen-fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Besides the industrial application, various organic acids, including gluconic acids have been shown to be responsible for solubilization of various compounds found in non-available forms in the soil. For this reason, development of methods to quantify the production of these acids is essential to establish their role in plant growth promotion. However, due to their close structural form specific and quantitative determination of the substrate (D - glucose) and gluconic acids and its derivatives has been limited by High Performance Liquid Chromatography analysis (HPLC). The protocol presented here proposes the use of two detection methods to determine the amount of glucose and total gluconic acids in samples derived from *in vitro* cultures of *G. diazotrophicus*: enzyme-colorimetric (commercial) and by HPLC detection. Although it was not possible to separate the D - gluconic acid from their ketoderivatives, the method showed low level of D-glucose interference and very high linearity for the detection of total gluconic acids. The quantitative analysis of these compounds in samples of PAL5 culture supernatants indicated that 33,10 mg of total gluconic acids ml⁻¹ were produced during growth of *G. diazotrophicus*. The chromatographic conditions analysis established in this study can be used as a tool for identification and characterization of microorganisms capable of promoting the solubilization of phosphates and other mineral by synthesizing total gluconic acids.

Key words: incomplete glucose oxidation, organic acid and ketoderivatives, quantification, validation

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria fixadora de nitrogênio que apresenta diversas características peculiares, incluindo capacidade de produzir ácidos orgânicos e tolerância à acidez (Stephan *et al.*, 1991; Atwood *et al.*, 1991). Dentre eles, o ácido glicônico e seus ceto-derivados, que são sintetizados concomitantemente durante o metabolismo de oxidação incompleta da glicose por *G. diazotrophicus*, apresentam grande importância econômica devido ao amplo espectro de aplicações nas indústrias alimentícia, de bebidas, farmacêutica, têxtil e construção civil. A produção em larga escala é comumente realizada por fermentação submersa empregando *Aspergillus niger*. No entanto, diversos microrganismos pertencentes aos gêneros fúngicos *Penicillium*, *Gliocladium*, *Scopulariopsis*, *Gonatotryps*, *Endomycopsis* e *Aureobasidium* e, bacterianos, *Pseudomonas*, *Tetracoccus*, *Pullularia*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Scopulariopsis*, *Zymomonas*, bem como representantes da família Acetobacteriaceae, incluindo *G. diazotrophicus*, são capazes de sintetizar estes compostos (Ramachandran *et al.*, 2006; Singh e Kumar, 2007).

Além de sua importância nos vários setores industriais, o papel dos ácidos orgânicos na solubilização de nutrientes denota seu potencial para atuar como facilitador da nutrição vegetal, sendo a inoculação de plantas com bactérias associativas produtoras destes ácidos um importante recurso para aumentar os ganhos com produtividade (Rodríguez *et al.*, 2004; Vyas e Gulati, 2009; Vyas *et al.*, 2010). Ademais, Saravanan *et al.* (2007) relataram que a solubilização de zinco mediada pelo ácido 5-ceto-D-glicônico sintetizado por *G. diazotrophicus*, promoveu a ação nematocida contra *Meloidogyne incognita*, um nematóide de ocorrência generalizada na região tropical e subtropical causador de doenças em várias culturas de grande importância social e econômica como por exemplo tomate, milho, soja, algodão, café, feijão e citrus.

Contudo, devido a grande semelhança estrutural entre o substrato (D-Glicose) e os ácidos glicônicos, a determinação específica e quantitativa destes compostos em relação a seu açúcar precursor tem sido limitada. Assim, a fim de garantir o controle de qualidade do processo de síntese de ácidos glicônicos e de seleção de microrganismos produtores são necessárias metodologias de análise apuradas, sendo a determinação de ácidos glicônicos realizada, usualmente, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Considerando que em muitos estudos que em-

pregam a CLAE como metodologia de análise não são apresentados dados complementares relacionados à determinação simultânea de glicose e/ou de ceto-derivados, o que pode acarretar incerteza quanto à confiabilidade dos resultados (Herrmann *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2008; Vyas e Gulati, 2009; Vyas *et al.*, 2010), este trabalho teve por objetivo estabelecer um método para detecção quantitativa de ácido glicônico e ceto-derivados totais na presença de D-glicose por CLAE.

Materiais e Métodos

Soluções padrão

Os padrões de D-(+)-Glicose (European Pharmacopoeia - Reference Standard), Ácido D-glicônico (sal sódico), Ácido 2-ceto-D-glicônico (sal hemicálcico) e Ácido 5-ceto-D-glicônico (sal de potássio) (Sigma Aldrich) foram confeccionados em solução composta por Ácido orto-fosfórico a 0,1% (v/v) e Acetonitrila na proporção 90:10 (v/v) à concentração de 25 mg ml⁻¹ (solução estoque) e mantidos a -20°C. Os padrões utilizados nas análises foram preparados por meio de diluições seriadas, a partir da solução estoque, empregando o mesmo solvente.

Parâmetros de análise

A análise foi conduzida em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu - Prominence series), equipado com coluna de fase reversa Lichrospher® RP-18 5µm (4,6 x 250 mm, Supelco), detector *Ultra Violeta-Visível* (UV-Vis) SPD-20AV, bomba LC-20AT, forno CTO-20A, controlador CBM-20A, injetor Reodyne com loop de 20 µl e software LC Solution.

Para confecção das curvas de calibração dos diferentes analitos, individualmente, e da mistura dos três ácidos glicônicos (ácidos glicônicos totais), foram calculadas as médias das áreas dos picos obtidos nas triplicatas de cada concentração analisada (0,31; 0,62; 1,25; 2,50 e 6,25 mg ml⁻¹).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados, conforme as fórmulas: LD = média - 3,143 x desvio padrão e LQ = média - 10 x desvio padrão, i.e., média e desvio padrão das áreas dos picos de sete replicatas do controle negativo (branco) (Inmetro, 2011).

A especificidade do método aos ácidos glicônicos totais foi avaliada por meio da análise da interferência causada pela matriz da amostra (efeito de matriz), uma vez que esta pode conter componentes que afetam o desempenho da me-

dição (Anvisa, 2003; Inmetro, 2011). Para tal, foi confeccionada, paralelamente, uma curva padrão empregando o controle negativo como solvente.

Determinação de D-glicose por método enzimático-colorimétrico

A fim de avaliar a confiabilidade do método estabelecido para determinação de ácidos glicônicos totais na presença de D-glicose foi realizada a determinação do açúcar em misturas (1:1) de padrões de D-glicose e ácidos glicônicos, ambos na concentração de 12,50 mg ml⁻¹, por método enzimático-colorimétrico empregando kit comercial GLICOSE PP (Analisa Cat. 434. - manual disponível em: http://www.goldanalisa.com.br/arquivos/%7B978C997F-7160-4B09-BE11-43F657A655C8%7D_glicose_pp.PDF). O método fundamenta-se na oxidação da glicose a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio catalisada pela enzima glicose oxidase (GOD). Através de uma reação oxidativa de acoplamento, mediada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio liberado reage com 4-aminoantipirina e fenol formando um complexo de coloração vermelha (quinoneimina), cuja absorvância, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra (Figura 1). Para a análise, 10 µl de amostra ou padrão foram adicionados a 1 ml de reagente de cor. Após homogeneização, a solução foi submetida a incubação a 37°C por 10 minutos seguida por leitura em espectrofotômetro (Kasuki UV/VIS Spectrophotometer Modelo IL-592) a 505nm.

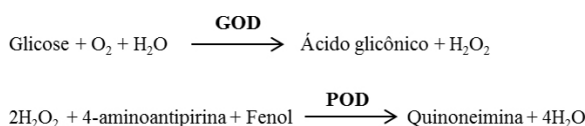


Figura 1. Representação esquemática da reação de oxidação da glicose por método enzimático-colorimétrico..

Preparo de amostra de cultivo bacteriano

A estirpe referência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5^T (BR 11281, ATCC 49037) foi cultivada em meio líquido contendo sais de LGI (Magalhães *et al.*, 1983) suplementado com 50 mg ml⁻¹ de glicose e 1 mM de (NH₄)₂SO₄. Os cultivos (50 ml) foram incubados sob agitação orbital (200 rpm) a 30°C e, após seis dias, centrifugados a 5.000 x g, sendo alíquotas de 25 ml do sobrenadante submetidas à liofilização. Para preparo do controle negativo, o mesmo volume de meio de cultivo, desprovido de inóculo, foi autoclavado e liofilizado. Para injeção no cromatógrafo, as amostras/controle foram concentradas

duas vezes, i.e., foram suspensas em água filtrada em Milli-Q até 12,5 ml (volume final).

Resultados

As condições cromatográficas otimizadas neste estudo consistiram de fase móvel (FM) Ácido orto-fosfórico a 0,1% : Acetonitrila (85:15 v/v), fluxo de 1 ml min⁻¹, temperatura (forno e detector) de 35°C e detecção a 210 nm. Após o estabelecimento da metodologia foram determinados a linearidade das curvas de calibração, os limites de detecção e quantificação (LD e LQ) e a especificidade do método (efeito de matriz), assim como a interferência da presença de D-Glicose na quantificação dos ácidos glicônicos totais e quantificação dos ácidos em amostra de cultivo bacteriano.

Os cromatogramas das soluções padrão de Ácido D-Glicônico, seus ceto derivados, Ácidos glicônicos totais (mistura dos três ácidos) e D-Glicose na concentração de 6,50 mg ml⁻¹ estão representados na figura 2. Os analitos apresentaram tempos de retenção similares (entre 2,8 a 3,0 minutos) não sendo possível sua separação; contudo, o método demonstrou baixa sensibilidade para D-Glicose cuja intensidade de sinal situou-se em aproximadamente 0,75 mV em relação a maior concentração de padrão analisada (Figura 2).

As médias das áreas dos picos dos diferentes analitos foram muito semelhantes para todos os pontos das curvas de calibração do ácido D-glicônico, seus cetoderivados (2-ceto ou 5-ceto) e ácidos glicônicos totais, contudo, nas condições cromatográficas estabelecidas, nota-se uma maior sensibilidade para detecção de ácido D-glicônico, evidenciada pela intensidade de sinal (mV) ligeiramente mais elevada (Figura 2).

Quanto à análise de regressão linear das curvas de calibração dos ácidos glicônicos foram obtidos coeficientes de determinação (R²) e correlação (r) superiores a 0,99 enquanto que para D-glicose esse valor foi inferior a 0,54 (Tabela 1 e Figura 3). O método apresentou LD e LQ de 0,45 e 0,53 mg.ml⁻¹, respectivamente.

A especificidade do método aos ácidos glicônicos totais foi evidenciada pela sobreposição das curvas de calibração confeccionadas com o padrão de ácidos glicônicos totais solubilizados em Ácido orto-fosfórico a 0,1% (v/v) e Acetonitrila na proporção 90:10 (v/v) ou quando solubilizados na matriz da amostra. Além disso, o incremento de resposta quando da adição de padrão interno à amostra de cultivo bacteriano indicou que a sensibilidade do método aos ácidos glicônicos totais

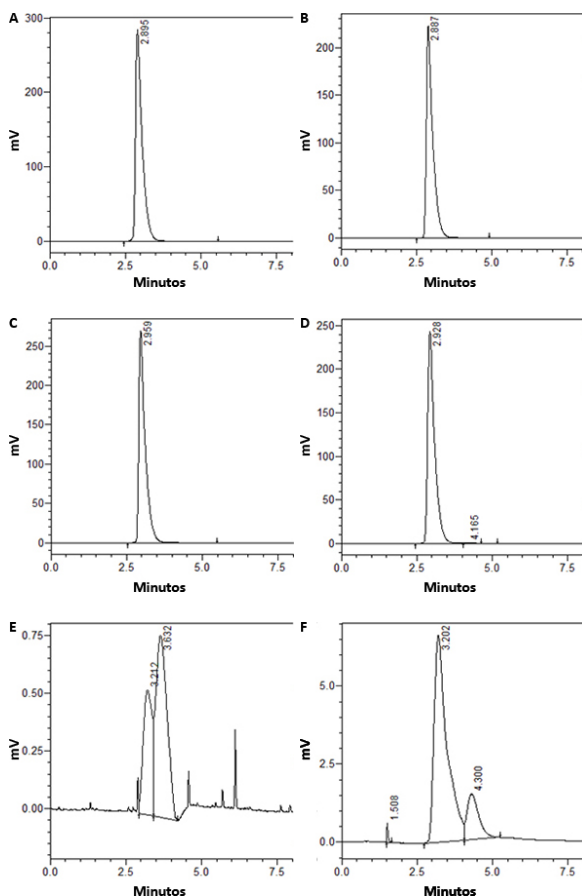
Tabela 1. Análise de regressão linear das curvas de calibração de D-glicose e dos ácidos glicônicos.

Análitos	Equação da reta*	Coefficiente de determinação (R ²)	Coefficiente de correlação (r)
D-Glicose	$y = (3,15 \cdot 10^{-4})x - 8,16$	0,5306324	0,53063235
Ác. D-glicônico	$y = (1,47 \cdot 10^{-6})x - 0,04$	0,9999719	0,99997189
Ác. 2-ceto-D-glicônico	$y = (1,92 \cdot 10^{-6})x - 0,12$	0,9991529	0,99915287
Ác. 5-ceto-D-glicônico	$y = (1,60 \cdot 10^{-6})x - 0,03$	0,9999924	0,9999924
Ác. glicônicos totais	$y = (1,70 \cdot 10^{-6})x - 0,45$	0,9961731	0,99617308

* Equação da reta:

y = concentração do analito (mg ml⁻¹).

x = área do pico do analito.

**Figura 2.** Cromatogramas das soluções padrão (concentração de 6,50 mg ml⁻¹) A) Ácido D-glicônico; B) Ácido 2-ceto-D-glicônico; C) Ácido 5-ceto-D-glicônico; D) Ácidos glicônicos totais; E) D-glicose; e, (F) controle negativo - 100 mg ml⁻¹.

não foi prejudicada mesmo na presença de 50 mg ml⁻¹ de D-Glicose e nem por outros constituintes da matriz (Figuras 4 e 5).

A fim de estimar a interferência da presença de D-Glicose nas análises foi realizada a quantificação de ácidos glicônicos totais (CLAE) e D-glicose (método enzimático colorimétrico) em misturas de padrão de ácidos glicônicos totais na concentração de 12,5 mg ml⁻¹ e matriz da amostra (100 mg de glicose ml⁻¹) e do padrão e fase móvel

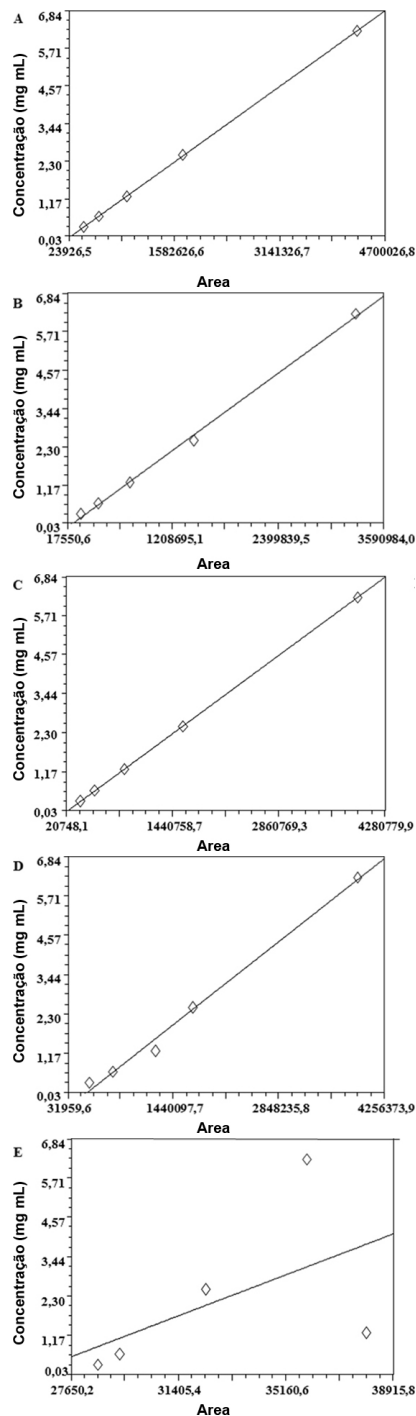
**Figura 3.** Curvas de calibração dos ácidos glicônicos e de glicose. A) Ácido D-glicônico; B) Ácido 2-ceto-D-glicônico; C) Ácido 5-ceto-D-glicônico; D) Ácidos glicônicos totais; E) D-glicose.

Tabela 2. Determinação de D-glicose por método enzimático-colorimétrico e de ácidos glicônicos por CLAE em misturas contendo 6,25 mg ml⁻¹ de cada analito.

Amostra	D-glicose (mg ml ⁻¹)*	% de detecção	Ácidos glicônicos (mg ml ⁻¹)*	% de detecção
D-glicose : Ác. D-glicônico	7,09	113,6%	6,58	105,6%
D-glicose : Ác. 2-ceto-D-glicônico	6,34	100,8%	6,60	104,0%
D-glicose : Ác. 5-ceto-D-glicônico	6,34	100,8%	6,47	104,0%

* Média de três replicatas.

(FM) ambas na proporção 1:1. Estes resultados estão apresentados na tabela 2.

A análise do sobrenadante do cultivo de PAL5 demonstrou potencial de produção de aproximadamente 33,10 mg de ácidos glicônicos totais ml⁻¹ de cultivo. Quanto a análise por método enzimático-colorimétrico foram detectados 24,20 mg de D-Glicose ml⁻¹ de cultivo (média de três replicatas), indicando um consumo pela bactéria de aproximadamente 76 mg de D-Glicose ml⁻¹ de cultivo após seis dias de incubação.

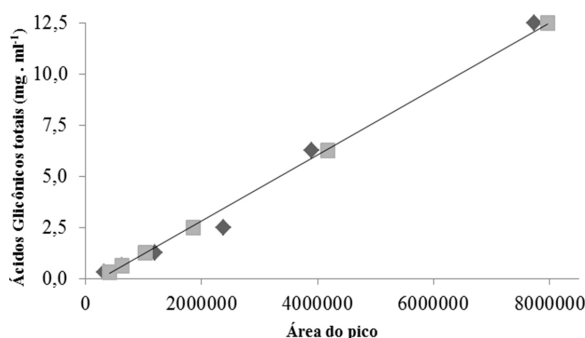


Figura 4. Curvas de calibração de padrão de ácidos glicônicos totais solubilizados em solvente orgânico (losangos) ou na matriz da amostra (quadrados).

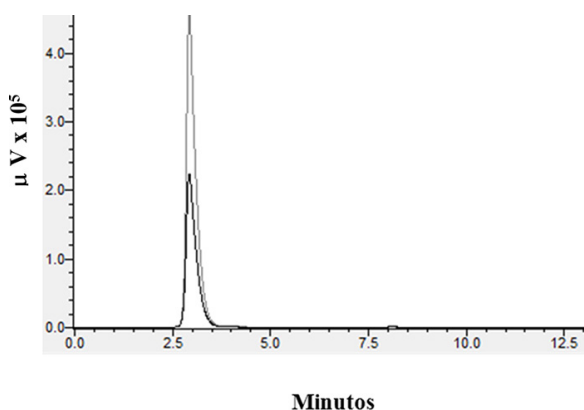


Figura 5. Perfil cromatográfico da amostra do sobrenadante do cultivo de PAL5: amostra pura (preto) e amostra adicionada de padrão interno (cinza).

Discussão

No Brasil, a Resolução n°899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AN-VISA) define critérios para validação de méto-

dos analíticos e bioanalíticos. Os coeficientes de determinação (R^2) e correlação (r) das curvas de calibração do ácido glicônico e cetoderivados foram superiores aos recomendados, enquanto que para D-glicose os coeficientes situaram-se muito abaixo ao recomendado denotando uma baixa sensibilidade do método para detecção deste composto.

Para análise de matérias-primas ou de materiais empregados na indústria farmacêutica os percentuais de detecção do analito devem situar-se no intervalo de 80 a 120% da concentração teórica (Anvisa, 2003). Neste estudo, a detecção de ácidos glicônicos totais por CLAE e da D-glicose pelo método enzimático-colorimétrico apresentaram percentuais de detecção dentro do intervalo recomendado os quais variaram de 104,0 a 105,6% para os ácidos glicônicos e de 100,8 a 113,6% para D-glicose.

Embora não tenha sido possível a separação do ácido D-glicônico de seus ceto derivados, o método demonstrou baixa interferência da presença de D-glicose e alta linearidade de resposta para detecção de ácidos glicônicos totais possibilitando, assim, uma análise quantitativa destes compostos. O método enzimático-colorimétrico empregado neste estudo permitiu confirmar que a concentração de glicose presente no meio de cultivo diminui concomitantemente com a produção e acúmulo de ácidos glicônicos totais.

As condições cromatográficas estabelecidas neste estudo constituem uma ferramenta para identificação e caracterização de microrganismos capazes de promover a solubilização de fosfato e outros minerais por meio da síntese de ácidos glicônicos.

Referências

- Anvisa (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil -Resolução RE n° 899, de 29/05/2003.
- Attwood M.M., Dijken J.P. van, Pronk J.T. (1991). Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. bioeng. 72: 101-105.
- Magalhães F.M., Baldani J.I., Souto S.M., Kuykendall J.R., Dobereiner J. (1983). A new acid-tolerant

- Azospirillum* species. An. Acad. Bras. Ciên. 55(4): 417-430.
- Herrmann U., Merfort M., Jeude M., Bringer-Meyer S., Sahm, H. (2004). Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 86-90.
- Inmetro (2011). Orientação sobre validação de métodos analíticos – Documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008, Revisão 04-JUL/2011. Coordenação Geral de Acreditação. 19p
- Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. Food Technol. Biotechnol. 44(2): 185-195.
- Rodriguez H., Ganzalez T., Goire I., Sashan Y. (2004). Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften. 91: 552-555.
- Saravanan V.S., Kalaiarasan P., Madhaiyan M., Thangaraju M. (2007) Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. Lett. Appl. Microbiol. 44(3): 235-241.
- Sharma A., Vivekanand V., Singh R. P. (2008). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. Bioresource Technol. 99: 3444-3450.
- Singh O. V., Kumar R. (2007). Biotechnological production of gluconic acid: future implications. Mini-review. Applied Microbiology and Biotechnology. 75: 713-722.
- Stephan M.P., Oliveira M., Teixeira K.R.S., Martinez-Drets G., Döbereiner J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67-72.
- Vyas P., Gulati A. (2009). Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiol. 9(174): 1-15.
- Vyas P., Joshi R., Sharman K. C., Rahi P., Gulati A., Gulati A. (2010). Cold-adapted and rhizosphere-competent strain of *Rahnella* sp. with broad-spectrum plant growth-promotion potential. J. Microbiol. Biotech. 20(12): 1724-1734.