ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO E AMBIENTAL

ISAAC LIMA POUBEL BOECHAT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO DE 2015

ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO E AMBIENTAL

ISAAC LIMA POUBEL BOECHAT

Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO DE 2015

ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM AMOSTRAS DE INTERESSE AGRONÔMICO E AMBIENTAL

ISAAC LIMA POUBEL BOECHAT

"Monografia apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Licenciado em Química."

Aprovada em 18 de dezembro de 2015.

Comissão Examinadora:

_____

Drª. Natália de Oliveira Aguiar
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

_____

Prof. Dr. Alessandro Coutinho Ramos
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

_____

Profª. Camila Ramos de Oliveira Nunes
Instituto Federal Fluminense – Campus Itaperuna

_____

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D. Ciência do Solo)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Aos meus irmãos Israel e Ismael, e principalmente aos meus pais Joadir e Eliane, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu Deus. Sem a Sua constante presença e ajuda, nenhum sucesso seria possível. Estando longe da família e dos amigos, a companhia dEle foi ainda mais fundamental.

Agradeço à minha família por me apoiar em todos os momentos e pelo suporte financeiro, emocional e espiritual para chegar até aqui. Aos meus pais, Joadir e Eliane, agradeço pelo cuidado em todos os aspectos. Aos meus irmãos, Israel e Ismael, pela ajuda em tudo o que precisei e pela companhia sempre agradável nos finais de semana.

Á minha preciosa namorada Emily, pela companhia e carinho tão especiais a mim dedicados e também pela compreensão quando a faculdade roubava meu tempo com ela. Por sempre me ouvir e animar quando precisei.

Aos meus amados irmãos e amigos da Casa de Oração da Buarque de Nazareth, que nunca deixaram de orar por mim e trazer uma palavra de incentivo. Em 4 anos de faculdade, o que mais ouvi foi “Estou orando por você!”.

Ao orientador Luciano Canellas, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo e adquirir inúmeros conhecimentos novos e pelas sugestões e propostas.

À minha co-orientadora Natália Aguiar pelos conselhos e pela experiência passada, e também a todos os companheiros do NUDIBA: Aminthia, Silézio, Lívia, Keiji, Bruna, Poliana, Jucimara e Kamila, pelos momentos de companheirismo e diversão.

Aos meus amigos e amigas do curso de Licenciatura em Química, por tornarem as semanas mais alegres e os momentos pré-provas mais leves.

Ao professor Alessandro Coutinho, por ceder as amostras analisadas.

A todos os professores do curso de Licenciatura em Química.

E também a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse ao final dessa caminhada, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 6

LISTA DE TABELAS 7

SIGLAS, ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS 8

RESUMO 9

1. INTRODUÇÃO 10

1.1. Ácidos orgânicos e a interação planta-solo-microrganismos 10

1.2. Metodologias para detecção de ácidos orgânicos em CLAE 11

1.3. Transições eletrônicas e absorções na faixa de ultravioleta (UV) 13

1.4. Revisão da literatura dos métodos utilizados para análise de ácidos orgânicos utilizando a técnica de CLAE 15

2. OBJETIVO 16

2.1. Objetivo geral 16

2.2. Objetivos específicos 16

3. METODOLOGIA 16

3.1. Condições cromatográficas 16

3.2. Preparo dos padrões e das curvas analíticas 17

3.3. Preparo das amostras 17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 18

4.1. Tempo de retenção dos ácidos 18

4.2. Curvas de calibração 19

4.3. Análise das amostras bacterianas 21

5. CONCLUSÃO 28

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de uma coluna de exclusão iônica 12
Figura 2: Superfície da fase estacionária 12
Figura 3: Espectro eletromagnético 13
Figura 4: Transições eletrônicas e seus níveis energéticos 14
Figura 5: Estruturas moleculares dos ácidos salicílico e fumárico.....14
Figura 6: Cromatograma da mistura de ácidos 19
Figura 7: Cromatogramas de ácido acético em diferentes concentrações 20
Figura 8: Cromatogramas de ácido glucônico em diferentes concentrações 20
Figura 9: Cromatogramas das amostras de bactérias isoladas e controle 21
Figura 10: Cromatogramas das amostras de bactérias isoladas (continuação) 22
Figura 11: Cromatogramas das amostras de bactérias combinadas 22
Figura 12: Cromatogramas das amostras de bactérias combinadas (continuação).23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metodologias utilizadas para análise de ácidos orgânicos em HPLC 15
Tabela 2: Tempo de retenção e concentração de cada ácido na mistura 19
Tabela 3: Curvas de calibração utilizadas (concentração *vs* área do pico) 21
Tabela 4: Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura das diferentes bactérias e possível identificação por comparação com o tempo de retenção em relação aos padrões.....24
Tabela 5: Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura nas diferentes combinações de bactérias (B) e possível identificação por comparação com o tempo de retenção (TR) em relação aos padrões 26

SIGLAS, ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
B	Bactérias
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de variação
HPLC	*High performance liquid chromatography*
NBRIP	*National Botanical Research Institute Phosphate*
RP-HPLC	*Reverse phase - High performance liquid chromatography*
SD	Desvio padrão
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

RESUMO

A exsudação de ácidos orgânicos pelas plantas e microrganismos é uma estratégia importante de adaptação ao ambiente envolvendo a solubilização de espécies insolúveis de fósforo e micronutrientes e a redução da toxidez de Al^{3+}. Pode, ainda, contribuir para regulação da comunidade microbiana e para inibição de crescimento de plantas concorrentes. O objetivo desse trabalho foi o de estabelecer um procedimento para determinação de ácidos orgânicos em amostras de interesse agronômico e ambiental utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram analisados exsudados provenientes de diferentes bactérias solubilizadoras de fósforo e combinação das mesmas em meio de cultura. Foi utilizada uma coluna Rezex-ROA de exclusão iônica, específica para análise de ácidos orgânicos, preenchida com esferas de poliestireno-divinilbenzeno sulfonado e contendo a forma iônica H^+. Como fase móvel uma solução aquosa de H_2SO_4 0,005 mol/L e fluxo de 0,6 mL/min a pH 3,0. Foi identificada nas amostras a presença dos seguintes ácidos: acético, oxálico, cítrico, glucônico, málico, succínico, fumárico e propiônico nas faixas de concentração entre 5 e 6000 mg L^{-1}. O ácido mais abundante foi o glucônico, presente em 100% das amostras. A mistura de bactérias não altera significativamente a produção de ácidos orgânicos em comparação com o cultivo isolado. O procedimento adotado apresentou boa reprodutibilidade tanto qualitativa quanto quantitativamente e pode ser empregado para determinação de ácidos orgânicos em amostras de interesse agronômico e ambiental.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácidos orgânicos e a interação planta-solo-microrganismos

As plantas e os microrganismos presentes no solo estão em constante interação entre si. As substâncias químicas liberadas tanto pelas raízes das plantas como pelos microrganismos são responsáveis por essa interação e são conhecidas como exsudados. Numa mesma planta, partes diferentes da raiz poderão contribuir para o crescimento de microrganismos ou combate-los, o que acarreta em mudanças na exsudação radicular, tanto qualitativa quanto quantitativamente (Yang e Crowley, 2000).

A composição dos exsudados, via de regra, segue a composição encontrada no citoplasma das plantas. Azaizeh et al. (1995) encontraram, portanto, principalmente açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e fenóis em amostras de exsudados de milho. É possível indicar que a composição dos exsudados sofra alguma alteração para que a planta se adapte ao ambiente uma vez que as mesmas são organismos sésseis.

Em ambientes tropicais é comum a escassez nutricional devido ao intemperismo intenso das rochas e a adsorção de elementos químicos com os óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de ferro e de alumínio (Almeida e Velloso, 1982) abundantes nesses ambientes. Além disso, a absorção contínua de nutrientes pelas raízes cria uma zona de depleção nutricional de 1 a 3 mm a partir da superfície da raiz, onde o gradiente de concentração de nutrientes tem difusão lenta e a concentração de fósforo, por exemplo, pode diminuir de 5 a 10 vezes em relação a solução do solo longe da influência da raiz (Kuzyakov e Xu, 2013). A exsudação de ácidos orgânicos é uma estratégia importante para a adaptação e sobrevivência da planta (Jones et al., 2004).

Dentre as atividades destes ácidos na rizosfera, encontram-se: a solubilização e disponibilização de espécies insolúveis de fósforo e micronutrientes (Marschener et al.,1998); redução da toxidez do solo, principalmente devido à presença de Al^{3+} (Taylor, 1988; Kochian, 1995; Kidd et al., 2001); regulação da comunidade microbiana e inibição do crescimento de plantas concorrentes (Nardi et al., 2000).

Os microrganismos que fazem algum tipo de interação benéfica com a planta são beneficiados pelos produtos da fotossíntese que fornecem energia (açúcares solúveis) para o seu metabolismo. Por outro lado, podem contribuir para o

crescimento das plantas liberando compostos similares aos hormônios, fixando nitrogênio atmosférico ou exsudando ácidos orgânicos e aumentando a solubilidade de formas de fósforo e outros elementos químicos essenciais (Olivares, 2009).

A agricultura baseada em processos biológicos precisa entender os fundamentos que regulam os fluxos de massa e energia entre as plantas e microrganismos. O solo e sua complexidade, assim como a baixa concentração dos exsudados, constituem uma barreira metodológica importante no desenvolvimento das técnicas de avaliação desses fluxos. O trabalho em meio hidropônico ou em outros meios de crescimento podem simplificar o estudo e permitir a obtenção de uma avaliação bem aproximada quando usados métodos adequados tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, em inglês).

1.2. Metodologias para detecção de ácidos orgânicos em CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou *High performance liquid chromatography* (HPLC) tem sido utilizada em muitos trabalhos para a detecção de ácidos orgânicos em amostras de diferentes procedências, inclusive na análise de exsudados de raízes (Jianbo et al., 1998, 1999). Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins e Guimarães, 1988).

Para detecção e quantificação de ácidos orgânicos por CLAE, pode ser usada uma coluna do tipo Octadecil Silano, ou simplesmente C18, que possui vasta aplicabilidade analítica e serve para separações em fase reversa. O recheio da coluna é feito de gel de sílica com diversos grupos funcionais hidrofóbicos, sendo o mais comum o octadecil. Sendo assim, a separação está diretamente ligada à diferença de polaridade entre os compostos da amostra. Compostos mais polares sairão primeiro para o detector, e compostos menos polares terão maior interação com a fase estacionária, ficando assim retidos na coluna por mais tempo. Como os ácidos orgânicos são muito polares essa coluna apresenta alguma dificuldade quando estão presentes muitos ácidos orgânicos diferentes numa amostra ou quando não se conhece previamente a natureza química da amostra. Normalmente, as fases móveis utilizadas para análises na C18 são misturas de tampões aquosos com solventes polares, como metanol e acetonitrila.

Pode-se também utilizar uma coluna de exclusão iônica, como a Rezex-ROA. Ela é preenchida com esferas de poliestireno-divinilbenzeno sulfonado e contém a forma iônica H^+, indicada exatamente para análise de ácidos orgânicos. Esta técnica, na realidade, tem sido comumente utilizada para a separação de espécies moleculares, e não de íons. O processo de separação neste tipo de cromatografia está baseado em diferenças de tamanho molecular, formato estrutural e carga. Espécies completamente dissociadas são excluídas da fase estacionária e ânions são repelidos pela carga negativa da superfície, e ambos não sofrerão separação cromatográfica. As figuras 1 e 2 representam esquematicamente a formação da membrana de Donnan a partir dos grupos sulfonados carregados negativamente, e como ocorre a exclusão de íons indesejáveis.

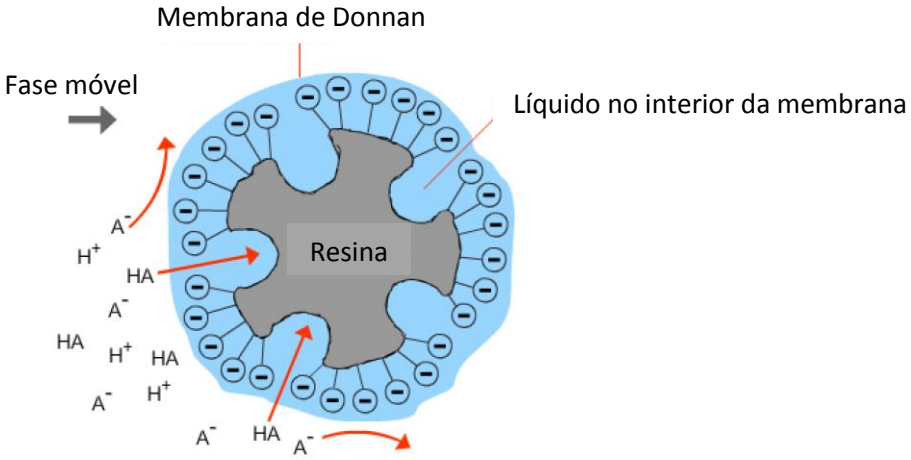

Figura 1 - Esquema representativo de uma coluna de exclusão iônica (Fonte: www.chromacademy.com).

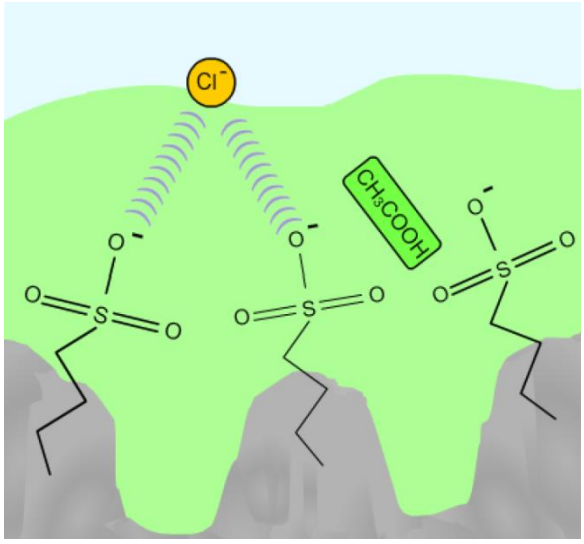

Figura 2 - Superfície da fase estacionária. Ânions são repelidos, e as moléculas de interesse são direcionadas para o interior da membrana de Donnan (Fonte: www.chromacademy.com).

Outro aspecto importante a ser destacado é a escolha da fase móvel. Nota-se, nos trabalhos já realizados com ácidos orgânicos em CLAE, a utilização de modificadores ácidos, sejam eles orgânicos (acético ou fórmico) ou minerais (ácido sulfúrico ou ácido fosfórico) na fase móvel, que passa a ter um pH em torno de 2-3. Quando o analito que se deseja separar é um ácido orgânico, a tendência é que haja um equilíbrio entre o próprio ácido e sua forma ionizada, o que acarretaria, na prática, a presença de um pico alargado no cromatograma, devido a uma pequena variação no tempo de retenção de cada uma das formas presentes. Para corrigir este problema, adiciona-se um modificador ácido na fase móvel, que desloca o equilíbrio no sentido do ácido protonado. Assim, tem-se apenas um pico fino e melhor definido (Borges et al., 2012).

1.3. Transições eletrônicas e absorções na faixa de ultravioleta (UV)

Para que seja feita uma boa escolha do comprimento de onda utilizado nas análises com o detector de UV, torna-se necessário o entendimento do fenômeno de absorção de luz, comum também a outros métodos espectroscópicos. A região do espectro de ultravioleta que é importante do ponto de vista estrutural vai de cerca de 200 nm a 380 nm, também chamada de UV próximo.

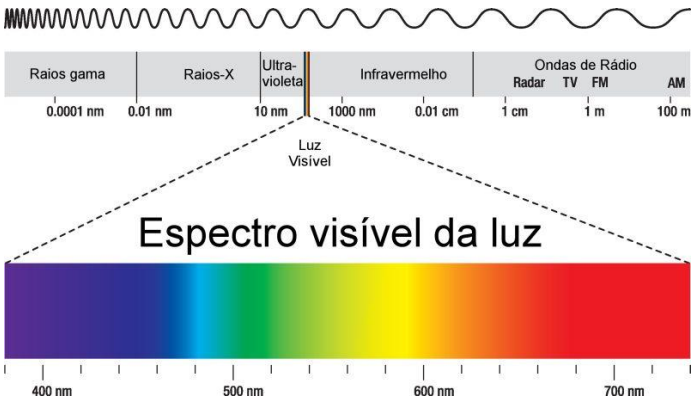

Figura 3 - Espectro eletromagnético.

A energia de uma determinada radiação eletromagnética está relacionada ao seu comprimento de onda, como demonstra a equação,

$$E = hc / \lambda ,$$

na qual h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda da radiação. Quando uma molécula absorve a energia na

região do UV, ocorre uma transferência de elétrons de um orbital molecular ocupado, que normalmente é orbital não-ligante n ou orbital ligante π, para um orbital antiligante (σ* ou π*). Dessa forma, as transições são representadas como a seguir: π → π*.

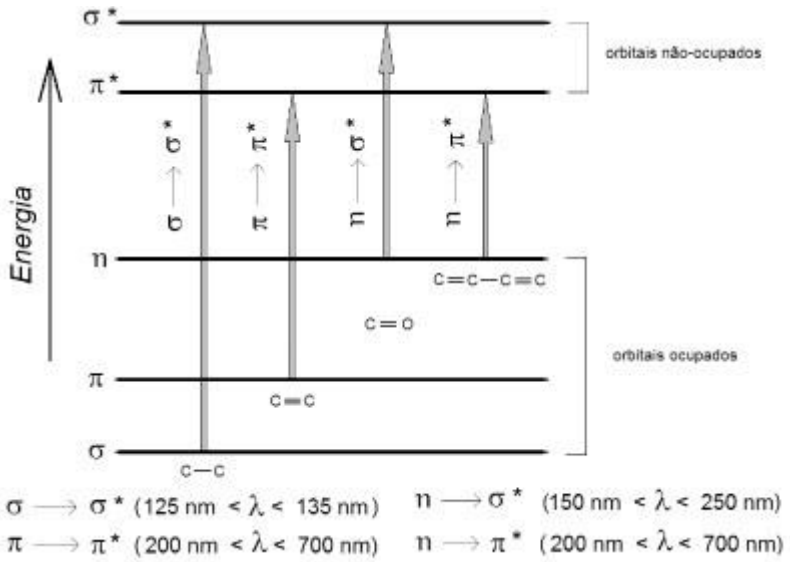

Figura 4 - Transições eletrônicas e seus níveis energéticos (Assis, 2013)

Os grupos representados na Figura 4, e que absorvem a radiação ultravioleta, são denominados cromóforos. As duplas ligações entre carbonos, conjugadas ou não, e as ligações duplas entre carbono e oxigênio tem em comum a presença de elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas. Os ácidos orgânicos, em sua estrutura, possuem esses cromóforos, seja pela presença de anéis aromáticos ou pela própria carboxila, que caracteriza este grupo.

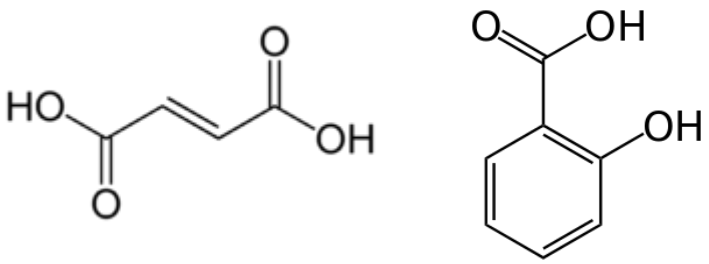

Figura 5 - Estruturas moleculares dos ácidos fumárico e salicílico.

Sendo assim, a faixa de comprimento de onda mais utilizada, e de forma eficiente, para análise de ácidos orgânicos no UV varia entre 200 nm e 215 nm.

1.4. Revisão da literatura dos métodos utilizados para análise de ácidos orgânicos por CLAE

Para que fosse testada e escolhida uma metodologia eficiente, foi realizado estudo prévio dos diferentes métodos já utilizados em análises qualitativas e quantitativas de ácidos orgânicos em amostras de diferentes matrizes, todas elas utilizando a técnica de CLAE. A Tabela 1 a seguir descreve, resumidamente, alguns desses trabalhos com seus respectivos métodos.

Tabela 1 - Metodologias utilizadas para análise de ácidos orgânicos em CLAE.

Matriz da amostra	Ácidos orgânicos analisados	Coluna utilizada	Fase móvel utilizada	Detecção UV (λ)	Referência
Exsudados de raízes de milho	Málico, cítrico, succínico e t-aconítico	GROM-SIL C-18, 250x4 mm	Solução 18 mmol/L de KH_2PO_4	215 nm	Campos et al. (2002)
Amostras de café da Etiópia e cultivares de café arábica	Quínico, málico e cítrico	Rezex ROA H^+ (8%), 300x7,8 mm	Solução de H_2SO_4 0,005 N	210 nm	Scholz et al. (2015)
Amostras de vinho	Tartárico, málico, cítrico, lático e succínico	C-18, 250x4,6 mm	Solução de H_3PO_4 0,12% e acetonitrila 0,1%	212 nm	Lima et al. (2010)
Amostras de rizosfera de cafeeiro	Cítrico, oxálico, acético, butírico e propiônico	C-18, 250x4,6 mm	Solução de H_3PO_4 0,1%	230 nm	Silva et al. (2002)
Amostras de rizosfera de plantas daninhas	Acético, butírico, cítrico, oxálico e propiônico	C-18 de fase reversa	Solução de H_3PO_4 0,1%	230 nm	Silva et al. (2001)
Amostras de resíduos de plantas de cobertura	Oxálico, cítrico, tartárico, trans-aconítico, málico e fumárico	Aminex-HPX-87H (BioRad)	Solução de H_2SO_4 0,005 mol/L	210 nm	Amaral et al. (2004)
Extratos de *Capsella bursa-pastoris*	Oxálico, cítrico, málico, quínico, chiquímico e fumárico	Nucleogel Ion 300 OA	Solução de H_2SO_4 0,01 N	214 nm	Grosso et al. (2011)
Extratos de variedades comerciais de uva	Cítrico, málico e tartárico	C-18 250x4,6 mm	Solução de H_2SO_4 0,0085 N	195 nm	Muñoz-Robredo et al. (2011)

Nota-se que em apenas um dos trabalhos descritos foi utilizada a coluna Rezex-ROA. A maior parte dos trabalhos utiliza colunas C-18, sendo que já se conhecia a composição básica das amostras. Neste presente trabalho, a coluna Rezex-ROA foi escolhida por ser específica para análise de ácidos orgânicos, e porque não se conhecia completamente as amostras. Dessa forma, foi eliminada a presença de picos que não estivessem relacionados à presença de ácidos orgânicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um protocolo para análise de ácidos orgânicos exsudados por plantas e bactérias utilizando a técnica de CLAE.

2.2. Objetivos específicos

1 – Compreender a importância da exsudação de ácidos orgânicos por plantas e bactérias na interação entre elas e no crescimento vegetal;

2 – Avaliar diferentes metodologias para detecção de ácidos orgânicos por CLAE;

3 – Compreender a importância da técnica de CLAE em análises de interesse agronômico e ambiental;

4 – Avaliar modificações no perfil de exsudação de ácidos orgânicos em bactérias promotoras do crescimento vegetal isoladas e combinadas em pares.

3. METODOLOGIA

3.1. Condições cromatográficas

Foi utilizado o sistema RP-HPLC YoungLin Acme 9000 (Seul, Korea) que consiste de dois detectores em série, um UV-Vis (YoungLin) operando a 210nm e um Índice de Refração; uma bomba isocrática, um injetor automático e um loop de 100 µL para injeção manual da amostra. Foram programadas injeções de 20 µL de cada amostra. O sistema estava acoplado a um computador, que processa os dados pelo software Autochro 3000. Utilizou-se a coluna Rezex-ROA Organic Acid H^+ (8%), de dimensões 300 x 7,8 mm. Foram testadas duas fases móveis diferentes: solução de H_2SO_4 0,005 mol/L em água Mili-Q (ultrapura) e solução de H_3PO_4 0,1% em água Milli-Q (ultrapura), ambas filtradas em filtro de membrana HA em ésteres de celulose (47 mm). No início dos testes, foi utilizada uma coluna Rezex-ROA com considerável tempo de uso. Foram feitos alguns testes variando-se a fase móvel e o comprimento de onda no detector de ultravioleta. Metodologias de limpeza e regeneração da coluna também foram trabalhadas. Em seguida, a coluna foi substituída por uma Rezex-ROA nova, ainda não utilizada. Foi escolhida a fase móvel de H_2SO_4 0,005 mol/L em água Milli-Q (ultrapura), filtrada em filtro HA em ésteres de celulose (47 mm), com fluxo de 0,6 mL/min.

3.2. Preparo dos padrões e das curvas analíticas

Para determinação do tempo de retenção de cada ácido orgânico analisado, foram injetados padrões dissolvidos em água Mili-Q (ultrapura) em concentrações variadas. Os ácidos oxálico, cítrico, succínico, glucônico, málico, propiônico e fumárico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). O ácido acético utilizado foi da Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, foram injetados também os ácidos em conjunto, para verificação das condições de separação cromatográfica. Para fins de caracterização quantitativa das amostras, foram construídas curvas de calibração (concentração *versus* área do pico) para cada um dos ácidos identificados através da comparação com o tempo de retenção dos picos padrões. Em cada curva, foram utilizadas quatro concentrações diferentes, e as análises foram feitas em duplicata.

3.3. Preparo das amostras

Foram analisadas amostras de exsudados de nove bactérias diferentes, individualmente e em combinações. Para fins de identificação, as amostras foram nomeadas da seguinte forma: B1, B2, B3, B6, B7, B8, B10, B12 e B13, onde cada número representa uma bactéria diferente. As bactérias foram cultivadas em meio Agar Nutriente. Após 24h, uma alçada foi transferida para tubo Falcon contendo meio líquido Caldo Nutritivo (composição: Beef Extract, Enzymatic digest of gelatin) e deixada overnight. Depois de crescidas overnight, as bactérias foram transferidas para o meio líquido NBRIP (meio utilizado para solubilizadoras de fosfato). Em seguida, as amostras foram filtradas, centrifugadas e congeladas. Antes de serem analisadas, elas foram homogeneizadas, e uma alíquota de 1,5 mL foi novamente centrifugada numa centrífuga Datamed Thermo Scientific Fresco 17. O sobrenadante foi transferido para o vial e inserido no amostrador automático do equipamento. Todas as amostras analisadas encontravam-se numa faixa de pH entre 4 e 5.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tempo de retenção dos ácidos

Na etapa de identificação dos tempos de retenção de cada um dos ácidos, o primeiro passo foi injetá-los individualmente. Enquanto foi utilizada uma coluna Rezex-ROA mais antiga, esse objetivo não foi atingido. O trabalho foi iniciado com uma fase móvel de H_3PO_4 0,1% em água Milli-Q (ultrapura), e em seguida alterada para a fase móvel de H_2SO_4 0,005 mol/L em água Milli-Q (ultrapura), porém sem alteração nos resultados obtidos. Os cromatogramas apresentavam, para todos os ácidos, apenas um pico num mesmo tempo de retenção. Foram testadas metodologias de limpeza e regeneração da coluna, que também não alteraram os resultados. Sendo assim, a coluna foi trocada por uma nova, que ainda não havia sido utilizada. Nesta nova tentativa, foi utilizada a fase móvel de H_2SO_4. Já nos primeiros testes, foram obtidos cromatogramas com boa resolução. Os tempos de retenção de oito ácidos orgânicos foram identificados separadamente, e em seguida foram misturados numa mesma solução para verificarmos a eficiência de separação da coluna.

Como o equipamento fornece dados de absorção no ultravioleta em apenas um comprimento de onda, e não em varredura, alguns ácidos apresentaram intensidades muito maiores do que outros, mesmo estando em concentrações bem menores. Entende-se que nem todos os ácidos analisados apresentam absorção máxima no comprimento de onda utilizado (210 nm). Logo, não apresentarão picos tão intensos quanto outros, mesmo que as concentrações sejam muito maiores.

A figura 6 apresenta o cromatograma obtido para a mistura dos oito ácidos analisados, e a tabela 2 apresenta os tempos de retenção de cada um deles, a concentração em que estavam (seguida do desvio padrão) e também o coeficiente de variação obtido.

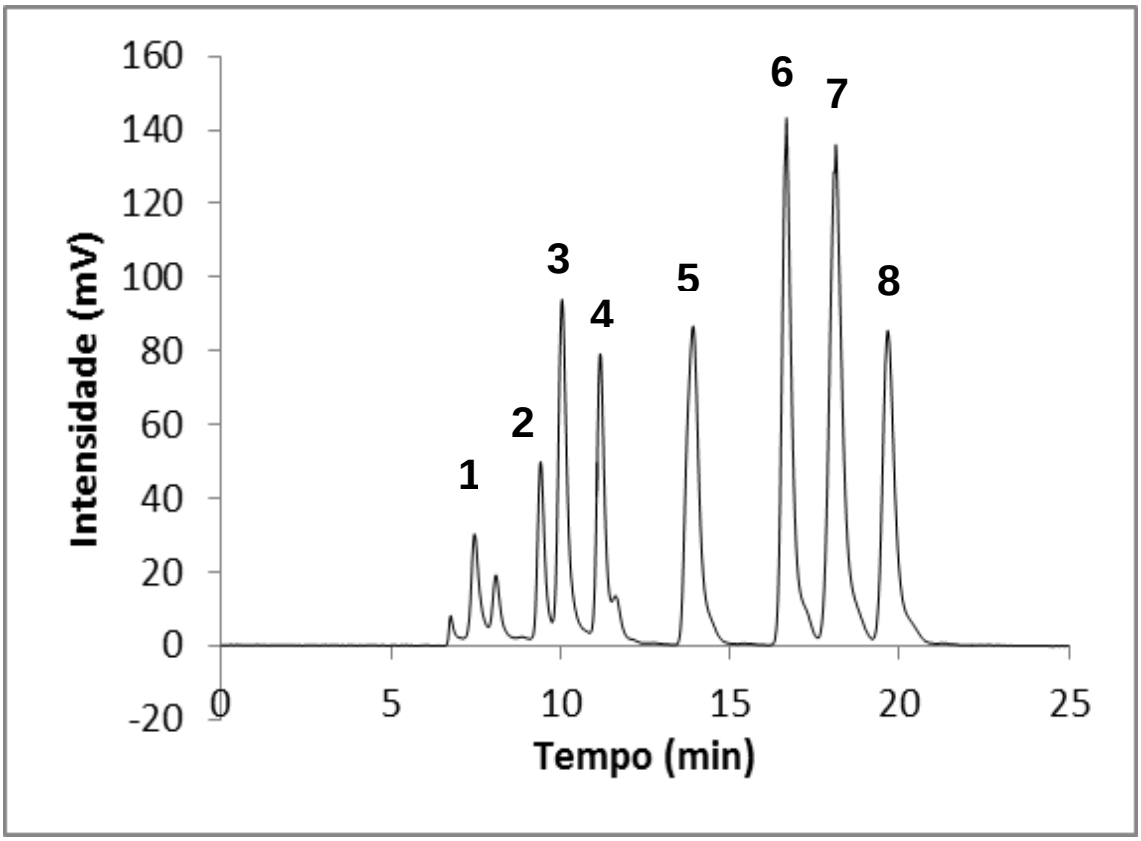

Figura 6 - Cromatograma da mistura de ácidos (fase móvel H_2SO_4 0,005 mol/L, fluxo 0,6 mL/min, UV 210 nm).

Tabela 2 - Tempo de retenção (TR) em minutos e concentração (mg/L) de cada ácido na mistura. Valores de média (n=3) seguidos do desvio padrão (±SD) e coeficiente de variação (CV=SD*100/média).

Número	Ácido	TR (min)	Concentração (mg/L)	CV
1	Oxálico	7.37	38,9 ± 0,4	1,0 %
2	Cítrico	9.32	377,3 ± 0,4	0,1 %
3	Glucônico	9.95	1688,8 ± 7,0	0,4 %
4	Málico	11.08	813,6 ± 4,8	0,6 %
5	Succínico	13.83	2026,0 ± 3,6	0,2 %
6	Acético	16.55	2655,4 ± 2,0	0,1 %
7	Fumárico	18.03	15,2 ± 0,1	0,7 %
8	Propiônico	19.55	1507,7 ± 2,4	0,2 %

4.2. Curvas de calibração

Conhecendo-se os tempos de retenção dos ácidos, o segundo passo foi realizar análises dos ácidos em diferentes concentrações, verificando assim se haveria proporcionalidade entre concentração e intensidade / área dos picos. Dessa forma, foram construídas também curvas de calibração para cada um dos oito ácidos utilizados. Foi possível observar uma boa resposta do equipamento às variações de concentração realizadas, e consequente linearidade nas curvas de calibração. As figuras 7 e 8 apresentam os cromatogramas obtidos para os ácidos

acético e glucônico, como exemplo, em diferentes concentrações, e a tabela 3 descreve as curvas de calibração que foram utilizadas em cada caso.

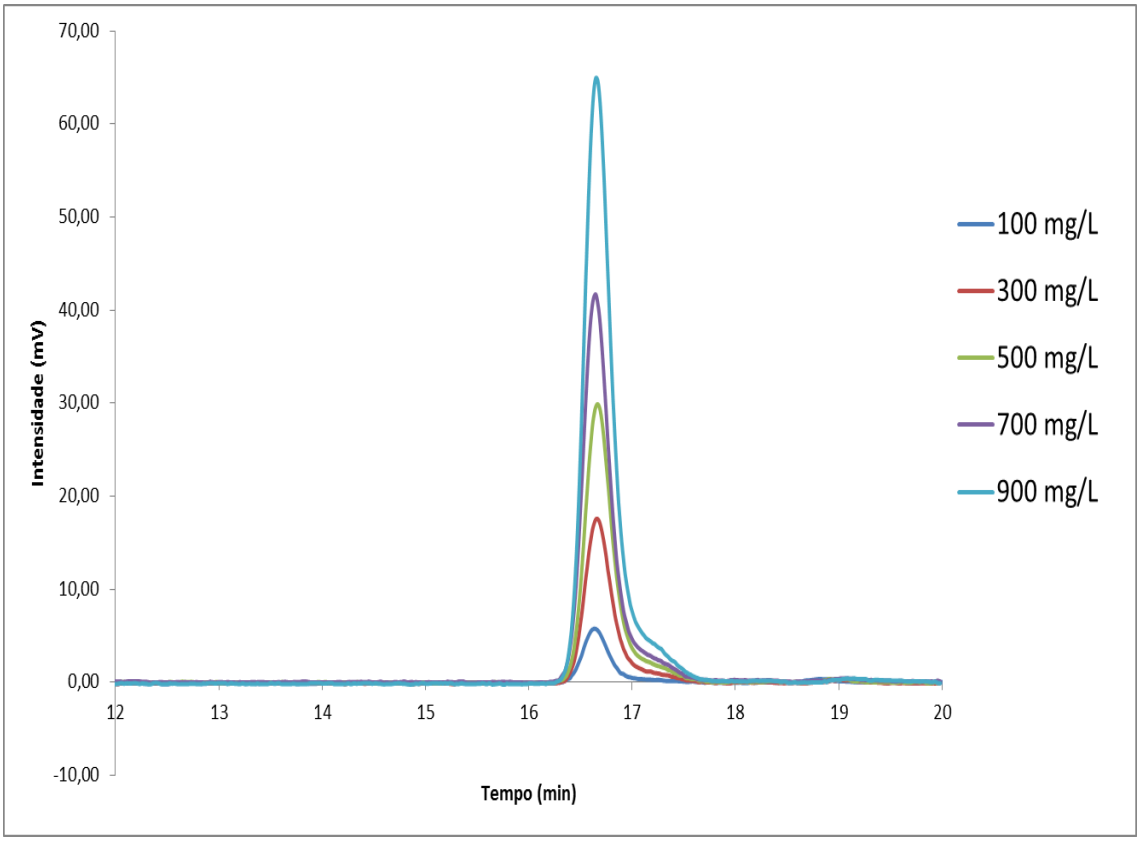

Figura 7 - Cromatogramas de ácido acético em diferentes concentrações.

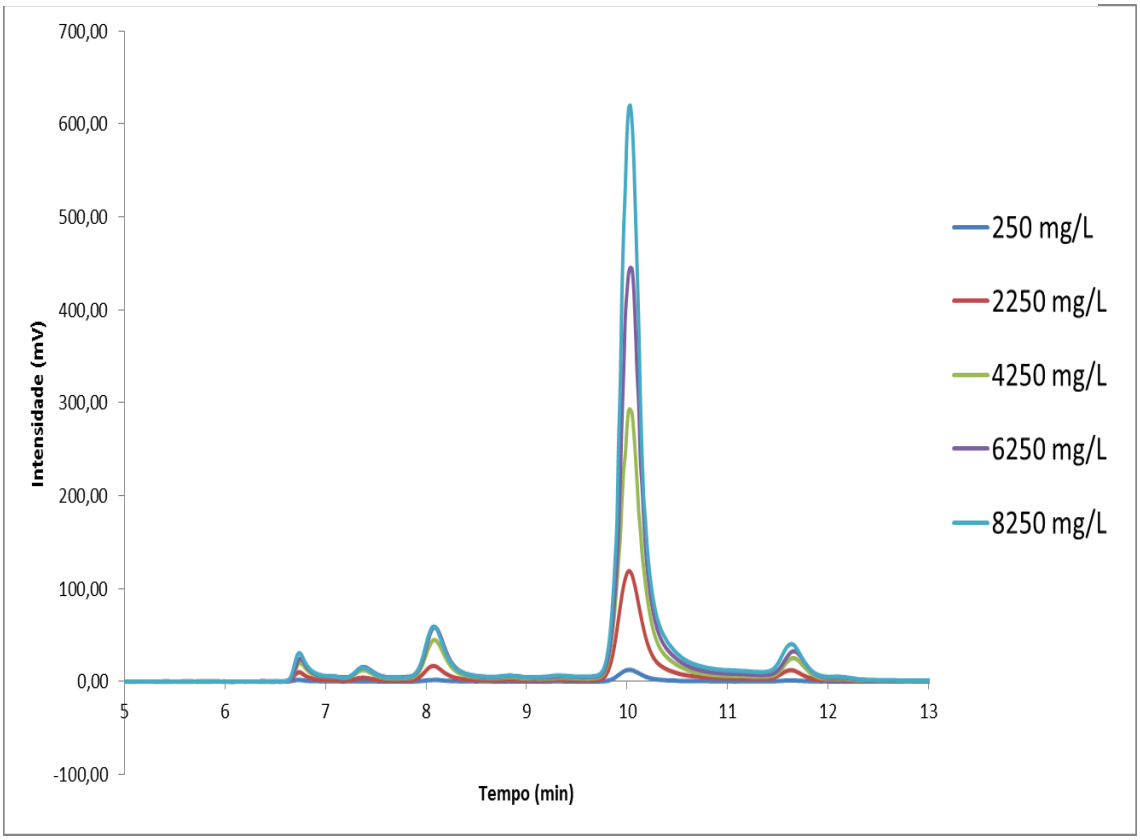

Figura 8 - Cromatogramas de ácido glucônico em diferentes concentrações.

Tabela 3 - Curvas de calibração utilizadas (concentração *VS* área do pico).

Ácido	Equação da reta	R^2	Concentrações (mg L^{-1})
Oxálico	y = 14,3465x - 2,4480	0,9994	10, 20, 30, 40
Cítrico	y = 2,0692x - 4,8461	0,9994	20, 100, 300, 500
Glucônico	y = 1,2219x - 228,4029	0,9979	250, 2250, 4250, 6250, 8250
Málico	y = 1,7067x - 76,9196	0,9971	100, 900, 1500, 2250
Succínico	y = 1,1471x - 1,0265	0,9999	200, 500, 1500, 2500
Acético	y = 1,4951x - 89,8599	0,9729	100, 300, 500, 700, 900
Fumárico	y = 263,9870x - 253,8608	0,9916	2, 10, 20, 30
Propiônico	y = 1,3007x - 23,2489	0,9991	50, 100, 200, 300, 400

4.3. Análise das amostras bacterianas

Com a metodologia bem definida e com os resultados satisfatórios tanto qualitativa quanto quantitativamente, o passo seguinte foi analisar as amostras de exsudados bacterianos, avaliando os ácidos que estavam presentes e suas respectivas concentrações. As figuras 9 e 10 apresentam os cromatogramas obtidos para as bactérias isoladas, e as figuras 11 e 12 para as combinações utilizadas.

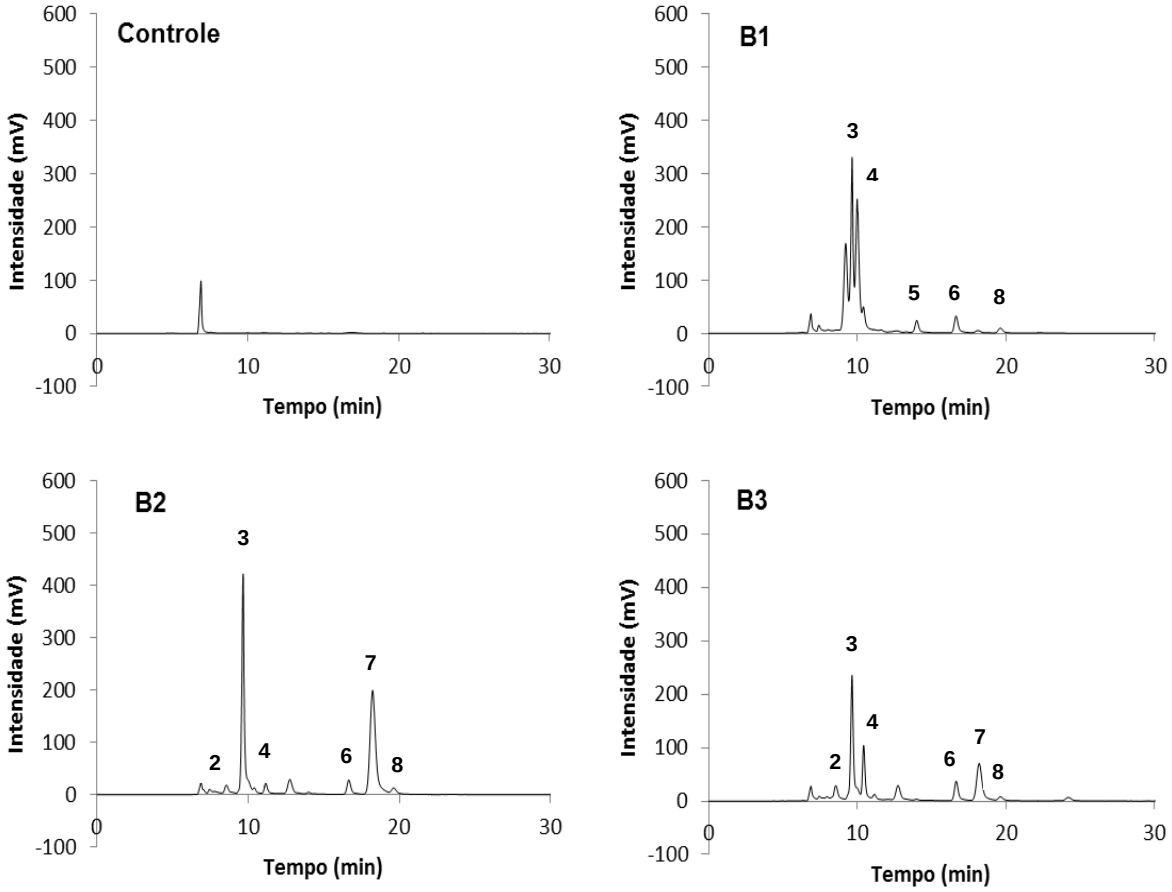

Figura 9 - Cromatogramas das amostras de bactérias isoladas e controle (1 = oxálico / 2 = cítrico / 3 = glucônico / 4 = málico / 5 = succínico / 6 = acético / 7 = fumárico / 8 = propiônico).

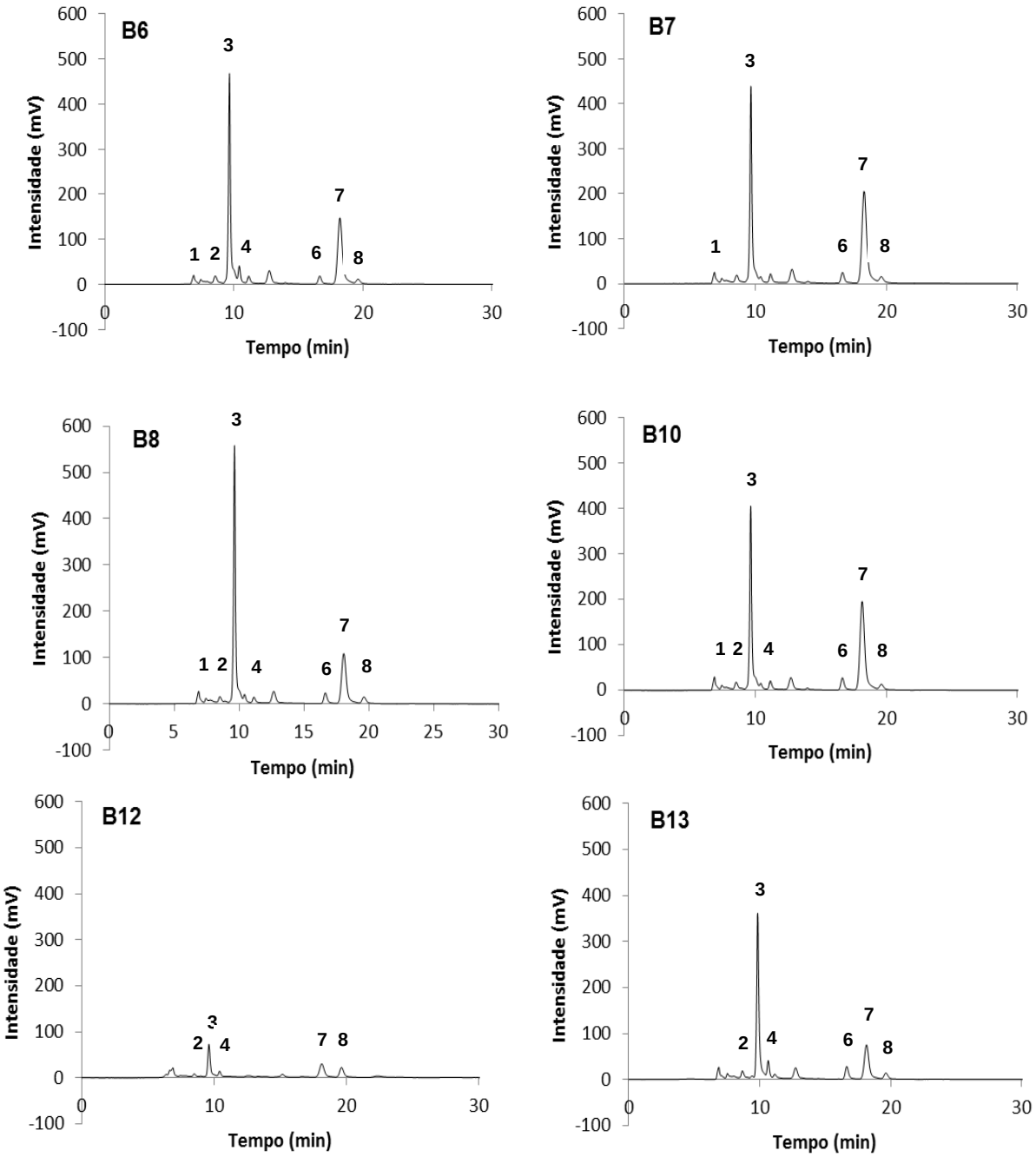

Figura 10 - Cromatogramas das amostras de bactérias isoladas (continuação) (1 = oxálico / 2 = cítrico / 3 = glucônico / 4 = málico / 5 = succínico / 6 = acético / 7 = fumárico / 8 = propiônico).

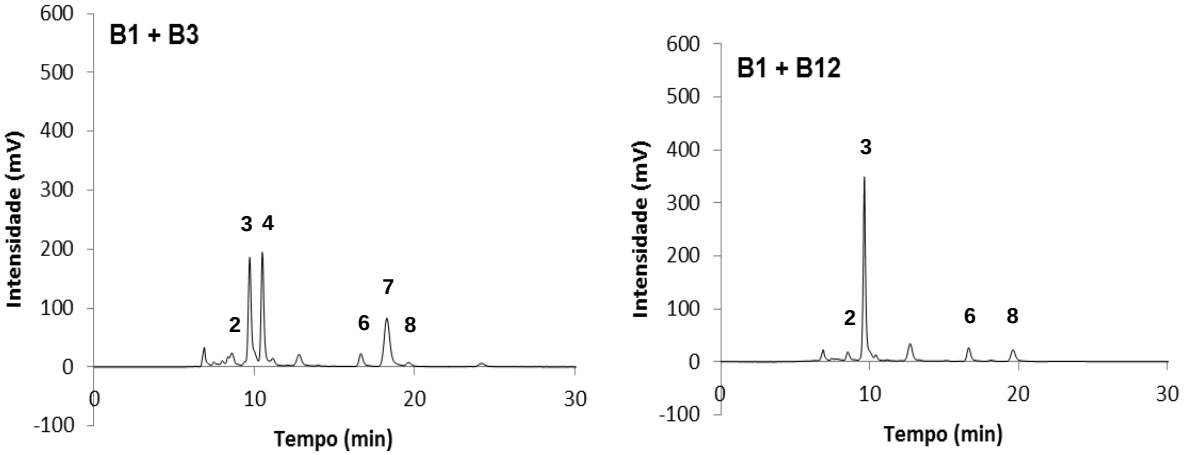

Figura 11 - Cromatogramas das amostras de bactérias combinadas (1 = oxálico / 2 = cítrico / 3 = glucônico / 4 = málico / 5 = succínico / 6 = acético / 7 = fumárico / 8 = propiônico).

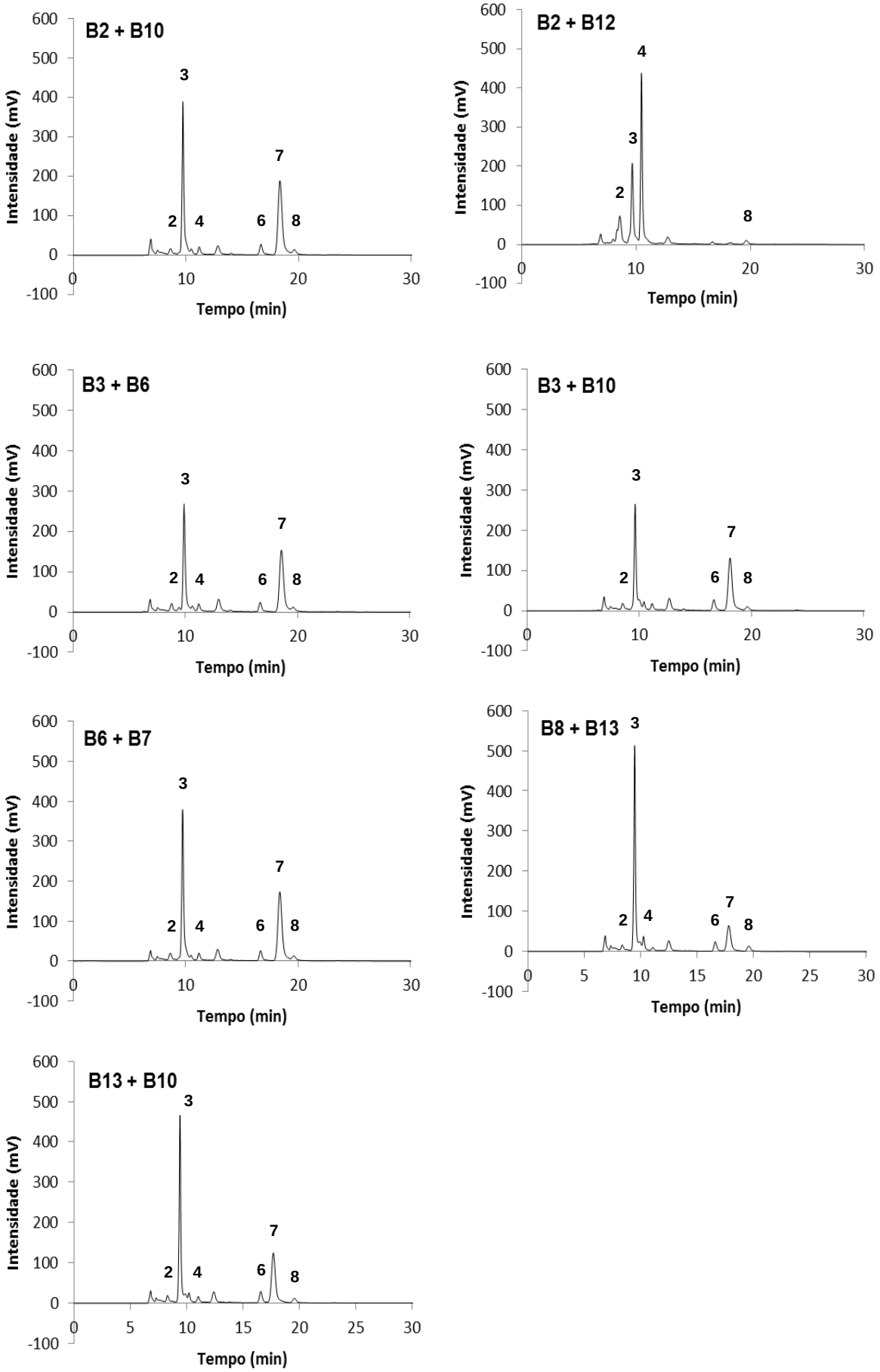

Figura 12 - Cromatogramas das amostras de bactérias combinadas (continuação) (1 = oxálico / 2 = cítrico / 3 = glucônico / 4 = málico / 5 = succínico / 6 = acético / 7 = fumárico / 8 = propiônico).

Tabela 4 – Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura das diferentes bactérias (B) e possível identificação por comparação com o tempo de retenção (TR) em relação aos padrões. Concentração média ± desvio padrão (n = 2).

Amostra (bactérias isoladas)	TR (min)	Possível ácido	Concentração (mg L^{-1})
B1	9,68	Glucônico	3298,6 ± 43,0
	10,41	Málico	561,5 ± 23,6
	14,01	Succínico	386,2 ± 14,6
	16,67	Acético	478,9 ± 1,7
	19,6	Propiônico	174,1 ± 1,6
B2	8,55	Cítrico	218,2 ± 0,5
	9,65	Glucônico	4309,5 ± 10,7
	10,42	Málico	173,6 ± 1,0
	16,65	Acético	440,4 ± 0,2
	18,17	Fumárico	22,8 ± 0,1
	19,63	Propiônico	269,2 ± 9,8
B3	8,57	Cítrico	302,9 ± 1,8
	9,65	Glucônico	2926,5 ± 3,8
	10,43	Málico	860,3 ± 2,9
	16,67	Acético	533,3 ± 2,0
	18,25	Fumárico	8,1 ± 0,1
	19,63	Propiônico	175,8 ± 0,6
B6	7,45	Oxálico	15,3 ± 0,9
	8,57	Cítrico	209,2 ± 7,8
	9,67	Glucônico	4847,9 ± 25,6
	10,43	Málico	391,6 ± 14,4
	16,67	Acético	288,5 ± 10,3
	18,22	Fumárico	16,1 ± 0,2
	19,63	Propiônico	232,6 ± 2,6
B7	7,43	Oxálico	12,0 ± 0,7
	8,58	Cítrico	202,8 ± 12,7
	9,67	Glucônico	4669,9 ± 33,4
	10,4	Málico	183,5 ± 17,7
	16,67	Acético	376,5 ± 3,4
	18,28	Fumárico	22,1 ± 0,1
	19,62	Propiônico	330,0 ± 19,2
B8	7,45	Oxálico	11,2 ± 0,5
	8,53	Cítrico	129,3 ± 1,1
	9,68	Glucônico	5450,7 ± 16,0
	10,48	Málico	206,9 ± 1,2
	16,63	Acético	358,1 ± 1,3
	17,93	Fumárico	11,8 ± 0,2
	19,63	Propiônico	291,2 ± 8,8

Tabela 4 (continuação) - Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura das diferentes bactérias (B) e possível identificação por comparação com o tempo de retenção (TR) em relação aos padrões. Concentração média ± desvio padrão (n = 2).

Amostras (bactérias isoladas)	TR (min)	Possível ácido	Concentração (mg L^{-1})
B10	7,45	Oxálico	11,1 ± 0,3
	8,53	Cítrico	185,5 ± 6,2
	9,67	Glucônico	4236,7 ± 40,5
	10,48	Málico	182,5 ± 12,9
	16,63	Acético	408,4 ± 6,0
	17,92	Fumárico	20,7 ± 0,1
	19,62	Propiônico	267,1 ± 17,7
B12	8,67	Cítrico	53,8 ± 13,7
	9,83	Glucônico	1012,4 ± 20,0
	10,65	Málico	159,1 ± 8,0
	18,2	Fumárico	4,0 ± 0,1
	19,63	Propiônico	410,5 ± 1,4
B13	8,68	Cítrico	176,0 ± 9,5
	9,85	Glucônico	3972,5 ± 8,4
	10,65	Málico	352,3 ± 3,6
	16,65	Acético	418,2 ± 12,2
	18,15	Fumárico	8,5 ± 0,1
	19,63	Propiônico	277,0 ± 1,9

Tabela 5 - Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura nas diferentes combinações de bactérias (B) e possível identificação por comparação com o tempo de retenção (TR) em relação aos padrões. Concentração média ± desvio padrão (n = 2).

Amostras (bactérias combinadas)	TR (min)	Possível ácido	Concentração (mg L^{-1})
B1+B3	8,68	Cítrico	227,0 ± 6,8
	9,85	Glucônico	2525,6 ± 34,6
	10,67	Málico	1549,6 ± 20,6
	16,65	Acético	346,3 ± 0,9
	18,22	Fumárico	9,3 ± 0,1
	19,63	Propiônico	166,4 ± 15,1
B1+B12	8,7	Cítrico	158,7 ± 11,9
	9,87	Glucônico	3692,2 ± 27,4
	16,65	Acético	394,7 ± 2,4
	19,63	Propiônico	425,5 ± 1,8
B2+B10	8,78	Cítrico	169,9 ± 12,4
	9,9	Glucônico	3822,3 ± 53,0
	10,65	Málico	178,6 ± 12,2
	16,68	Acético	418,1 ± 0,8
	18,53	Fumárico	20,4 ± 0,1
	19,63	Propiônico	332,2 ± 17,0
B2+B12	8,48	Cítrico	680,6 ± 10,0
	9,58	Glucônico	2747,9 ± 22,1
	10,38	Málico	3200,3 ± 35,6
	19,55	Propiônico	186,0 ± 1,5
B3+B6	8,72	Cítrico	194,3 ± 4,2
	9,85	Glucônico	3230,9 ± 1,3
	10,6	Málico	174,3 ± 4,8
	16,63	Acético	368,5 ± 0,3
	18,4	Fumárico	16,7 ± 0,1
	19,58	Propiônico	247,8 ± 17,2
B3+B10	8,42	Cítrico	211,0 ± 10,5
	9,5	Glucônico	3265,3 ± 15,4
	16,65	Acético	420,6 ± 6,4
	17,98	Fumárico	14,7 ± 0,5
	19,62	Propiônico	206,1 ± 11,7
B6+B7	8,78	Cítrico	192,5 ± 5,5
	9,9	Glucônico	3959,4 ± 24,6
	10,63	Málico	140,2 ± 6,6
	16,67	Acético	409,1 ± 2,1
	18,52	Fumárico	19,3 ± 0,2
	19,63	Propiônico	334,8 ± 15,0

Tabela 5 (continuação) - Principais picos detectados nas amostras de meio de cultura nas diferentes combinações de bactérias (B) e possível identificação por comparação com o tempo de retenção (TR) em relação aos padrões. Concentração média ± desvio padrão (n = 2).

Amostras (bactérias combinadas)	TR (min)	Possível ácido	Concentração (mg L^{-1})
B8+13	8,32	Cítrico	163,3 ± 8,0
	9,42	Glucônico	4582,2 ± 11,6
	10,2	Málico	317,4 ± 18,0
	16,57	Acético	370,7 ± 0,9
	17,83	Fumárico	7,2 ± 0,1
	19,53	Propiônico	276,6 ± 8,0
B13+10	8,32	Cítrico	181,6 ± 3,0
	9,43	Glucônico	4243,4 ± 8,2
	10,23	Málico	244,5 ± 3,1
	16,6	Acético	413,0 ± 0,6
	17,72	Fumárico	13,2 ± 0,1
	19,58	Propiônico	221,5 ± 6,1

Os pequenos desvios no tempo de retenção em relação aos padrões analisados em alguns cromatogramas era esperado uma vez que podem ser observadas pequenas variações no pH entre uma amostra e outra.

O ácido orgânico mais abundante nas amostras, e que estava presente em todas elas, foi o ácido glucônico, chegando a mais de 4000 mg L^{-1} em alguns casos. Outros ácidos, como o fumárico e o cítrico, foram detectados em concentrações muito menores. O primeiro esteve quase sempre presente numa faixa de 5 mg L^{-1} a 15 mg L^{-1}.

Comparando-se os cromatogramas, pode-se verificar que as amostras de bactérias isoladas, em sua maioria, apresentaram mais semelhanças do que diferenças em sua exsudação. O perfil das amostras B1 e B3 foram os que mais se diferenciaram, com elevada concentração de ácido málico não identificada nas demais. O ácido málico também foi encontrado em concentrações mais elevadas na combinação entre estas duas bactérias. A bactéria B12 foi a que menos exsudou ácidos orgânicos, o que também foi verificado nas combinações em que esta bactéria estava presente (B1 + B12 e B2 + B12).

Nas demais combinações, o perfil dos exsudados se aproximou das amostras de bactérias isoladas, tanto nos ácidos presentes quanto nas concentrações em que se encontravam, com algum aumento de concentração do ácido glucônico em alguns casos.

5. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada para analisar ácidos orgânicos no sistema RP-HPLC YoungLin Acme 9000 (Seul, Korea), com a coluna Rezex-ROA nas condições cromatográficas estabelecidas mostrou-se eficiente tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Portanto, foi possível identificar e quantificar ácidos orgânicos presentes em amostras de exsudados bacterianos, e infere-se que também possa ser utilizada na análise de exsudados de plantas com o mesmo propósito. O entendimento dos fundamentos que regulam a exsudação tanto de plantas quanto de microrganismos e sua composição é essencial para a agricultura baseada em processos biológicos, e a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é uma importante ferramenta para a busca desse objetivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, D. L., Velloso, A. C. X., Fixação de fósforo em solos do estado do Rio de Janeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 17(7): p. 1023-1029, 1982.

Amaral, A. S., Anghinoni, I., Deschamps, F. C., Resíduos de plantas de cobertura e mobilidade dos produtos da dissolução do calcário aplicado na superfície do solo. R. Bras. Ci. Solo, p. 115-123, 2004.

Assis, O. B. G., A asa da borboleta e a nanotecnologia: cor estrutural. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. 35, n. 2, São Paulo, 2013.

Azaizeh, H.A., Marschener, H., Römheld, V., Wittenmayer, L. Effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and other soil microorganisms on growth, mineral nutrient acquisition and root exudation of soil-grown maize plants. *Mycorrhiza*, 5:321-327, 1995.

Borges, E. M., Goraieb, K., Collins, C. H., O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. Química Nova, v. 35, n. 5, p. 993-1003, 2012.

Campos, L. J. M., Prates, H. T., Queiroz, C. G. S., Magalhães, J.V., Pitta, G. V. E., Schaffert, R. P., Alves, V. M. C., Tolerância ao alumínio e exsudação de ácidos orgânicos em ápices radiculares de milho. IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003.

Collins, C. H., Guimarães, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, p 179 – 243, 1988.

Grosso, C., Vinholes, J., Silva, L. R., Guedes, P. G., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Jäger, A. K., Andrade, P; B., Chemical composition and biological screening of *Capsella bursa-pastoris*. Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 635-644, 2011.

Jianbo, S., Zhang, F., Daru M., Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: development and assessment of chromatographic conditions. Pedosphere, v. 8, n. 2, p. 97-104, 1998.

Jianbo, S., Zhang, F.,Daru, M., Determination of organic acid in root exudates by high liquid performance chromatography: effects of interfering factors. Pedosphere, v. 9, n. 2, p. 97-104, 1999b.

Jones, D. L., Hodge, A., Kuzyakov, Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. New Phytologist, 163: p. 450-480, 2004.

Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J., The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays L.*). Journal of experimental Botany, 52: p. 1339-1352, 2001.

Kochian, L. V. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46(1): p. 237-260, 1995.

Kuzyakov, Y., Xu, X., Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. New Phytologist, 198, p. 656-669, 2013.

Lima, L. L. A., Schuler, A., Guerra, N. B., Otimização e validação de método para determinação de ácidos orgânicos em vinhos por cromatografia líquida de alta eficiência. Química Nova, v. 33, n. 5, p. 1186-1189, 2010.

Marschener, H., Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. Field Crops Research, 56: p. 203-207, 1998.

Muñoz-Robredo, P., Robledo, P., Manríquez, D., Molina, R., Defilippi, B. G., Characterization of sugars and organic acids in commercial varieties of table grapes. Chilean Journal of Agricultural Research, p. 452-458, 2011.

Nardi, S., Concheri, G., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., Soil organic matter mobilization by root exudates. Chemosphere, 41: p. 653–658, 2000.

Olivares, F. L., Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, p. 33-34, 2009.

Scholz, M. B. S., Kitzberger, C. S. G., Durand, N., Charmetant, P., Leroy, T., Ácidos orgânicos e açúcares em acessos da coleção de café da Etiópia do IAPAR e cultivares de café arábica, IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Curitiba, 2015.

Silva, E. R., *Exsudação radicular e sua utilização por rizobactérias*. Tese (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Campinas, Instituto Agronômico, 2011.

Silva, F. A. M., Nogueira, F. D., Guimarães, P. T. G., Godinho, A., Malta, M. R., Determinação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular na rizosfera de cafeeiro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ciências Agrotécnicas, Lavras, Edição Especial, p. 1391-1395, 2002.

Silva, F. A. M., Nogueira, F. D., Ribeiro, L. L., Godinho, A., Guimarães, P. T. G., Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. Planta Daninha, Viçosa, v. 19, n. 2, p. 193-196, 2001.

Taylor, G.J., The physiology of aluminum phytotoxicity. Metals ions in biological systems. New York: Marcel Dekker, p. 123-163, 1988.

Yang, C.C., Crowley, D. E., Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol.,* 66: 345-351, 2000.