UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZABELA CRISTINA DA SILVA CARNEIRO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM SISTEMA DE SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO

PALOTINA

2025

IZABELA CRISTINA DA SILVA CARNEIRO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM SISTEMA DE SOLUBILIZAÇÃO DE POTÁSSIO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, como parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.
Orientadora: Prof. Dra. Ivonete Rossi Bautitz.

PALOTINA

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ DEPARTAMENTO DE ENGENHARIAS E EXATAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - https://ufpr.br/

ATA DE REUNIÃO

Aos dois dias do mês de julho de dois mil e vinte e cinco, às quatorze horas, pelo link da Plataforma *Microsoft Teams* , Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Cromatográfica para Determinação de Ácidos Orgânicos em Sistema de Solubilização de Potássio" apresentado pela discente Izabela Cristina da Silva Carneiro, orientada pela Profa. Dra. Ivonete Rossi Bautitz, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, nota: 90 (noventa), Prof. Dr. Rodrigo Sequinel, nota: 90 (noventa), e Profa. Dra. Ivonete Rossi Bautitz, nota: 90 (noventa). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 90 (noventa). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento da orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.

Documento assinado eletronicamente por **IVONETE ROSSI BAUTITZ**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/07/2025, às 17:16, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO SEQUINEL**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/07/2025, às 20:21, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

Documento assinado eletronicamente por **ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO**, **PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em03/07/2025, às 10:17, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.

A autenticidade do documento pode ser conferida aqui informando o código verificador **7894817** e o código CRC **FFF2DB11**.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Universidade Federal do Paraná (UFPR), por ter me proporcionado a oportunidade de formação acadêmica em uma instituição pública e de qualidade. Foi neste espaço que construí conhecimentos, amizades e vivências que levarei por toda a vida.

À professora Ivonete, minha sincera gratidão por aceitar, de forma tão generosa e inesperada, ser minha orientadora, nesta etapa tão importante. Ao professor Rodrigo, meu muito obrigada pelos dois anos de aprendizado no laboratório. Aos técnicos do laboratório, deixo meu reconhecimento e agradecimento por todo o suporte técnico e pela disposição em ajudar sempre que precisei. Ao Labiogen, agradeço pelo fornecimento das amostras, fundamentais para a realização dos testes e validação do método desenvolvido.

À minha mãe Andreia Rodrigues, professora e grande inspiração, que sempre me ensinou sobre a importância dos estudos e me presenteou com amor, força e apoio incondicional durante toda a minha vida. Ao meu pai Jurandir Carneiro, que sempre foi meu ponto de paz, aquele que me acalma com suas piadas e me fortalece em meio às dificuldades. À minha irmã Isadora, que está sempre ao meu lado, nem que seja preparando uma sopa para quando eu chego tarde da faculdade, me fazendo sentir acolhida e amada e ao meu irmão Yuri André, que foi minha inspiração na escolha do curso.

À minha avó Ladir, que mesmo à distância nunca deixou de se fazer presente, com ligações carinhosas para saber se estou bem. E aos meus demais familiares Angela Rodrigues, Leandro Rodrigues, Matheus Rodrigues e Andressa Evillyn, que me acolhem, me amam e me fortalecem com sua presença e carinho.

Aos meus amigos da faculdade Gabriel Kegler, João Alencar, Letícia Hofstaetter e Caroline Rodrigues minha gratidão por cada momento compartilhado, tanto os de estresse quanto os de alegria, que tornaram essa jornada mais leve e significativa, criando laços que certamente ultrapassam as paredes da universidade.

Aos amigos que fazem parte da minha vida fora do meio acadêmico, meu sincero agradecimento por serem os coautores das pausas necessárias, das

conversas leves e dos momentos de descontração que me ajudaram a manter a sanidade e o equilíbrio durante todo esse percurso.

Por fim, minha gratidão a todos que, de alguma forma, tocaram minha vida durante essa jornada. A cada um que me ensinou, com seus gestos, palavras ou simples presença, sobre a beleza da diversidade humana e sobre a força que encontramos na conexão, na empatia e no apoio mútuo.

Muito obrigada!

RESUMO

A busca por práticas agrícolas sustentáveis, tem levado ao uso de microrganismos solubilizadores de potássio como alternativa ao fertilizante químico, diminuindo assim, a dependência de importação deste nutriente. Deste modo, desenvolveu-se e validou-se parcialmente uma metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando coluna C18, para a identificação e quantificação de ácidos orgânicos produzidos por bactérias solubilizadoras de potássio (BSK) em diferentes meios de cultivo. Para isso, foram avaliados os ácidos acético, butírico, cítrico, málico, lático e propiônico por CLAE, utilizando fase móvel aquosa acidificada (0,1% de ácido fosfórico) e fase orgânica metanol e etanol em diferentes proporções e diferentes comprimentos de onda. Para a validação do método foram avaliados os parâmetros de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Amostras provenientes de mini biorreatores de escala laboratorial com BSK foram utilizadas para aplicação do método proposto, incubadas sob três condições experimentais: suplementação com pó de rocha, silicato e sem suplementação, avaliadas nos dias 3, 9 e 20 de incubação. A condição cromatográfica fase aquosa acidificada:etanol (90:10), com detecção em 220 nm e fluxo de 1 mL/min foi a condição que proporcionou melhor separação dos analitos, maior definição dos picos cromatográficos e menor impacto ambiental. As curvas analíticas apresentaram excelente linearidade ($r^2 \geq 0,993$) para todos os ácidos avaliados. Os limites de detecção e quantificação foram calculados e os menores valores foram obtidos para o ácido lático com LD de 0,032 µg/mL e LQ de 0,096 µg/mL. O ácido cítrico apresentou as maiores concentrações, especialmente em meio suplementado com pó de rocha. Os outros ácidos avaliados apresentaram concentrações menores comparadas aos do ácido cítrico. Os resultados obtidos demonstraram a aplicabilidade da metodologia cromatográfica proposta para o monitoramento de ácidos orgânicos em sistemas de solubilização de potássio.

Palavras chaves: Linearidade. Validação. Bactérias solubilizadoras de potássio.

ABSTRACT

The search for sustainable agricultural practices has led to the use of potassium-solubilizing microorganisms (KSM) as an alternative to chemical fertilizers, thereby reducing the dependency on imported sources of this nutrient. In this context, a chromatographic analytical methodology was partially developed and validated using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a C18 column for the identification and quantification of organic acids produced by potassium-solubilizing bacteria (KSB) in different culture media. To achieve this, the following acids were analyzed: acetic, butyric, citric, malic, lactic, and propionic acids. HPLC analysis was performed using an aqueous mobile phase acidified with 0.1% phosphoric acid and an organic phase consisting of methanol and ethanol in different proportions, as well as varying detection wavelengths. For method validation, parameters such as linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were evaluated. Samples derived from laboratory-scale bioreactors containing KSB were used for the application of the proposed method. These were incubated under three experimental conditions: supplementation with rock powder, silicate, and without supplementation, and evaluated on days 3, 9, and 20 of incubation. The chromatographic condition consisting of an acidified aqueous phase:ethanol (90:10), with detection at 220 nm and a flow rate of 1 mL/min, provided the best analyte separation, improved chromatographic peak definition, and lower environmental impact. The analytical curves showed excellent linearity ($r^2 \geq 0.993$) for all evaluated acids. The lowest LOD and LOQ values were obtained for lactic acid, with an LOD of 0.032 µg/mL and an LOQ of 0.096 µg/mL. Citric acid showed the highest concentrations, especially in the medium supplemented with rock powder. The other acids were detected at lower concentrations compared to citric acid. The results demonstrated the applicability of the proposed chromatographic method for monitoring organic acids in potassium solubilization systems.

Keywords: Linearity. Validation. Potassium-solubilizing bacteria

Lista de Figuras

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DIRETA PROMOVIDA POR MICRORGANISMOS……..……...…16
FIGURA 2 - CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DE METANOL COMO FASE MÓVEL ORGÂNICA……..…25
FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DE ETANOL COMO FASE MÓVEL ORGÂNICA ……26
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS ÁCIDOS: CÍTRICO, LÁTICO, ACÉTICO, MÁLICO, BUTÍRICO E PROPIÔNICO…..27
FIGURA 5 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES
MEIOS……29
FIGURA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES
MEIOS……30
FIGURA 7 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES
MEIOS……31
FIGURA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES MEIOS……....32

Lista de tabelas

TABELA 1 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO RECOMENDADOS PELA ANVISA E INMETRO……..……...……..21

TABELA 2 - VALORES DE R² E EQUAÇÃO DA RETA, LD E LQ PARA OS ÁCIDOS CÍTRICO, LÁTICO, ACÉTICO, MÁLICO, BUTÍRICO E PROPIÔNICO……...……..…28

Lista de siglas

BSK - Bactéria Solubilizadora de Potássio

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EPS - Exopolissacarídeo

Labiogen - Laboratório de Bioquímica e Genética

MSK - Microrganismo Solubilizador de Potássio

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 12
1.1 OBJETIVOS..... 13
1.1.1 Objetivo geral..... 13
1.1.2 Objetivos específicos..... 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 14
2.1 A IMPORTÂNCIA DO POTÁSSIO E SUA SOLUBILIZAÇÃO POR MICROORGANISMOS..... 14
2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS PELOS MICRORGANISMOS..... 16
2.2.1 Bactérias solubilizadoras de potássio (BSK)..... 17
2.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)..... 17
2.3.1 Metodologias analíticas aplicadas à quantificação e identificação de ácidos orgânicos..... 19
2.3.2 Influência da fase móvel na CLAE..... 20
2.3.3 Validação de métodos análiticos..... 21
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 22
3.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS AVALIADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS..... 23
3.2 AMOSTRAS DE BIORREATORES EM ESCALA LABORATORIAL..... 24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 25
4.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS..... 25
4.2 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS..... 27
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE BIORREATORES..... 29
5 CONCLUSÃO..... 32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 34

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos e a necessidade de práticas agrícolas sustentáveis impulsionam a busca por alternativas ao uso excessivo de fertilizantes químicos, que acarretam impactos ambientais. Nesse contexto, a utilização de microrganismos solubilizadores de potássio (MSK) surge como uma abordagem promissora (MOHAMED *et al.*, 2016), uma vez que sua capacidade de secretar ácidos orgânicos contribui para a disponibilização do potássio imobilizado em minerais do solo.

O potássio possui um papel de grande importância no desenvolvimento das plantas (MARSCHNER, 2012), sobretudo, para a fotossíntese. Entretanto, sua baixa concentração na forma dissolvida no solo, torna necessário o uso de fertilizantes químicos. Infelizmente, o uso excessivo destes acarreta problemas ambientais, como a poluição de corpos d'água devido à percolação e lixiviação do potássio no solo (SAVCI, 2012).

Essa problemática impulsionou a busca por estratégias eficientes para a solubilização do potássio insolúvel presente nos solos (MOHAMED *et al.,* 2016). Uma dessas vias é a utilização de microrganismos para promover a solubilização do potássio. Os microrganismos solubilizadores de potássio desempenham um papel crucial na ciclagem desse nutriente no solo, ao secretar ácidos orgânicos. Esse processo induz uma redução do pH local, o que é fundamental para facilitar a dissolução e a liberação do potássio imobilizado na estrutura de minerais. Transformando-o em forma solúvel e prontamente absorvível pelas raízes, otimizando assim, a nutrição potássica das plantas (SHENG *et al*., 2005; ZARJANI *et al.*, 2013).

Para a quantificação e identificação dos ácidos orgânicos excretados por microrganismos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas que pode ser empregada. Este método baseia-se na introdução de uma pequena alíquota da amostra líquida em um fluxo contínuo de um líquido, a fase móvel, que permeia uma coluna preenchida com partículas de uma fase estacionária. A separação dos componentes da mistura ocorre devido às diferenças nos graus de retenção de cada analito na coluna (ALI, 2022).

Um fator crucial para garantir a qualidade e a precisão em análises por

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a seleção criteriosa da fase móvel. A literatura técnico-científica apresenta uma gama de solventes orgânicos frequentemente empregados para esse fim, como a acetonitrila, metanol e o etanol, uma vez que cada um desses solventes possui características distintas que conferem prós e contras específicos para determinadas aplicações (SNYDER *et al.,* 2010; ALI, 2022). A eficácia da CLAE está intrinsecamente ligada à seleção adequada da fase móvel, havendo a necessidade de avaliar solventes considerando não apenas a eficiência analítica, mas também os aspectos de segurança, toxicidade e impacto ambiental.

Deste modo, destaca-se a relevância de otimizar um método analítico robusto e ambientalmente adequado para a CLAE, que permita a análise precisa e exata dos ácidos orgânicos produzidos por MSK, contribuindo significativamente para o avanço da pesquisa em biotecnologia agrícola e o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis para a nutrição de plantas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi otimizar e validar parcialmente um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a quantificação de ácidos orgânicos, produzidos por bactérias solubilizadoras de potássio, em diferentes meios de cultivo.

1.1.2 Objetivos específicos

Desenvolver e otimizar as condições cromatográficas para a separação de seis ácidos orgânicos (Acético, Butírico, Cítrico,Málico, Lático e Propiônico) .

Avaliar a eficiência da separação cromatográfica comparando as fases orgânicas metanol e etanol.

Avaliar a linearidade do método cromatográfico proposto, com base nas curvas analíticas.

Calcular os limites de detecção e quantificação dos seis ácidos estudados.

Quantificar os ácidos orgânicos produzidos por culturas bacterianas em biorreatores, em diferentes tempos de incubação (3, 9 e 20 dias).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DO POTÁSSIO E SUA SOLUBILIZAÇÃO POR MICROORGANISMOS

O Brasil é o segundo maior consumidor de potássio, entretanto, é o principal importador, pois cerca de 96% dos fertilizantes potássicos consumidos pela agricultura, não são produzidos no país (Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2019). O país ocupa a 7ª posição de reservas potássicas, contudo, a 11ª colocação em termos de produção mundial (GOV, 2001). A expressiva dependência da importação de fertilizantes potássicos, além de aumentar os custos produtivos, expõe a agricultura nacional à volatilidade do mercado internacional, comprometendo, consequentemente, a competitividade do agronegócio brasileiro nos âmbitos interno e externo (ALVES, 2021). Esse cenário, por sua vez, induz a busca por alternativas que viabilizem o aumento da produção de potássio no território nacional.

Em 1842, Justus Von Liebig (1803-1873) publicou a obra *A Química e sua Aplicação na Agricultura e Fisiologia*, na qual estabeleceu as bases da teoria da nutrição mineral das plantas. Segundo o autor, os vegetais absorvem do solo apenas os elementos essenciais ao seu metabolismo, sendo necessária a reposição contínua desses nutrientes para assegurar a manutenção da produtividade. Dentre os elementos destacados, o potássio foi identificado como um nutriente essencial, desempenhando papel fundamental nos processos fisiológicos das plantas (LIEBIG, 1842; GORBAN *et al*., 2011).

O potássio é o sétimo elemento mais comum na crosta terrestre, encontrado em rochas, solos, oceanos e lagos (CETESB, 2025). Classificado como um macronutriente essencial (LIEBIG, 1842) o potássio é absorvido pelas plantas e translocado como cátion (K+) (MARSCHNER, 2012). Este elemento, não possui função estrutural para as plantas e nem participa da composição, entretanto, ele é caracterizado pela sua alta mobilidade nas plantas, e desempenha funções importantes em diversos processos do crescimento, como controle de atividade enzimática em vários processos fisiológicos e

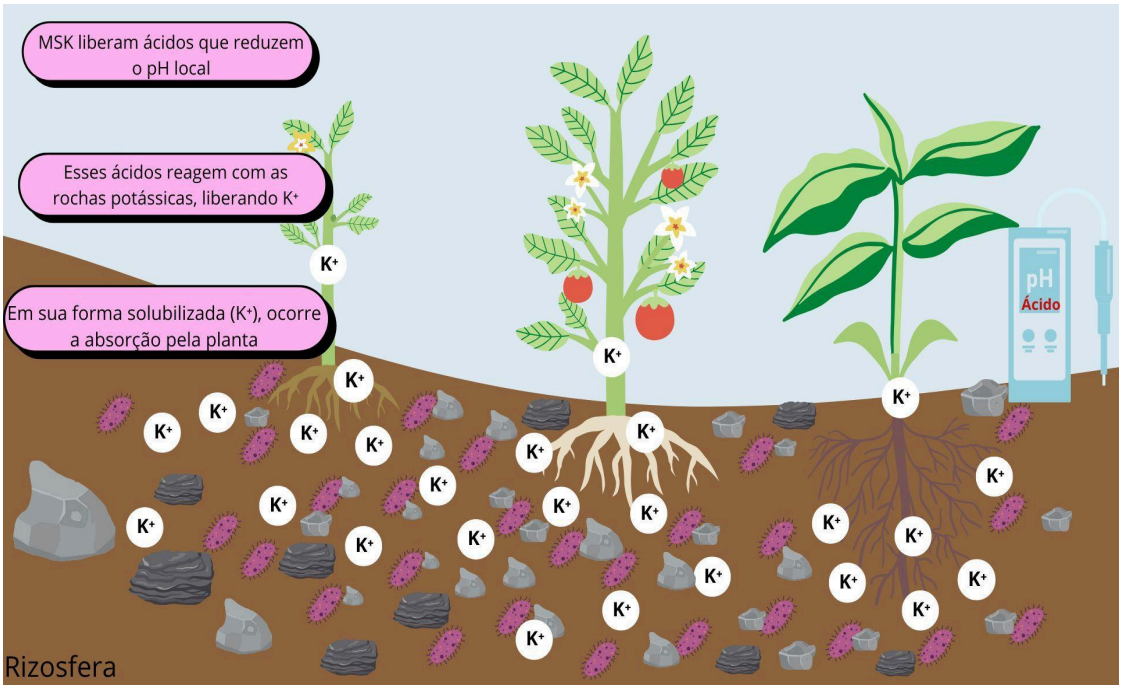
metabólicos da planta, incluindo fotossíntese (WANG *et al.,* 2012).

Um fator relevante a ser considerado é a forma como o potássio se encontra no solo, a qual apresenta variações quanto à sua disponibilidade para as plantas (PIZOL, 2022). Segundo Zörb *et al.* (2014), o potássio pode ser classificado em quatro grupos: potássio solúvel em água, potássio trocável, potássio não trocável e potássio estrutural. Este último corresponde ao potássio incorporado às estruturas cristalinas de minerais, como feldspatos e micas, sendo considerado uma forma de lenta disponibilidade ou, em alguns casos, indisponível para as plantas, contribuindo, portanto, para o suprimento de potássio no solo a longo prazo.

Diante da dificuldade de disponibilização do potássio na forma absorvível pelas plantas, o íon potássio (K^+) (MARSCHNER, 2012), a utilização de microrganismos solubilizadores de potássio surge como uma estratégia prática e promissora para aumentar a disponibilidade desse nutriente no solo e, consequentemente, melhorar a produtividade das lavouras. Diversos pesquisadores identificaram essa técnica como uma alternativa eficaz na recuperação da fertilidade de solos agrícolas degradados (RAJAWAT *et al.,* 2012; SHARMA *et al*., 2013; MEENA *et al*., 2015; SATTAR *et al*., 2019).

Por meio da solubilização direta (DOURADO, 2018), os microrganismos liberam ácidos orgânicos, como oxálico, tartárico e cítrico (RAJAWAT *et al.*, 2012), que promovem a acidificação do meio, reduzindo o pH local e, consequentemente, favorecendo a dissolução de minerais potássicos. A quebra das ligações entre o potássio e a matriz mineral libera o íon potássio (K^+) na solução do solo. Esse processo de acidificação possibilita a liberação do potássio presente nos minerais, tornando-o disponível para absorção pelas plantas (FIGURA 1) (BASAK *et al.*, 2016).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO DIRETA PROMOVIDA POR MICRORGANISMOS.



Adaptado de: Satya *et al.*, 2025.

2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS PELOS MICRORGANISMOS

Os ácidos mais comuns com os quais convivemos são orgânicos, ou seja, aqueles que contêm átomos de carbono. Dentre estes, o maior grupo é o dos ácidos carboxílicos, caracterizados pela presença do grupo funcional carboxila (–COOH) (SNYDER, 1995). Os microrganismos solubilizadores de potássio (MSK), podendo ser bactérias ou fungos (SATTAR *et al*., 2019), atuam principalmente pela produção destes ácidos orgânicos do grupo carboxílico, como oxálico, cítrico e málico, os quais promovem a acidificação do meio e facilitam a liberação do potássio presente em minerais insolúveis (MEENA *et al*., 2015; RAJAWAT *et al*., 2012; BASAK *et al*., 2016), promovendo assim o desenvolvimento das plantas. Esses ácidos, por serem voláteis, causam a diminuição local do pH no meio, o que induz a liberação do íon potássio. Além disso, esses compostos podem formar quelatos a partir de seus grupos hidroxila e carboxila com metais ligados à constituição química das rochas, favorecendo a solubilização e a disponibilidade do potássio (BAHADUR *et al.,* 2014; SATTAR *et al.,* 2019).

2.2.1 Bactérias solubilizadoras de potássio (BSK)

Uma ampla gama de bactérias, nomeadamente *Pseudomonas, Burkholderia, Acidothiobacillus ferrooxidans, Bacillus mucilaginosus, Bacillus edaphicus, B. circulans*, B. *velenzensis e Paenibacillus sp,* foram reportadas pela literatura por liberar potássio na forma acessível (K+), de minerais portadores de potássio nos solos onde as plantas poderão utilizá-lo (WANG *et al*., 2024; LIAN *et al*., 2002; LI *et al.*,2006; LIU *et al*., 2012; SHENG *et al*., 2005). Wang et al. (2024) conduziram um estudo no qual isolaram com êxito a cepa bacteriana *Bacillus velezensis*, que apresentou elevada capacidade de solubilização de potássio. A atuação dessa bactéria resultou no aumento da produção de ácidos orgânicos, favorecendo a liberação de nutrientes do substrato e, consequentemente, promovendo o desenvolvimento da cultura de alfafa.

As bactérias solubilizadoras de potássio (BSK) secretam exopolissacarídeos (EPS), compostos poliméricos extracelulares que desempenham um papel fundamental na adesão desses microrganismos às superfícies de minerais (VANDEVIVERE *et al*., 1992). A formação de biofilmes por meio do EPS não apenas permite a fixação das bactérias às rochas, mas também cria um microambiente favorável à produção de ácidos orgânicos, que promovem a acidificação local e a subsequente liberação de potássio. Estudos demonstram que essas bactérias atuam de forma mais eficiente em ambientes levemente ácidos, com pH variando entre 4,0 e 6,5, faixa que favorece tanto a produção de ácidos quanto a solubilização dos minerais (LIAN *et al*., 2008; UROZ *et al*., 2009).

2.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica amplamente utilizada para a quantificação e identificação de ácidos orgânicos produzidos em diferentes meios (WU et al., 2018; WANG et al., 2007). Sua popularidade se deve à alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, o que permite a análise eficiente de diversas classes de amostras. Além disso, a CLAE é versátil, possibilitando a análise

tanto de compostos orgânicos quanto inorgânicos, tornando-a ideal para uma ampla gama de aplicações analíticas (SKOOG *et al*., 2014).

Na cromatografia, a solução contendo as moléculas a serem separadas é misturada a um solvente denominado eluente ou fase móvel líquida, e aplicada sobre uma fase estacionária ou fixa, imiscível com a fase móvel. Frequentemente a fase estacionária é acomodada dentro de uma coluna (KILIKIAN, 2020). Para uma corrida adequada é preciso ser levado em consideração a polaridade do soluto. Solutos apolares ou de polaridade intermediária podem ser retidos por fases estacionárias apolares e eluídos por combinações de solventes de maior ou menor polaridade (SKOOG *et al.*, 2014).

O pH da solução desempenha um papel crucial e deve ser cuidadosamente considerado antes de iniciar a quantificação cromatográfica. À medida que o pH da solução é reduzido no caso de ácidos, a fração de moléculas na forma não ionizada aumenta, enquanto a quantidade de moléculas ionizadas diminui. Essa mudança reduz a polaridade geral do ácido, o que resulta em tempos de retenção mais longos durante a análise cromatográfica (DOLAN, 2017).

Além do pH da solução, o valor de pKa dos ácidos orgânicos influência diretamente sua forma química no meio, impactando a interação com a fase estacionária da coluna C18. Elas são compostas por cadeias apolares ligadas à sílica, sendo mais seletivas para compostos em sua forma não ionizada, os quais possuem maior afinidade com a fase estacionária e, consequentemente, apresentam maiores tempos de retenção. Quando o pH da fase móvel se distancia do pKa da substância analisada, há predominância da forma ionizada, que é mais polar e tem menor interação com a fase apolar da coluna, resultando em eluição mais rápida ((SNYDER *et al.,* 2010). Assim, o ajuste do pH da fase móvel em torno do pKa dos analitos é fundamental para otimizar a resolução e a seletividade na separação cromatográfica.

Outro aspecto relevante na CLAE é a escolha do comprimento de onda para a detecção dos analitos. Os detectores baseados em luz ultravioleta e visível (UV/Vis) estão entre os mais utilizados devido à sua elevada sensibilidade e aplicabilidade em ampla gama de compostos (PRADO *et al.*, 2004; RAMOS, 2014). Esses detectores operam com base na medição da absorbância da radiação eletromagnética pelos analitos presentes na amostra, de acordo com a lei de Beer-Lambert, a qual estabelece que a absorbância é proporcional à concentração da espécie absorvente,

ao caminho óptico da célula e ao coeficiente de absorção molar (SKOOG *et al.,* 2014). Essa técnica possibilita quantificações precisas e reprodutíveis, sendo amplamente empregada em análises químicas e bioquímicas (RAJPUT *et al.,* 2022).

2.3.1 Metodologias analíticas aplicadas à quantificação e identificação de ácidos orgânicos.

A literatura científica apresenta uma variedade de metodologias analíticas aplicadas à quantificação e identificação de ácidos orgânicos (BOECHAT, 2015; WU *et al*., 2018; WANG *et al*., 2007). BOECHAT (2015), analisou ácidos orgânicos em amostras de interesse agronômico e ambiental, onde foi possível detectar os ácidos acético, oxálico, cítrico, glicólico, málico, succínico, fumárico e propiônico nas faixas de concentração entre 5 e 6000 mg L^{-1}.

Em matrizes ambientais ou industriais, como a vinhaça, a cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (MS) também tem sido eficaz para análise de ácidos orgânicos como o cítrico e o succínico, conforme demonstrado por Oliveira (2022). Já para compostos voláteis, a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS) é uma alternativa adequada, como evidenciado por Franco (2020), que validou a técnica para detecção de ácidos haloacéticos em amostras ambientais. Essas diferentes abordagens evidenciam a diversidade de ferramentas disponíveis para análise de ácidos orgânicos, cuja escolha depende das características da matriz e do composto de interesse.

Outro estudo conduzido por CERQUEIRA *et al.* (2011), foi desenvolvido e validado um método utilizando CLAE, para a determinação dos ácidos orgânicos voláteis (AOVs), acético, propiônico e butírico, em efluentes de reatores anaeróbios. Nesse trabalho utilizou-se o detector UV-Vis, operando em 220 nm, por se tratar de uma tecnologia mais acessível, quando comparada a sistemas mais complexos, como espectrometria de massas. O método apresentou excelente desempenho analítico, com linearidade na faixa estudada, indicada pelo valor do coeficiente de correlação para todos os ácidos analisados.

2.3.2 Influência da fase móvel na CLAE

Entre os solventes orgânicos utilizados em cromatografia líquida, destacam-se o etanol (C_2H_5OH) e o metanol (CH_3OH). Ambos pertencem à mesma classe química, mas apresentam diferenças significativas que impactam sua escolha como fase móvel em análises cromatográficas ou como solvente de extração. Em termos econômicos, tanto o etanol quanto o metanol apresentam custos inferiores à acetonitrila, sendo até quatro vezes mais baratos (BICKLER, 1999). No entanto, o etanol é ligeiramente mais caro que o metanol, o que pode ser um fator limitante em aplicações de grande escala. Apesar disso, o custo-benefício do etanol é frequentemente superior quando se considera aspectos de segurança e sustentabilidade.

Do ponto de vista toxicológico, o contraste entre os dois é marcante. O metanol é altamente tóxico, sendo rapidamente absorvido por inalação, ingestão ou contato dérmico. Sua metabolização no organismo leva à formação de formaldeído e ácido fórmico, compostos responsáveis por efeitos adversos severos, como cegueira e até a morte (COSTA, 2012). Por esse motivo, o metanol exige procedimentos rígidos de manuseio e descarte.

O etanol, embora também inflamável e irritante em altas concentrações, é considerado atóxico, é viável economicamente, sustentável (LONGO, I. *et al*., 2020), e rapidamente metabolizado pelo organismo em acetaldeído e ácido acético, compostos de menor risco (COSTA, 2012). Além disso, por ser biodegradável é produzido a partir de fontes renováveis como cana-de-açúcar e milho, o etanol é considerado um solvente verde, com menor impacto ambiental.

Deste modo, embora o metanol, segundo a Agência Nacional do Petróleo (2021), tenha custo ligeiramente inferior, comparado ao etanol, o álcool de de dois carbonos se destaca por sua menor toxicidade, maior segurança no manuseio, origem renovável e menor impacto ambiental. Essas características fazem do etanol uma opção preferencial em laboratórios que buscam alinhar eficiência analítica com práticas sustentáveis e seguras.

2.3.3 Validação de métodos análiticos

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), exigem a validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica de um novo método. É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI *et al*., 2004).

TABELA 1 - PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO RECOMENDADOS PELA ANVISA E INMETRO.

ANVISA	INMETRO
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade
Intervalos da curva de calibração	Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
Linearidade	Linearidade
Curva de Calibração	-
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
-	Sensibilidade (inclinação da curva)
Exatidão	Exatidão e tendência (bias)
Precisão	Precisão
Robustez	Robustez
-	Incerteza de medição

Fonte: RIBANI et al., 2004.

De acordo com a seção II no art. 23 da Lei nº 9.782/1999, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), indica que a linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Na mesma seção no art. 27 determina quais avaliações são necessárias para comprovar a linearidade do método:

I.- representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;

II.- gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;

III.- equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;

IV.- avaliação da associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2);

V.- avaliação da significância do coeficiente angular.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2020). Para isto, se faz a análise do limite de detecção (LD), que é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005). Para a obtenção do limite de detecção (LD), é utilizado o valor de *s*, que representa a estimativa do desvio padrão da resposta analítica. Esse valor pode ser determinado de diferentes formas: a partir do desvio padrão do branco, do erro padrão da equação de regressão ou ainda do coeficiente linear da equação. Em seguida, esse valor é relacionado à inclinação da curva analítica, representada por *b*, “slope” ou coeficiente angular da reta de calibração. Assim, o LD pode ser calculado pela razão entre *s* e *b*, multiplicada por um fator de 3,3, conforme estabelecido pelas diretrizes da ANVISA e do INMETRO (RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação (LQ), corresponde à menor quantidade do analito na amostra pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005). De modo semelhante ao limite de detecção, o LQ é calculado seguindo as mesmas diretrizes onde a razão de *s* e *b* é multiplicada por um fator de 10, esse fator foi estabelecido pela IUPAC como valor padrão para calcular o LQ.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste estudo foram feitos no Laboratório de Análise Instrumental e Controle de Qualidade, com amostras fornecidas pelo Labiogen (Laboratório de Bioquímica e Genética), ambos pertencentes à Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. As amostras utilizadas também foram aplicadas no

Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Caracterização Bioquímica e Molecular de Isolados com Potencial de Solubilização de Potássio" (Alencar, 2025), o que reforça a integração entre as análises bioquímicas, moleculares e cromatográficas dos isolados estudados.

3.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS AVALIADAS NA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

A fase móvel foi inicialmente preparada pela adição de 1 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) a um volume de água ultrapura suficiente para completar 1L da solução. Em seguida, essa fase aquosa foi submetida à filtração e à desgaseificação em banho de ultrassom por 45 minutos. Foram avaliados os solventes orgânicos etanol e metanol em diferentes proporções e em diferentes comprimentos de onda utilizados para detecção na faixa do ultravioleta (UV) em diferentes proporções entre o solvente orgânico (metanol e etanol) e a fase aquosa: 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90. Além disso, foram avaliadas faixas de comprimento de onda de 203, 210, 220 e 230 nm para a detecção dos analitos.

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da marca Thermo Scientific UltiMate 3000, detecção UV-DAD (Diode Array Detector), coluna C18 (250x4,6mm) em um sistema isocrático com fluxo de 1,0 mL min^{-1}, com tempo total de corrida de 25 minutos.

As soluções estoque individuais dos ácidos orgânicos acético, butírico, cítrico, málico, lático e propiônico foram preparadas na concentração de 1000 mg L^{-1}. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando as soluções estoque dos ácidos, previamente filtradas por membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm (Millipore®, SP, Brasil).

Após o preparo dos padrões, os ácidos foram diluídos para preparação da curva analítica, nas respectivas concentrações: 0,05; 0,2; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,0 µg mL^{-1}. As curvas analíticas foram construídas, relacionando-se os valores da concentração em µg mL^{-1} no eixo das abscissas, com os valores das áreas obtidas, no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da verificação da proporcionalidade entre a concentração e a resposta a partir do cálculo do coeficiente linear (b), do coeficiente angular (a) e do coeficiente de correlação (r),

onde o r² mínimo aceitável foi de 0,99. Foram calculados os limites de detecção (LD) por meio da razão entre o desvio padrão da resposta analítica (s) e a inclinação da curva analítica (b), multiplicada por um fator de 3,3. Já o limite de quantificação (LQ) segue o mesmo princípio, utilizando um fator multiplicativo de 10, conforme estabelecido pelas diretrizes da IUPAC, ICH e INMETRO (Equações 1 e 2) (RIBANI et al., 2004).

$$LD = \frac{3{,}3 \times s}{b} \qquad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{b} \qquad \text{Equação 2}$$

3.2 AMOSTRAS DE BIORREATORES EM ESCALA LABORATORIAL

As amostras fornecidas pelo Labiogen foram produzidas em mini - biorreatores utilizando as bactérias solubilizadoras de potássio *Bacillus velezenzis*, estas foram cultivadas em meio Aleksandrov. As culturas foram divididas em três grupos experimentais: um grupo suplementado com pó de rocha, outro com silicato, e um terceiro sem qualquer tipo de suplementação (controle). A quantificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras foi realizada após diferentes períodos de incubação: 3, 9 e 20 dias, cada tempo de incubação e condição de suplementação, as análises foram realizadas em duplicata.

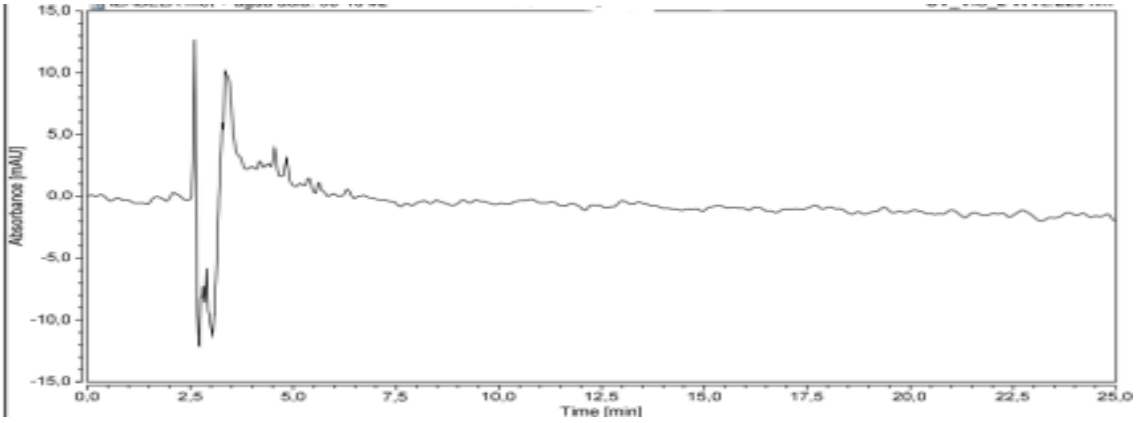
Antes da análise cromatográfica, as amostras congeladas foram descongeladas e centrifugadas. Em seguida, o pH inicial de 7 foi ajustado para um intervalo entre 2 e 3 utilizando uma solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) na proporção de 1:1. Após o ajuste do pH, as amostras foram filtradas utilizando uma membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm (Millipore®, SP, Brasil). Finalmente, as amostras preparadas foram transferidas para *vials* de 2 mL e submetidas à análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

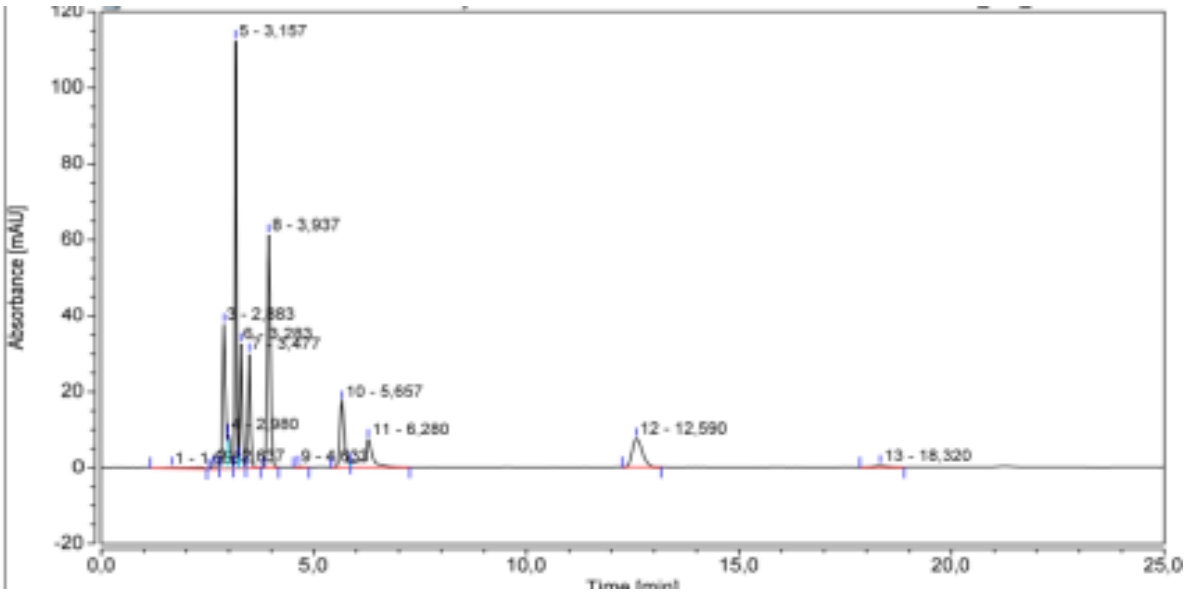
O desenvolvimento do método analítico para a determinação de ácidos orgânicos voláteis teve início com a definição do solvente orgânico a ser utilizado. Após testadas as proporções entre os solventes orgânicos (metanol e etanol) e a fase aquosa 90:10, 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90 com comprimentos de onda 203, 210, 220 e 230, verificou-se que o etanol proporcionou melhor desempenho cromatográfico. Esse fato ficou evidenciado por picos definidos e separados com a utilização da proporção de 90% de fase aquosa e 10% de etanol, no campo de varredura espectral do ultravioleta, com comprimento de onda fixado em 220 nm. Essa diferença pode ser visualizada na comparação entre as Figuras 2 e 3.

FIGURA 2 - CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DE METANOL COMO FASE MÓVEL ORGÂNICA



Condições cromatográficas: fase móvel composta por água acidificada com 0,1% ácido fosfórico:metanol (90:10), detecção em comprimento de onda 220 nm, vazão de 1 mL min^{-1}.

FIGURA 3 - CROMATOGRAMA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS OBTIDOS COM A UTILIZAÇÃO DE ETANOL COMO FASE MÓVEL ORGÂNICA



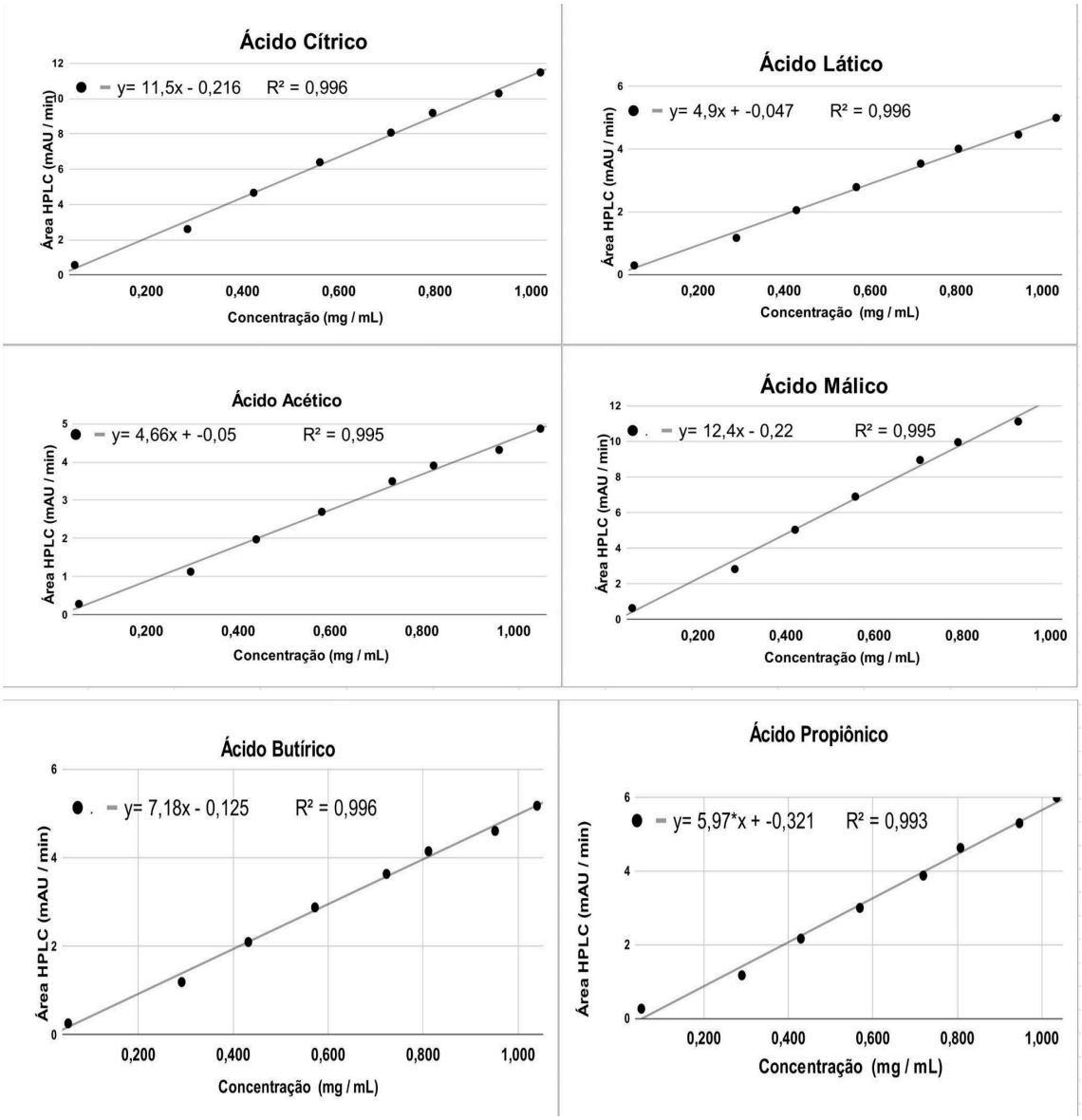
Condições cromatográficas: fase móvel composta por água acidificada com 0,1% ácido fosfórico:etanol (90:10), detecção em comprimento de onda 220 nm, vazão de 1 mL min^{-1}.

A análise cromatográfica dos ácidos orgânicos com fase móvel composta por metanol, nos comprimentos de ondas analisados (203, 210, 220 e 230 nm), não apresentaram picos definidos ou com boa separação comprometendo a obtenção de dados confiáveis. Em contrapartida, a utilização de etanol, permitiu a identificação dos seguintes ácidos orgânicos e seus respectivos tempos de retenção: acético (3,4 min), butírico (12,5 min), cítrico (3,1 min), málico (3,9 min), lático (3,2 min) e propiônico (5,6 min). Além da melhoria no desempenho analítico, o etanol apresenta-se como uma alternativa mais sustentável, sendo considerado um solvente verde. Sua menor toxicidade em comparação ao metanol reduz os riscos à saúde de quem irá manuseá-lo e minimiza os impactos ambientais, estando alinhado às diretrizes da química verde e às exigências de segurança em laboratórios analíticos

4.2 VALIDAÇÃO PARCIAL DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.

Após a definição do solvente adequado, calculou-se as diluições da solução estoque a fim de construir curvas analíticas para a avaliação da linearidade de cada ácido orgânico, conforme apresentado na Figura 4.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS ÁCIDOS: CÍTRICO, LÁTICO, ACÉTICO, MÁLICO, BUTÍRICO E PROPIÔNICO.



FONTE: A autora, 2025.

As concentrações escolhidas abrangeram uma faixa representativa das quantidades esperadas nas amostras reais, garantindo a aplicabilidade prática do método. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos para todos os ácidos orgânicos foram superiores a 0,993, indicando uma excelente correlação entre a concentração e a resposta do detector. Segundo Ribani et al. (2004), valores de r^2 acima de 0,99 são considerados indicativos de linearidade adequada em métodos analíticos. A análise dos resíduos das regressões lineares demonstrou distribuição aleatória, reforçando a adequação do modelo linear aos dados experimentais. Esses resultados confirmam que o método desenvolvido é confiável e adequado para a quantificação dos ácidos avaliados em diferentes condições experimentais (Tabela 2).

TABELA 2 - VALORES DE R^2 E EQUAÇÃO DA RETA, LD E LQ PARA OS ÁCIDOS CÍTRICO, LÁTICO, ACÉTICO, MÁLICO, BUTÍRICO E PROPIÔNICO.

Compostos	r^2	Equação da reta	LD (µg/mL)	LQ(µg/mL)
Ácido cítrico	0,996	y= 11,5x - 0,216	0,062	0,188
Ácido Lático	0,996	y= 4,9x - 0,047	0,032	0,096
Ácido acético	0,995	y= 4,6x - 0,050	0,035	0,108
Ácido málico	0,995	y= 12,6x - 0,220	0,057	0,175
Ácido butírico	0,996	y= 7,1x - 0,125	0,058	0,176
Ácido Propiônico	0,993	y= 5,9x - 0,321	0,180	0,544

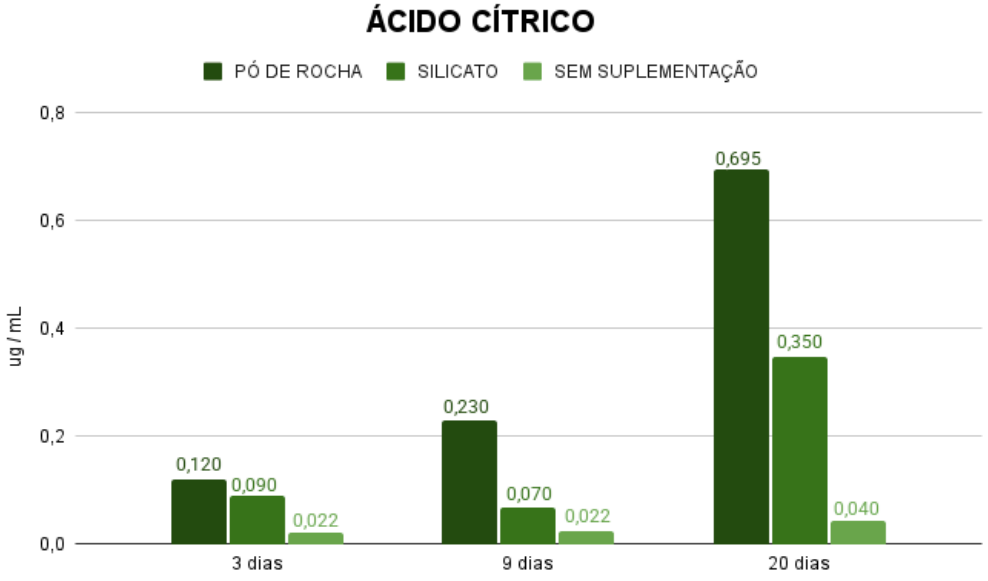
FONTE: A autora, 2025

Os menores valores obtidos foram do ácido lático com LD de 0,032 µg/mL e LQ de 0,096 µg/mL. Esses valores baixos indicam que o método desenvolvido permite a detecção e quantificação de concentrações reduzidas do analito, isso é fundamental em análises em que os compostos estão presentes em baixas concentrações, como no monitoramento de processos biotecnológicos, estudos ambientais ou análises de resíduos.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE BIORREATORES

Foram realizadas as quantificações dos ácidos orgânicos produzidos após 3, 9 e 20 dias de incubação em diferentes meios contendo cepas bacterianas de *Bacillus velezensis.* A produção de ácido cítrico em meio suplementado com pó de rocha já era esperada, conforme indicado pelo estudo conduzido por MEENA *et al.* (2014) que também utilizou bactérias do gênero Bacillus. Esse composto apresentou concentrações acima do limite de detecção em todos os três meios analisados, com valores superiores a 0,062 µg/mL. Em relação ao limite de quantificação (0,188 µg/mL), esse valor foi superado apenas no nono dia de cultivo, quando a concentração atingiu 0,230 µg/mL, indicando produção quantificável nesse ponto do experimento. Da mesma forma, em meio suplementado com silicato, os limites de detecção foram alcançados logo no terceiro dia (0,090 µg/mL), em contrapartida, os limites de quantificação apenas no vigésimo dia onde obteve concentração de 0,350 µg/mL (FIGURA 5). A quantificação da maior concentração de ácido cítrico foi obtida no vigésimo dia, no meio suplementado com pó de rocha, a qual alcançou 0,695 µg/mL.

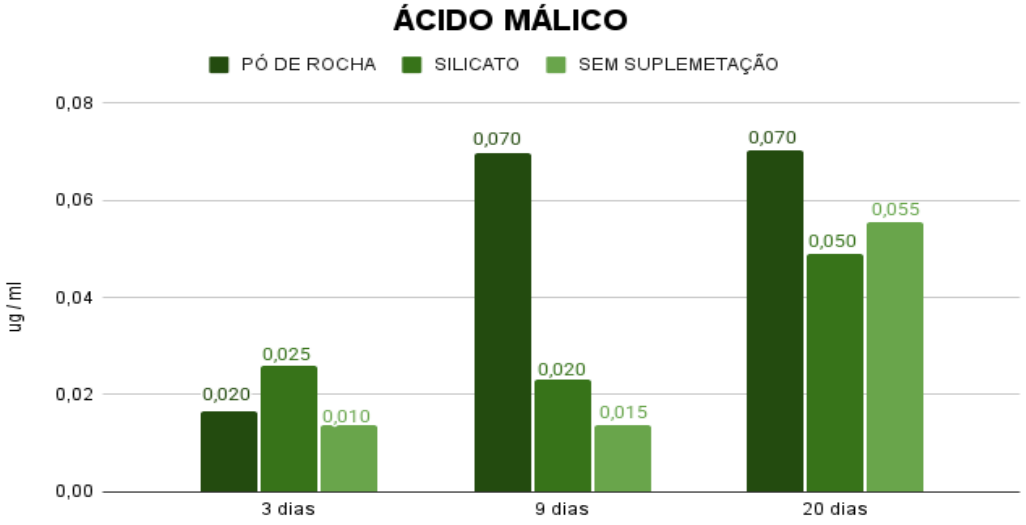
FIGURA 5 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES MEIOS.



FONTE: A autora, 2025.

O ácido málico apresentou concentrações detectáveis apenas no meio suplementado com pó de rocha, a partir do nono dia de incubação, quando atingiu valor superior a 0,057 µg/mL, ultrapassando o limite de detecção do método analítico proposto. No entanto, esse valor (0,070 µg/mL) ainda se manteve abaixo do limite de quantificação (0,175 µg/mL), impossibilitando sua quantificação de forma precisa. A baixa produção de ácido málico nesse contexto já era esperada, uma vez que Meena *et al*. (2016) também detectaram esse composto em meios cultivados com cepas bacterianas solubilizadoras de potássio. Esse resultado sugere uma possível associação entre a atividade microbiana e a liberação de ácidos orgânicos durante o processo de solubilização de nutrientes, especialmente em meios contendo minerais de origem silicatada. Nos demais tratamentos, meio suplementado com silicato e meio sem suplementação, as concentrações de ácido málico não ultrapassaram o limite de detecção, indicando que, nessas condições, a produção foi abaixo da sensibilidade do método utilizado (FIGURA 6).

FIGURA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO MÁLICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES MEIOS.

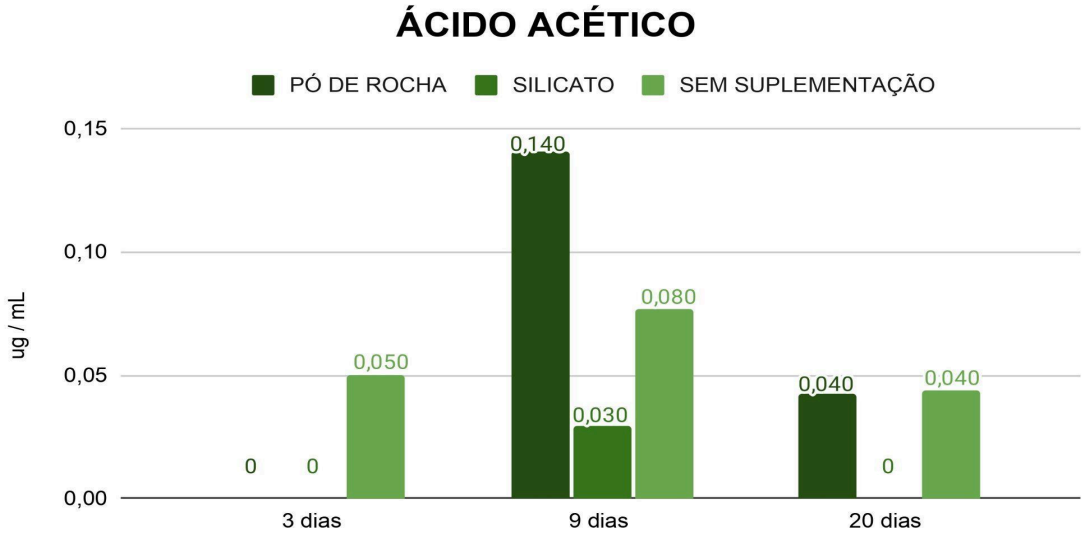


FONTE: A autora, 2025.

O ácido acético, proveniente de amostras de biorreatores em seu nono dia de cultivo, em meio suplementado com pó de rocha, obteve a maior concentração (0,140 µg/mL), superando assim, o limite de quantificação (0,108 µg/mL), entretanto, no vigésimo dia essa produção diminuiu para 0,040 µg/mL. Em meio sem suplementação desde o terceiro dia foram obtidas concentrações acima do limite de detecção (0,035 µg/mL). De acordo com Rodriguez *et al.*

(1999), as bactérias solubilizadoras direcionam sua atividade metabólica principalmente na produção de ácidos tricarboxílicos onde o ácido acético não se adequa. Neste contexto, o ácido acético, por possuir apenas um grupo carboxila e menor capacidade de complexação de íons, não é produzido em quantidades significativas. No meio suplementado com silicato, nenhuma das amostras apresentou concentrações detectáveis de ácido acético (FIGURA 7).

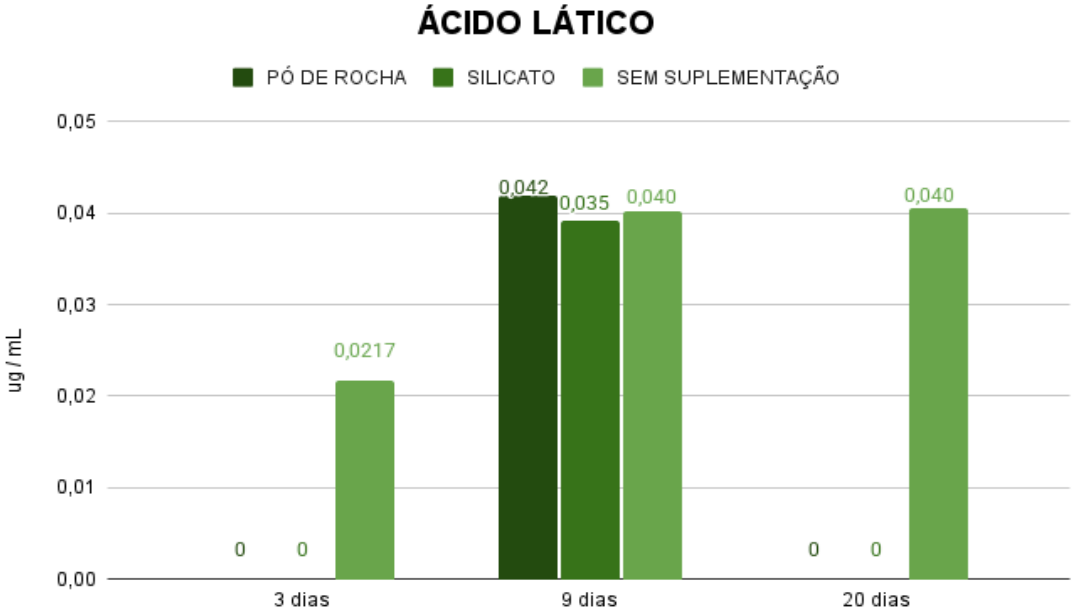
FIGURA 7 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES MEIOS.



FONTE: A autora, 2025.

Quando analisadas as concentrações de ácido lático observou-se que no terceiro dia de cultivo, não foi detectado produção de ácido lático nos meios suplementados. Já no nono dia, o composto atingiu os limites de detecção (LD= 0,032 µg/mL) e quantificação (LQ= 0,096 µg/mL) nos três meios analisados, indicando um pico de produção nesse período. A partir desse ponto, o meio sem suplementação manteve concentrações estáveis de ácido lático, enquanto nos meios suplementados houve uma redução significativa, resultando em ausência de detecção no vigésimo dia (FIGURA 8). Esse padrão pode ser explicado pelo metabolismo microbiano da glicose, pois o ácido lático é um dos principais produtos da fermentação lática, uma rota inicial de geração de energia. Sua produção ocorre nas fases iniciais do crescimento bacteriano, mas tende a decair à medida que a glicose disponível é consumida e outras vias metabólicas passam a predominar, como forma de adaptação celular às novas condições do meio (MADIGAN, 2018).

FIGURA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO GERADO POR BSK EM DIFERENTES MEIOS.



FONTE: A autora, 2025.

Os resultados obtidos a partir das análises das amostras provenientes de biorreatores demonstraram que o método desenvolvido mostrou-se eficaz e aplicável, permitindo a detecção e quantificação de ácidos orgânicos ao longo do tempo.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento e validação parcial do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiu a determinação de seis ácidos orgânicos (cítrico, málico, acético, butírico, propiônico e lático). As condições cromatográficas desenvolvidas demonstraram eficiência na separação dos analitos, com quantificação de quatro ácidos orgânicos (cítrico, lático, acético e málico), especialmente com a fase orgânica à base de etanol, que proporcionou melhor resolução dos picos em comparação ao metanol. A linearidade do método foi comprovada por meio do coeficiente de correlação superior a 0,99, obtido para os seis ácidos analisados. Os resultados da quantificação dos ácidos nas amostras evidenciaram que o ácido cítrico apresentou a maior concentração, dentre os compostos avaliados, em meio suplementado com pó de rocha, em diferentes tempos de incubação, o que comprova a alta capacidade de produção desse ácido pelas cepas bacterianas

Bacillus velenzensis. A presença e o comportamento do ácido lático ao longo do período avaliado demonstraram uma correlação com o metabolismo da glicose, observando-se um aumento inicial seguido de redução na concentração, ao longo do tempo de incubação.

Estes resultados confirmam a eficácia do método proposto e a validação parcial promove a geração de dados analíticos confiáveis para o monitoramento da produção de ácidos orgânicos em processos fermentativos, reforçando assim, o potencial biotecnológico das bactérias solubilizadoras de potássio na produção de metabólitos de interesse agrícola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Orientação sobre validação de método analítico.** Resolução RE nº 899, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Boletim mensal de preços de combustíveis.** Rio de Janeiro: ANP, 2021.

ALEKSANDROV, V. G. *et. al*. **Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria**. Mikrobiologicheskii Zhurnal, v. 29, p. 111–114, 1967.

ALENCAR, J. F. **Caracterização bioquímica e molecular de isolados com potencial de solubilização de potássio.** Trabalho de Conclusão de Curso, UFPR. Palotina, 2025.

ALI, I. et al. **Potassium-solubilizing microorganisms and their role in sustainable agriculture**. *Biological Fertility of Soils*, [S. l.], v. 58, p. 1–17, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/s00374-021-01598-3.

ALVES, V. M. C. *et al.* **Solubilização de potássio: uma estratégia para melhorar a eficiência do uso de fertilizantes.** 24 p. (Documentos, 264)**.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2021. Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1134272/1/Doc-264-Solubilizacao-de-potassio.pdf. Acesso em: 24 maio 2025.

ANDEVIVERE, P. *et al.* **Saturation and mobilization of bacteria in sand columns by change in ionic strength.** Applied and Environmental Microbiology, v. 58, n. 6, p. 1690–1696, 1992. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1690-1696.1992.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Anuário estatístico do setor de fertilizantes**. São Paulo, 2019.

BAHADUR, I. *et al.* **Importance and application of potassic biofertilizer in Indian agriculture**. International Research Journal of Biological Sciences, v. 3, p. 80–85, 2014.

BASAK, B. B*. et al.* **Solubilization of K-bearing minerals by organic acid producing bacteria and their effect on plant growth promotion**. Applied Soil Ecology, v. 101, p. 85–93, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BOECHAT, I. L. P. **Análise de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de interesse agronômico e ambiental.** Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agronômica) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2015.

BICKLER, P. E. **Ethanol: a practical alternative to acetonitrile for reversed-phase high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography *A*, [S. l.], v. 844, n. 1-2, p. 161–165, 1999. DOI: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00184-7.

CERQUEIRA, M. B. R. *et al*. **Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida**. Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2148–2153, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000005. Acesso em: 21 jun. 2025.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ácido cítrico.** São Paulo, 2025. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br. Acesso em: 24 maio 2025.

COSTA, J. L. **Toxicologia Forense.** 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

DOURADO, M. N. *et al.* **Potassium-solubilizing microorganisms: diversity, mechanisms and applications**. In: MEHNTA, A. et al. (ed.). *R*hizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation. v. 2 p. 203–224. Singapore, 2018.

FRANCO, L. M. S. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ácidos haloacéticos por CG-EM**. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/55310. Acesso em: 24 maio 2025.

GORBAN, A. N**.** *et al*. **Law of the Minimum Paradoxes**. Bulletin of Mathematical Biology, v. 73, p. 2013–2044, 2011

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)**. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003.

International Conference on Harmonisation (ICH): **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, in Q2(R1)**. ICH Harmonised Tripartite Guideline: London, 2005.

KANTOR, M. M. *et al.* **Determinação de fármacos por HPLC com detecção UV em amostras de águas residuais**. Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 371–376, 2010. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200028. Acesso em: 15 jun. 2025.

KILIKIAN, B. V. *et al*. **Operações unitárias para a engenharia de bioprocessos.** 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020.

KIRKLAND, J. J. *et al.* **Fundamentos da cromatografia líquida moderna.** Rio de Janeiro: Interciência, 1979.

LI, F. C. et al. **Advances in the study of weathering products of primary silicate minerals, exemplified by mica and feldspar**. Acta Petrológica et Mineralogica, v. 25, p. 440–448, 2006.

LIAN, B. *et. al*. **Microbial release of potassium from K-bearing minerals by Bacillus mucilaginosus.** *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 72, n. 1, p. 87–98, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gca.2008.02.018.

LIAN, B. *et. al.* **Comprehensive review of the mechanism of potassium release by silicate bacteria.** *Acta Mineralogica Sinica*, v. 22, p. 179–183, 2002.

LIEBIG, J. V. **A química orgânica aplicada à agricultura e à fisiologia.** Tradução de H. Wagner. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1945.

LONGO, I. A. *et al*. **Vegetable oil extraction using co-solvent in ultrasonic bath.** *Brazilian Applied Science Review*, v. 4, n. 3, 2020. DOI: https://doi.org/10.34115/basrv4n3-088.

LIU, D. *et. al*. **Isolamento de *Paenibacillus sp.* e avaliação de seu potencial para melhorar o clima de minerais**. Geomicrobiology Journal, v. 29, p. 413–441, 2012.
MADIGAN, M. T. *et al.* Brock: Biologia dos Microorganismos**.** 15. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

MARCHSNER, P**. Mineral nutrition of higher plants.** 3. ed. London: Academic Press, 2012.

MEENA, V. S. *et al.* **Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica.** Bangladesh J. Bot. 43. 235 - 237, 2014.

MEENA, V. S. *et al.* **Potassium-solubilizing microorganism in evergreen agriculture: an overview**. New Delhi: Springer, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2_1.

MEENA, V. S *et al.* **The needs of nutrient use efficiency for sustainable agriculture**. A. (ed.). *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*. p. 421–451. Springer, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.044.

MOHAMED, H. M. *et al.* **Identification of yeast strains isolated from agricultural soils for releasing potassium-bearing minerals.** Geomicrobiology Journal, v. 34, p. 261–266, 2016.

OLIVEIRA, P. C. **Desenvolvimento de método analítico por CLUE-MS para determinação de ácidos orgânicos em vinhaça.** 2022. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/100/100136/tde-30052022-093158/pt-br.php. Acesso em: 24 maio 2025.

PIZOL, J. G. **Disponibilidade de potássio no solo e resposta da cultura do milho.** Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2022.

PRADO, M. *et al.* **Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina.** Quím. Nova 27, 2004. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000100005

RAJAWAT, M. V. S. *et al.* **Isolation and characterization of K-solubilizing bacteria isolated from different rhizospheric soil.** In: Proceeding of 53rd Annual Conference of Association of Microbiologists of India. p. 124, 2012.

RAJPUT, A. Y. S. *et al.* **High-performance liquid chromatography (HPLC): principles, applications, versatility, efficiency, innovation, and comparative analysis in dairy industry.** Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences, [S.l.], v. 3, n. 9, p. 101–110, 2022. Disponível em: https://www.openaccessjournals.com/articles/highperformance-liquid-chromatography-hplc-principles-applications-versatality--efficiency-innovation--and-comparative-analysis-in-18065.html. Acesso em: 15 jun. 2025.]

RAMOS, R. R. **Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia de alta eficiência para análise sara de petróleo.** Sáo Paulo, 2014

RIBANI, M. *et al***. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017

RODRÍGUEZ, H. *et al.* **Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*,** v. 17, n. 4-5, p. 319–339, 1999. DOI: https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2.

SATYA, S. *et al*. **Unraveling the potential of soil microbes for simultaneous nutrient solubilization and pesticide degradation toward sustainable agriculture.** Pedosphere, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 1–17, 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2025.02.001.

SATTAR, A. *et al.* **Potassium-solubilizing microorganisms for sustainable agriculture: a review**. Agronomy, v. 9, n. 2, p. 71, 2019. DOI:10.1201/9780429326400-2.

SAVCI, S. **An agricultural pollutant: Chemical fertilizer**. International Journal of Environmental Science and Development, v. 3, n. 1, p. 77–80, 2012 DOI: https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.03.047.

SHARMA, S. B. et al. **Potassium-solubilizing microorganisms for sustainable agriculture**. Agronomy for Sustainable Development, [S. l.], v. 33, p. 133–149, 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/s13593-012-0107-y.

SHENG, X. F. **Promotion of growth and increase in potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus***. Soil Biology and Biochemistry, v. 37, p. 1918–1922, 2005.

SILVA, A. C. F. *et al***. Atividade de solubilização de fosfato e produção de ácidos orgânicos por bactérias isoladas da rizosfera de milho.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1247–1256, 2011. Disponível em: https://www.scielo.br/j/rbcs/a/qVJ3KyXTkphqJxGjzPQnjwf/. Acesso em: 21 jun. 2025.

SKOOG, D. A. *et al.* **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SNYDER, L. R. *et. al*. **Introduction to modern liquid chromatography.** 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SONG, S. K. *et. al.* **Dynamics of potassium release from potassium-bearing minerals as influenced by oxalic and citric acids**. Soil Science Society of America Journal, v. 52, p. 383–390, 1988.

TEIXEIRA, R. O. *et. al.* **Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na soja.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2022. 30 p. (Documentos, 272).

UROZ, S. *et al*. **Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms.** Trends in Microbiology, v. 17, n. 8, p. 378–387, 2009. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.07.004.

VANDEVIVERE, P. *et al.* **A review of the role of extracellular polysaccharides in microbial adhesion to minerals.** Geomicrobiology Journal, v. 10, n. 2, p. 79–91, 1992.

WANG, N. *et al.* **Genotypic variation in photosynthetic and physiological adjustment to potassium deficiency in cotton *Gossypium hirsutum*.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 110, p. 1–8, 2012.

WANG, P. *et al.* **Determinação LC de ácidos orgânicos de cadeia curta em exsudatos de raiz de trigo sob estresse de alumínio**. Chroma, v. 66, p. 867–872, 2007. DOI: https://doi.org/10.1365/s10337-007-0418-0.

WANG, Z. *et al*. **Solubilization of K and P nutrients from coal gangue by *Bacillus velezensis*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 90, n. 11, e0153824, 20 nov. 2024. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.01538-24.

WU, C. *et. al*. **Determination of organic acids in the root exudates of Cr-hyperaccumulator Leersia hexandra Swartz using high performance liquid chromatography**. Se Pu, v. 36, n. 2, p. 167–172, 2018. DOI: https://doi.org/10.3724/SP.J.1123.2017.09009.

ZARJANI, J. K. *et al.* **Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils**. Archives of Agronomy and Soil Science, v. 59, n. 12, p. 1713–1723, 2013.

ZÖRB, C. *et al*. **Potassium in agriculture: status and perspectives.** Journal of Plant Physiology, v. 171, n. 9, p. 656-669, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008.