

UFG
IQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

F
L
Á
V
I
A

S
O
A
R
E
S

V
I
E
I
R
A

Desenvolvimento de métodos baseados em espectrometria de massas e cromatografia líquida para análise de compostos químicos produzidos por bioconversão de glicerina

NOME DO ALUNO: FLÁVIA SOARES VIEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR

COORIENTADOR: DR. CLENILSON MARTINS RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2018

GOIÂNIA- 2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Flávia Soares Vieira

Título do trabalho: Desenvolvimento de métodos baseados em espectrometria de massas e cromatografia líquida para análise de compostos químicos produzidos por bioconversão de glicerina

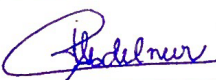
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 28 / 08 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS BASEADOS EM ESPECTROMETRIA
DE MASSAS E CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA PARA ANÁLISE DE
COMPOSTOS QUÍMICOS PRODUZIDOS POR BIOCONVERSÃO DE
GLICERINA**

FLÁVIA SOARES VIEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Federal de Goiás como
exigência parcial, para obtenção do título de
Mestre em Química

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur
Coorientador: Dr. Clenilson Martins Rodrigues

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Vieira, Flávia Soares

Desenvolvimento de métodos baseados em espectrometria de
massas e cromatografia líquida para análise de compostos químicos
produzidos por bioconversão de glicerina [manuscrito] / Flávia
Soares Vieira. - 2018.

xii, 95 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur; co-orientador Dr.
Clenilson Martins Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Ácidos orgânicos. 2. Polióis. 3. UHPLC. 4. Espectrometria de
massas. 5. Biotecnologia. I. Abdelnur, Patrícia Verardi, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de
Flávia Soares Vieira, aluna do Programa de Pós-
Graduação em Química do Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do
título de Mestra em Química.

Aos dias 19 (dezenove) de julho do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 14:00 hrs no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Patrícia Verardi Abdelnur (UFG/EMBRAPA), Clenilson Martins Rodrigues (EMBRAPA), Mauro Vicentini Correia (UNB) e Lucília Kato (UFG), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Flávia Soares Vieira intitulada: "Desenvolvimento de métodos baseados em espectrometria de massas e cromatografia líquida para análise de compostos químicos produzidos por bioconversão de glicerina". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado foi o seguinte:

Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur: Aprovada

Prof. Dr. Clenilson Martins Rodrigues: Aprovada

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia: APROVADO

Prof. Dra. Lucília Kato: Aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, a presidente da Banca Examinadora declarou que Flávia Soares Vieira, candidata ao título de Mestra em Química foi: Aprovada (☒); Reprovada (☐). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lidia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 19 de julho de 2018..

Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur

Prof. Dr. Clenilson Martins Rodrigues

Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia

Prof. Dra. Lucília Kato

*À Vilma, Livia, José Carlos, Felipe e Jesuway pela presença
ao longo deste trabalho e ao longo da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de realização deste curso de mestrado.

Aos pesquisadores Dra. Patrícia Verardi Abdelnur e ao Dr. Clenilson Martins Rodrigues pela grande oportunidade e confiança no trabalho, pela orientação e pelos ensinamentos compartilhados.

À Embrapa Agroenergia pela estrutura fornecida. Aos analistas José Antônio e Patrícia Kalil pela assistência na utilização dos equipamentos e ensinamentos.

Aos amigos do LQB: Augusto, Christiane, Diana, Jéssica Macêdo, Jorge, Juliana, Mauro, Paula, Pedro, Rodrigo, Tallyta e Vinícius pela convivência e ótimos momentos dentro e fora do laboratório. Um agradecimento especial ao Augusto, que acompanhou este trabalho desde o início, e a Diana pelas contribuições nas últimas etapas.

Aos outros amigos da Embrapa que tive o prazer de conhecer logo no início desse percurso. Às grandes amigas Andréia, Dani e Jéssica Guimarães.

À minha família por todo incentivo. À minha mãe pelo imenso suporte nessa etapa. Ao Jesuway pelo companheirismo durante todo esse período.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
Biodiesel	1
Aproveitamento da Glicerina	2
Métodos Analíticos	5
Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de ultra- alta eficiência	6
Detecção	8
Espectrometria de massas	9
Validação do método analítico	12
Objetivos	13
Objetivo geral	13
Objetivos específicos	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Reagentes e soluções	14
Métodos analíticos	15
UHPLC-PDA	15
Validação de método analítico	16
Linearidade	16
Limite de detecção e de quantificação	17
Precisão	18
Exatidão	19
UHPLC-MS	19
Amostras de bioconversão	22
CAPÍTULO 1: Desenvolvimento analítico por UHPLC-PDA	24
Escolha do pH da fase móvel	25
Gradiente de eluição	29
Vazão de fase móvel	34
Avaliação da Temperatura	36
Tempo de reequilíbrio da coluna	37
Avaliação da sensibilidade	40
Validação	41

Linearidade.....	41
LOD e LOQ.....	41
Precisão	43
Exatidão	46
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento analítico por UHPLC-MS.....	49
Ácidos orgânicos.....	49
Polióis	60
Método isocrático para análise do glicerol	70
CAPÍTULO 3: Determinação de compostos químicos produzidos a partir de glicerina por rotas biotecnológicas	72
Análises por UHPLC-PDA.....	72
Análises por UHPLC-MS	82
CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química e pK _a dos dez ácidos orgânicos analisados.....	4
Figura 2. Estrutura química dos polióis: eritritol e treitol (C4); arabitol, ribitol e xilitol (C5); iditol, dulcitol, manitol, sorbitol (C6); fucitol (C6); volemitol (C7).	5
Figura 3. Esquema do monitoramento de reação múltipla (MRM) com triplo quadrupolo (adaptado de Want <i>et al.</i> 2005).....	11
Figura 4. Influência do pH da fase móvel nos parâmetros cromatográficos: A) fator de simetria, B) número de pratos teóricos e C) tempo de retenção.	26
Figura 5. Cromatogramas adquiridos em 210 nm ilustrando o efeito da variação do pH da fase móvel na faixa de 2,0 – 3,5 para o ácido glicérico (A) e ácido cítrico (B) utilizando sistema de eluição isocrático.....	27
Figura 6. Efeito do pH no tempo de retenção do ácido oxálico utilizando sistema de eluição isocrático.	28
Figura 7. Separação cromatográfica obtida do ácido oxálico t _R 0,91 (1), ácido glicérico t _R 1,11 (2), ácido láctico t _R 1,80 (3), ácido cítrico t _R 3,04 (4), e ácido succínico t _R 3,36 (5), utilizando eluição isocrática com tampão fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄) 10 mM pH 2,0 e MeOH 98:2, forno de coluna a 30°C e vazão a 0,4 mL/min. Cromatogramas adquiridos em 210 nm.	29
Figura 8. Cromatogramas individuais para o ácido xilônico (A), ácido fumárico (B) e ácido propiônico (C) adquiridos em 210 nm e ácido mucônico (D) adquirido em 260 nm, obtidos nas condições de eluição em gradiente chegando a 15% de MeOH.	31
Figura 9. Cromatogramas obtidos a partir da utilização da coluna C8 mostrando piora na separação cromatográfica com coeluição total do ácido oxálico (1) e do ácido xilônico (2) (A), e melhora na separação entre o ácido fumárico (B) e ácido succínico (C). Os cromatogramas foram adquiridos em 210 nm.	32
Figura 10. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t _R 0,928 (1), ácido xilônico t _R 0,990 (2), ácido glicérico t _R 1,129 (3), ácido láctico t _R 1,905 (4), ácido cítrico t _R 3,150 (5), ácido fumárico t _R 3,501 (6), ácido succínico t _R 3,564 (7), ácido propiônico t _R 5,292 (8), ácido mucônico t _R 9,930 (9) adquiridos em 210 nm na condição de eluição com início isocrático até 0,5 min.	33

Figura 11. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 0,928 (1), ácido xilônico t_R 0,991 (2), ácido glicérico t_R 1,130 (3), ácido láctico t_R 1,850 (4), ácido cítrico t_R 3,191 (5), ácido fumárico t_R 3,555 (6), ácido succínico t_R 3,640 (7), ácido propiônico t_R 5,452 (8), ácido mucônico t_R 10,034 (9) adquiridos em 210 nm na condição de eluição com início isocrático até 1,5 min.....	34
Figura 12. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 0,928 (1), ácido xilônico t_R 0,991 (2), ácido glicérico t_R 1,130 (3), ácido láctico t_R 1,850 (4), ácido cítrico t_R 3,191 (5), ácido fumárico t_R 3,555 (6), ácido succínico t_R 3,640 (7), ácido propiônico t_R 5,452 (8), ácido mucônico t_R 10,034 (9) adquiridos em 210 nm na condição de fluxo a 0,4 mL/min.	35
Figura 13. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 1,238 (1), ácido xilônico t_R 1,322 (2), ácido glicérico t_R 1,513 (3), ácido láctico t_R 2,572 (4), ácido cítrico t_R 4,437 (5), ácido fumárico t_R 4,879 (6), ácido succínico t_R 4,984 (7), ácido propiônico t_R 7,168 (8), ácido mucônico t_R 12,548 (10) adquiridos em 210 nm na condição de fluxo a 0,3 mL/min.	35
Figura 14. Comparação dos cromatogramas de ácido mucônico em gradiente atingindo 15% de solvente orgânico (A) e atingindo 25% de solvente orgânico (B) adquiridos em 260 nm.	36
Figura 15. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 1,224 (1), ácido xilônico t_R 1,305 (2), ácido glicérico t_R 1,493 (3), ácido láctico t_R 2,536 (4), ácido cítrico t_R 4,389 (5), ácido fumárico t_R 4,822 (6), ácido succínico t_R 4,883 (7), ácido kójico t_R 6,092 (8), ácido propiônico t_R 6,930 (9) adquiridos em 210 nm (A), e ácido mucônico t_R 10,420 (10) adquirido em 260 nm.	39
Figura 16. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido oxálico com m/z 89 ([M-H] ⁻) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 7 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.	51
Figura 17. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido xilônico com m/z 165 ([M-H] ⁻) com voltagem do cone 28 V e energia de colisão 15 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação... ..	51
Figura 18. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido glicérico com m/z 105 ([M-H] ⁻) com voltagem do cone 27 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação. ..	52

Figura 19. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido láctico com m/z 89 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.	52
Figura 20. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido cítrico com m/z 191 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 16 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação. ..	53
Figura 21. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido fumárico com m/z 115 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 7 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação. ..	53
Figura 22. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido succínico com m/z 117 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação. ..	54
Figura 23. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de ácido kójico com m/z 141 ($[M+H]^+$) com voltagem do cone 35 V e energia de colisão 17 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação. ..	54
Figura 24. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido mucônico com m/z 141 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.	55
Figura 25. Cromatogramas de MRM analisados por UHPLC-MS/MS para o: A) ácido xilônico, B) ácido glicérico, C) ácido láctico, D) ácido cítrico, E) ácido fumárico, F) ácido succínico, G) ácido kójico, H) ácido mucônico utilizando a coluna HSS T3.....	57
Figura 26. Cromatogramas de MRM analisados por UHPLC-MS/MS para: A) ácido kójico, B) ácido láctico, C) ácido glicérico, D) ácido xilônico, E) ácido succínico, F) ácido mucônico, G) ácido fumárico, H) ácido oxálico I) ácido cítrico utilizando a coluna SeQuanti ZIC HILIC.	59
Figura 27. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de glicerina com m/z 93 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	62
Figura 28. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de eritritol com m/z 123 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	62

Figura 29. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de treitol com m/z 123 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	63
Figura 30. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de arabitól com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	63
Figura 31. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de ribitol com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	64
Figura 32. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de xilitol com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	64
Figura 33. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de dulcitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	65
Figura 34. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de iditol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	65
Figura 35. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de manitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	66
Figura 36. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de sorbitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	66
Figura 37. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de fucitol com m/z 167 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 8 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	67
Figura 38. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de volemitol com m/z 213 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 12 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.....	67
Figura 39. Cromatograma ESI(+)-MS/MS referente aos padrões de polióis a 5 $\mu\text{g/mL}$ (1- glicerina, 2-eritritol, 3-treitol, 5-ribitol, 6-xilitol, 7-arabitól, 8-iditol, 9-	

sorbitol, 10-manitol, 11-dulcitol, 12-volemitol) e do 4-fucitol a 1 µg/mL. (A) Cromatograma a 30°C e (B) cromatograma a 73°C.	69
Figura 40. Cromatograma dos canais de MRM padrão de glicerina com m/z 93 ($[M+H]^+$) a 25 µg/mL utilizando: (A) eluição isocrática com 92:8 (H ₂ O +AF 0,1% : ACN +AF 0,1%); (B) eluição isocrática com 95:5 (H ₂ O +AF 0,1% : ACN +AF 0,1%); (C) eluição no gradiente mostrado na Tabela 17.	71
Figura 41. Gráfico com a concentração de ácido cítrico produzida nas amostras LQB-001, LQB-002, LQB-003 e LQB-004 a partir de bioconversão de diferentes tipos de glicerina a 30 g/L por fungos filamentosos. Dados obtidos em triplicata biológica de fermentação (R1, R2 e R3).	74
Figura 42. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA de ácido cítrico identificados em amostras de bioconversão obtidas em triplicata biológica (1, 2, 3) de quatro diferentes fungos filamentosos: LQB-001 (A), LQB-002 (B), LQB-003 (C), LQB-004 (D).	74
Figura 43. Gráfico de concentração de ácido láctico em diferentes amostras obtidas por bioconversão de glicerina industrial 1 a 40 g/L por bactéria.	76
Figura 44. Gráfico de monitoramento da produção de ácido xilônico pelos microrganismos LQB-018 e LQB-019 em 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46, 50 horas de bioconversão em meio contendo 10 g/L de glicerina industrial e 40 g/L de xilose.	77
Figura 45. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA de ácido xilônico (AX) identificados em amostras de fermentação obtidos de dois microrganismos diferentes: (A) LQB-018, (B) LQB-019 em 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46 e 50h de bioconversão, mostrados de baixo para cima.	78
Figura 46. Gráfico de produção de ácido kójico pelos microrganismos LQB-020 (A) e LQB-021 (B) com 5 e 10 dias de bioconversão de glicerina industrial a 60 g/L, em que C1 e C2 representam as condições de cultivo e R1, R2 e R3 representam as réplicas biológicas.	80
Figura 47. Cromatogramas obtidos nas análises por UHPLC-PDA de ácido kójico identificados em amostras de bioconversão de glicerina (C1 e C2) obtidos por dois microrganismos diferentes: amostra C1 com 5 (A) e 10 dias (E) de bioconversão e amostra C2 com 5 (B) e 10 dias (F) de bioconversão pelo microrganismos LQB-021;	

amostra C1 com 5 (C) e 10 dias (G) de bioconversão e amostra C2 com 5 (D) e 10 dias (H) de bioconversão pelo microrganismos LQB-020..... 81

Figura 48. Gráfico de produção de polióis a partir de diferentes amostras de fungos filamentosos: LQB-022 (Figura 48.A), LQB-023 (Figura 48.B), LQB-024 (Figura 48.C), geradas com 5 e 10 dias de bioconversão de glicerina industrial a 40 g/L, em triplicata biológica. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das soluções utilizadas no ensaio de linearidade para obtenção das curvas analíticas.....	17
Tabela 2. Valor nominal das massas: monoisotópica, protonada $[M+H]^+$, desprotonada $[M-H]^-$ e com aduto de sódio $[M+Na]^+$ para os ácidos orgânicos estudados.	20
Tabela 3. Valor nominal das massas: monoisotópica, protonada $[M+H]^+$, desprotonada $[M-H]^-$ e com aduto de sódio $[M+Na]^+$ para os polióis estudados.....	21
Tabela 4. Comparação do tempo de retenção médio do ácido oxálico e ácido xilônico nas temperaturas de 25°C e 30°C.	37
Tabela 5. Desvio padrão e coeficiente de variação do tempo de retenção de três injeções sequenciais dos ácidos orgânicos.	38
Tabela 6. Gradiente de eluição da fase móvel.	39
Tabela 7. Valores de concentração dos ácidos orgânicos em que foram obtidas as respostas máximas e mínimas do detector.	40
Tabela 8. Dados de regressão linear, coeficientes de regressão linear (R^2), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), de ácidos orgânicos por UHPLC-PDA. para os ácidos orgânicos investigados.....	42
Tabela 9. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico.	44
Tabela 10. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o ácido cítrico, ácido glicérico, láctico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido xilônico.....	45
Tabela 11. Resultados da exatidão do ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico.	47
Tabela 12. Resultados da exatidão do ácido cítrico, ácido glicérico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido succínico e ácido xilônico.	48
Tabela 13. Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM (Multiple Reaction Monitoring) dos padrões de ácidos orgânicos.	56
Tabela 14. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos utilizando a coluna SeQuant.	58

Tabela 15. Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM dos padrões de metabólitos utilizando ESI(+)-MS/MS mostrando os valores de m/z selecionados em Q1 e em Q3.	61
Tabela 16. Gradiente cromatográfico utilizado na separação dos 11 polióis.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF	Ácido Fórmico
ACN	Acetonitrila
CE	Eletroforese capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i>)
CG	Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i>)
CO	Monóxido de carbono
DIMS	Infusão direta por Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i>)
EI	Ionização por elétrons
ELSD	Detector Evaporativo com Espalhamento de Luz: (do inglês, <i>Evaporative Light Scattering Detector</i>)
ESI	Ionização por Electrospray (do inglês, <i>Electrospray ionization</i>)
ESI-MS	Ionização por Electrospray e detecção por Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Electrospray ionization - Mass spectrometry</i>)
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>)
HC	Hidrocarbonetos
HILIC	Cromatografia por Interação Hidrofílica (do inglês, <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, <i>High Eficiência Liquid Chromatography</i>)
HPLC-PDA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Fotodiodos (do inglês, <i>High Eficiência Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i>)
HRMS	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (do inglês, <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
IELC	Cromatografia por Exclusão Iônica (do inglês, <i>Ion Exclusion Chromatography</i>)
kt	Quiloton

kV	Quilovolt
LC	Cromatografia Líquida (do inglês, <i>Liquid Chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i>)
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
[M – H]–	Molécula desprotonada
[M + H]+	Molécula protonada
m/z	Razão Massa/Carga
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, <i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
PDA	Detector de Arranjo de Fotodiodos (do inglês, <i>Photodiode Array Detector</i>)
RI	Detector de Índice de Refração (do inglês, <i>Refractive Index</i>)
RPLC	Cromatografia líquida de fase reversa (do inglês, <i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>)
R _s	Resolução
t _r	Tempo de retenção
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (do inglês, <i>Ultrahigh Eficiência Liquid Chromatography</i>)
UHPLC-MS	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas (do inglês, <i>Ultrahigh Eficiência Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
UHPLC-PDA	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Fotodiodos (do inglês, <i>Ultrahigh Eficiência Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector</i>)
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMO

A produção de biodiesel tem aumentado a cada ano, o que vem gerando excedentes de glicerina, principal coproduto do processo de transesterificação. A biotecnologia se destaca como alternativa promissora para agregação de valor à glicerina. Em processos de fermentação, os microrganismos são utilizados para converter essa abundante fonte de carbono em compostos de maior interesse econômico, como ácidos orgânicos e polióis. No entanto, ainda há alguns desafios tecnológicos, como o baixo rendimento dos processos e a falta de métodos analíticos sensíveis e seletivos capazes de identificar e quantificar os compostos produzidos.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias analíticas para identificar e quantificar compostos obtidos a partir de processos de bioconversão, tais como ácidos orgânicos e polióis. Para garantir a quantificação destas substâncias-alvo, métodos baseados em cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) acoplada aos detectores de arranjo de fotodiodos (PDA) e de espectrometria de massas (MS) foram avaliados como alternativas para o monitoramento dessas duas classes de compostos químicos.

Os analitos investigados nesse estudo foram ácidos orgânicos de cadeia curta, incluindo: ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido xilônico; e polióis, estereoisômeros contendo 4 carbonos (C4: eritritol e treitol), 5 carbonos (C5: arabitol, ribitol, xilitol), 6 carbonos (C6: dulcitol, iditol, manitol, sorbitol) e com 7 carbonos (C7: volemitol).

O método UHPLC-PDA desenvolvido para análise de ácidos orgânicos foi validado pelos parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. As curvas analíticas mostraram boa linearidade com coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,999 para todos os ácidos orgânicos. A precisão e exatidão demonstraram ser adequadas com coeficientes de variação intra-dia e inter-dia inferiores a 4,06%, e a recuperação variou de 94,90% a 109,63%. Os métodos de UHPLC-MS desenvolvidos apresentaram maior sensibilidade e seletividade na detecção de ácidos orgânicos e polióis, sendo capaz de monitorar esses analitos mesmo eles estando em baixa quantidade.

Os métodos analíticos desenvolvidos neste trabalho são ferramentas cruciais na seleção ou triagem dos microrganismos promissores para conversão de substratos de baixo valor agregado e importantes para a etapa de otimização dos processos biotecnológicos de produção desses compostos de interesse.

ABSTRACT

Biodiesel production has been increasing every year, which has generated surpluses of glycerin, the main co-product of the transesterification reaction. In the search for applications to this surplus, microbial fermentation has been highlighted as an alternative to add value to this co-product. In this process, microorganisms are used to convert this abundant carbon source into compounds of high economic value, including organic acids and polyols. However, there are still some technological challenges, such as low yield during the fermentation processes and high dependence of new analytical methods, more sensitive and selective, able to identify and quantify the compounds produced.

The objective of this work was to establish new analytical methodologies to identify and quantify compounds from bioconversion processes involving the production of organic acids and polyols. To guarantee the quantification of the target compounds, methods based on ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) were developed and the photodiode array (PDA) and mass spectrometry (MS) detectors were evaluated as alternatives for the monitoring of these two classes of chemical compounds. The analytes investigated in this study were short chain organic acids: citric acid, fumaric acid, glyceric acid, kojic acid, lactic acid, muconic acid, oxalic acid, propionic acid, succinic acid, xylonic acid; and polyols with spatial isomers, including polyols with 4 carbons (C4: erythritol and threitol), 5 carbons (C5: arabitol, ribitol, xylitol), and 6 carbons (C6: dulcitol, iditol, mannitol, sorbitol) and 7 carbons (C7: volemitol).

The UHPLC-PDA method developed for the analysis of organic acids was validated by parameters of linearity, limit of detection and quantification, precision and accuracy. The analytical curves showed good linearity with determination coefficients (R^2) higher than 0.999 for all organic acids. Precision and accuracy were adequate with intra-day and inter-day variation coefficients below 4.06% and recovery ranged from 94.90% to 109.63%. The developed UHPLC-MS methods presented greater sensitivity and selectivity in the detection of organic acids and polyols, being able to monitor these analytes even in low quantity.

The analytical methods developed in this work are crucial tools in the selection or screening of promising microorganisms for low added value substrates conversion and important to optimize biotechnological processes for production of these compounds of interest.

INTRODUÇÃO

Biodiesel

A crescente demanda global por energia tem resultado na extensa exploração das reservas de petróleo e gás, bem como no aumento da emissão de gases do efeito estufa, devido à elevada utilização desses combustíveis fósseis (Chuah *et al.*, 2017). A necessidade de garantir a segurança energética e minimizar os impactos ambientais tem motivado a busca por novas fontes de energia (Ho *et al.*, 2014). Biocombustíveis como o biodiesel, produzidos a partir de matérias-primas renováveis, que podem ser de origem animal ou vegetal, tais como gordura animal ou sementes de oleaginosas, são considerados uma alternativa sustentável. O biodiesel é uma importante forma de progresso tecnológico para limitar as emissões de gases do efeito estufa e diminuir a poluição ambiental (Quispe *et al.*, 2013; Chuah *et al.*, 2017).

Este biocombustível é comercialmente obtido por processos de transesterificação de óleos vegetais e gorduras com um álcool na presença de catalisador. Nesse processo são gerados três mols de éster de ácido graxo para cada mol de glicerina. Os ésteres são separados da glicerina e utilizados como biocombustível. Correspondendo a cerca de 10% do produto final da reação, a glicerina é um coproduto da produção do biodiesel gerado em quantidade considerável (Quispe *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2014; Hejna *et al.*, 2016).

Atualmente, este coproduto possui aplicações em diversos setores tais como: indústrias alimentícia, química, farmacêutica e de cosméticos. No entanto, a glicerina obtida nesse processo possui inúmeras impurezas como metanol, água e ácidos graxos, sendo necessária etapa de purificação para viabilizar sua aplicação industrial. Apesar do baixo custo da glicerina bruta, a purificação é um processo caro e o mercado da glicerina encontra-se saturado (Ayoub e Abdullah, 2012; Hejna *et al.*, 2016).

A incorporação do biodiesel na matriz energética brasileira é recente. A obrigatoriedade da mistura de 2% do biodiesel ao diesel de origem fóssil, em todo território brasileiro, entrou em vigor em 2008 e, desde então, esse percentual vem aumentando (Padilha e Saionara, 2012). Recentemente, com a publicação da Resolução Nº 11 do Conselho Nacional de Política Energética, houve aumento da

mistura para 9% com previsão para chegar a 10% em 2019 (CNPE) (BRASIL, 2017). O aumento da produção de biodiesel acarretará grandes excedentes de glicerina impura, trazendo novos desafios sobre reutilizar a glicerina, a fim de garantir a viabilidade econômica da cadeia produtiva deste biocombustível (Quispe *et al.*, 2013).

Aproveitamento da Glicerina

Pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas de aproveitamento deste coproduto. Uma alternativa que se destaca é a fermentação microbiana. Nesse processo, microrganismos são utilizados para converter a glicerina em compostos químicos de maior valor agregado tais como ácidos orgânicos, polióis e dióis (Almeida *et al.*, 2012; Leoneti *et al.*, 2012; Schultz *et al.*, 2014; Hejna *et al.*, 2016). Outros compostos de grande importância comercial têm sido obtidos a partir da glicerina por via biotecnológica.

Como exemplos podem ser citados a dihidroxicetona, que possui usos terapêuticos no tratamento do vitiligo, polihidroxicanoatos, principal substituto biodegradável do plástico convencional, e biosurfactantes (Khanna *et al.*, 2012).

No caso de ácidos carboxílicos e polióis, esses compostos têm utilização nos setores das indústrias farmacêutica, de cosméticos, de alimentos, além de sua utilização como intermediários na síntese química (Almeida *et al.*, 2012). Alguns ácidos orgânicos como o ácido cítrico, ácido lático, e ácido succínico possuem amplo uso como aditivos na indústria de alimentos, sendo utilizados como acidulantes, antioxidantes e flavorizantes. O ácido succínico é também extremamente útil como material de partida na indústria química. Butanodiol, tetrahydrofurano e gama-butirolactona, são exemplos de substâncias que podem ser obtidas a partir do ácido succínico e que são utilizados na indústria química como solventes e para produção de fibras e polímeros (Sauer *et al.*, 2008).

Polióis também possuem utilização nas indústrias de alimentos, como substitutos do açúcar, na indústria farmacêutica, como edulcorantes, na indústria médica, e podem ser utilizados como intermediários na síntese química. O consumo de produtos que contenham polióis tem sido recomendado para pessoas obesas ou

diabéticas, uma vez que possuem menor valor calórico que os açúcares, auxiliando a perda de peso, e também por não induzirem tanto o aumento da glicemia. Alguns exemplos de polióis disponíveis comercialmente são: eritritol, lactitol, maltitol, manitol, sorbitol e xilitol. Os polióis arabitól, sorbitol e xilitol foram identificados como parte das principais moléculas derivadas do processamento de biomassa para utilização como blocos construtores, “*building blocks*” (Almeida *et al.*, 2012; Grembecka, 2015).

Visando minimizar a geração de resíduos e agregar valor às substâncias, ferramentas biotecnológicas são utilizadas para produção de compostos de maior valor agregado. Algumas linhas de pesquisa da Embrapa Agroenergia, na qual esse estudo foi desenvolvido, envolvem a obtenção de insumos utilizando microrganismos que sejam capazes de usar a glicerina como fonte de carbono. Outras utilizam a engenharia metabólica na obtenção de linhagens geneticamente modificadas capazes de converter xilose em ácido xilônico na presença ou ausência de glicerina.

A prospecção de microrganismos e de condições de fermentação, ideais para a bioconversão de uma determinada fonte de carbono em compostos químicos de interesse comercial, envolve a análise de grande número de amostras. Nesse sentido, a análise de rotina para esse propósito requer métodos rápidos, simples e confiáveis.

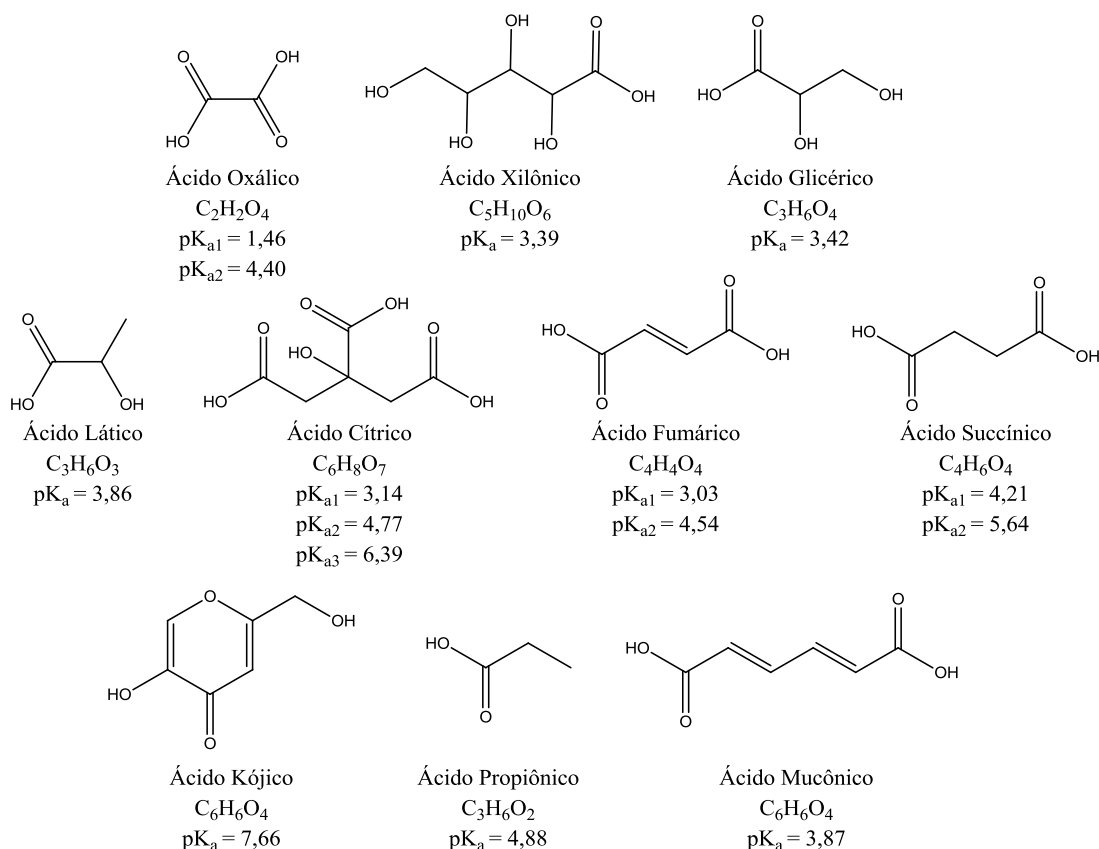
O grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia tem realizado a prospecção de microrganismos da sua coleção de modo a identificar aqueles que sejam capazes de produzir compostos de interesse para o setor produtivo.

Nesses estudos, realizaram-se, inicialmente, análises de metabolômica *untargeted*, por infusão direta (DI, do inglês *Direct Infusion*) utilizando HRMS (*High Resolution Mass Spectrometry*), para identificar os compostos produzidos após a bioconversão de glicerina com a utilização de diferentes microrganismos. Foram identificados microrganismos promissores que produziram ácidos orgânicos, como o ácido cítrico e o ácido kójico, e polióis do tipo C4 (treitol/eritritol), C5 (xilitol/arabitól/ribitol) e C6 (dulcitol/manitol/sorbitol/iditol) (Souto *et al.*, 2015; Vianna *et al.*, 2016; Vianna *et al.*, 2017).

Apesar da DI-HRMS ser uma ferramenta analítica poderosa para análise qualitativa dos compostos químicos gerados, não é um método ideal para análises quantitativas de amostras complexas, devido ao efeito de supressão iônica para

alguns compostos. Sendo assim, a utilização de métodos cromatográficos para a separação prévia dos compostos é mais recomendável para análises quantitativas dos compostos identificados previamente por DI-HRMS.

Cada classe analisada nesse trabalho possui diferentes particularidades que denotam desafios analíticos a serem superados. O grupo de ácidos carboxílicos analisados possui compostos com diferentes polaridades, impondo a necessidade de se estabelecer condições que resolvam e reduzam os efeitos causados pela acidez das espécies monitoradas. A estrutura química dos ácidos orgânicos estudados e seus respectivos valores de pKa estão representados na Figura 1.



Fonte: Nollet (2012); PubChem (2018); HMDB (2018).

Figura 1. Estrutura química e pKa dos dez ácidos orgânicos analisados.

Por outro lado, os polióis analisados possuem mais de um centro estereogênico, por conta disso possuem mais de um estereoisômero. Portanto, são compostos com a mesma fórmula molecular que apresentam a mesma conectividade entre os ligantes, mas com distribuição espacial distinta. A distinção dos mesmos não

é fácil, principalmente quando se pensa em análises de rotina. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos complementares para a quantificação destes compostos. A estrutura química dos polióis estudados e seus diferentes isômeros é mostrada na Figura 2.

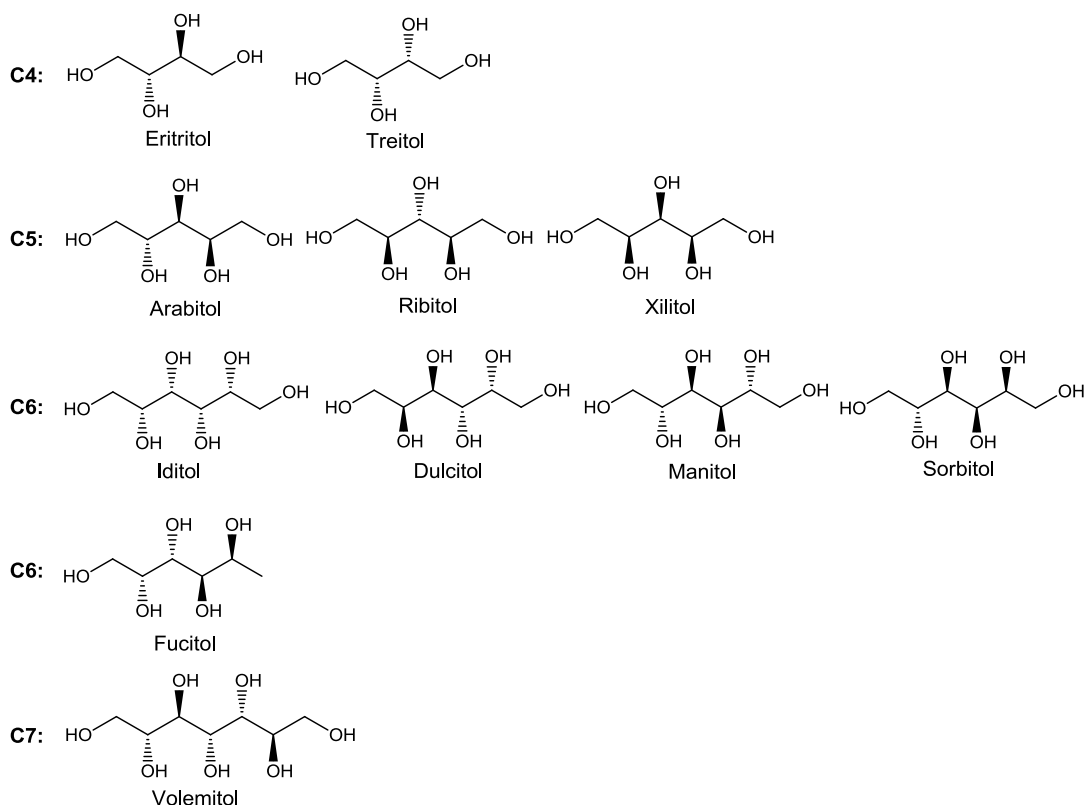


Figura 2. Estrutura química dos polióis: eritritol e treitol (C4); arabitol, ribitol e xilitol (C5); iditol, dulcitol, manitol, sorbitol (C6); fucitol (C6); volemitol (C7).

Métodos Analíticos

Diversos métodos analíticos baseados em cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) (Makoś *et al.*, 2018), eletroforese capilar (CE, do inglês *Capilar Eletrophoresis*) (Gatea *et al.*, 2015), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Eficiência Liquid Chromatography*) e

cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) têm sido empregados para a quantificação de ácidos orgânicos e polióis em diferentes matrizes (Shui e Leong, 2002; Chen *et al.*, 2010; De Sena Aquino *et al.*, 2015). Devido à sua baixa volatilidade e alto ponto de ebulição, dificilmente ácidos orgânicos e polióis podem ser analisados diretamente por GC. Assim, trabalhos que envolvem GC necessitam de etapas de derivatização para auxiliar a detecção, tornando o procedimento muito laborioso e demorado, não sendo adequado para análises de rotina (Chen *et al.*, 2010; De Sena Aquino *et al.*, 2015; Mechri *et al.*, 2015).

Dentre as técnicas citadas, a cromatografia líquida com diferentes detectores tem sido preferencialmente utilizada na quantificação de ácidos orgânicos e polióis devido à simplicidade e por envolver um rápido preparo de amostra (Shui e Leong, 2002; Chen *et al.*, 2010; De Sena Aquino *et al.*, 2015).

Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida de ultra-alta eficiência

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de misturas que utiliza uma fase estacionária e uma fase móvel, que se desloca através da fase estacionária. A separação ocorre pela distribuição dos componentes da mistura nessas duas fases, de acordo com a afinidade dos analitos com a fase estacionária e a fase móvel. A cromatografia líquida clássica utiliza colunas de vidro de diâmetro elevado e fluxo de fase móvel sob pressão atmosférica, enquanto que a HPLC emprega colunas de aço fechadas, preenchidas com partículas de 3-5 µm de diâmetro e pressão de fase móvel elevada, obtida com uma bomba de alta pressão (Collins *et al.*, 2006; Maldaner e Jardim, 2009).

Desde a sua implantação, a cromatografia líquida vem apresentando diversos avanços. A demanda por análises mais rápidas e com bom desempenho impulsionou o desenvolvimento de fases estacionárias com tamanhos de partícula menores que 5 µm. A redução no tamanho da partícula permitiu o uso de colunas menores e mais eficientes. O menor diâmetro minimiza os efeitos dos múltiplos caminhos de um analito durante seu percurso e permite transferências mais rápidas do analito entre a

fase estacionária e a fase móvel. Dessa maneira, picos mais simétricos e bem resolvidos são obtidos. Outra vantagem obtida ao utilizar colunas de menor tamanho é a redução no consumo de solvente, uma vez que ocorre redução no tempo de análise e vazão utilizada (Maldaner e Jardim, 2009).

O sistema cromatográfico teve que passar por modificações instrumentais para que fosse capaz de operar em pressões mais elevadas, vindo a ser denominado de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC). As novas fases estacionárias também foram desenvolvidas de modo a suportarem as altas pressões, tendo em vista que a resistência à passagem da fase móvel aumenta quando se utiliza colunas contendo um material mais empacotado. (Maldaner e Jardim, 2009).

A tecnologia de UHPLC, que utiliza colunas contendo partículas menores que 2 μm , foi inicialmente empregada para condições de cromatografia líquida de fase reversa RPLC (Do inglês, *reversed phase high performance liquid chromatography*). Mas, atualmente, ela vem mostrando-se eficaz para os outros modos de separação conhecidos, por exemplo: para a cromatografia de interação hidrofílica HILIC (Do inglês: *hydrophilic interaction chromatography*) e cromatografia de troca iônica IEC (Do inglês, *Ion exchange Chromatography*) (Fekete *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, a UHPLC tornou-se uma técnica ideal para o desenvolvimento de métodos rápidos (Dong e Zhang, 2014). Tanto a UHPLC quanto a HPLC possuem os mesmos mecanismos de separação, diferenciando-se apenas em parâmetros físico-químicos instrumentais (Gumustas *et al.*, 2013).

A cromatografia líquida tem sido utilizada na análise de compostos polares com diferentes fases estacionários, tais como IEC e RPLC. IEC geralmente é realizada utilizando colunas de troca catiônica (Fasciano *et al.*, 2016; Shojaeimehr *et al.*, 2018) e a RPLC em colunas C18 (Tyagi *et al.*, 2014; Zong *et al.*, 2015). Muitas dessas análises ainda utilizam os sistemas HPLC, com longo tempo de análise e alto consumo de solventes.

O método HILIC surgiu como uma importante ferramenta na análise de compostos polares, principalmente por proporcionar maior retenção quando comparada à cromatografia líquida de fase reversa. A HILIC conjuga características de cromatografia líquida de fase reversa, fase normal e troca iônica. A fase móvel empregada possui alto teor de solvente orgânico em misturas com sistemas de tampão e a fase estacionária utilizada é polar, proporcionando maior retenção de

compostos mais hidrofílicos. A separação, entretanto, é complexa e envolve mecanismos de partição, adsorção e troca iônica (Guo e Gaiki, 2005; Buszewski e Noga, 2012; Fekete *et al.*, 2014).

Uma desvantagem da HILIC está na grande quantidade do solvente orgânico empregado, em especial a acetonitrila (ACN), que tem alta toxicidade e alto custo. Nesse sentido, a cromatografia de fase reversa para análise de compostos polares representa uma técnica ambientalmente mais favorável por utilizar uma proporção mais alta de solvente aquoso e a substituição de ACN por outro solvente orgânico (Capello *et al.*, 2007; Elzanfaly *et al.*, 2015).

Deteção

Diferentes detectores podem ser empregados na análise de ácidos orgânicos e polióis. A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA) tem sido utilizada para análise de ácidos orgânicos devido à sua simplicidade, mas é ainda uma opção que envolve longos tempos de análise (Aquino *et al.*, 2015; Shui e Leong, 2002). A detecção por PDA deve-se à presença de grupos cromóforos tais como a ocorrência de carboxilas e de sistemas de ligações duplas conjugadas, funções que contribuem para que tais compostos possam absorver na região do ultravioleta (UV). A análise de ácidos orgânicos por PDA pode oferecer benefícios para análises de rotina pela simplicidade, por ser um detector facilmente encontrado em laboratórios e, aliada às vantagens da técnica de UHPLC, podem ser obtidas redução nos custos de análise, por fornecer análises mais rápidas e com menor consumo de solventes.

A necessidade de uma metodologia que analisasse ácidos orgânicos com diferentes propriedades, tais como compostos mais polares como o ácido oxálico, ácido xilônico e ácido glicérico, e ao mesmo tempo compostos menos polares como o ácido mucônico, impulsionou o desenvolvimento dessa metodologia.

Polióis, entretanto, carecerem de um grupo que absorva no UV nas faixas comumente usadas (200-400 nm) e necessitam de derivatização para serem analisados por UV (Kemmei *et al.*, 2018), ou ainda, podem ser monitorados a partir da utilização outros tipos de detectores (Chen *et al.*, 2010). Por exemplo, métodos

que utilizam cromatografia líquida com detecção por espalhamento de luz (ELSD, do inglês *Evaporative Light Scattering Detector*) são utilizados para monitorar polióis provenientes de processos biotecnológicos (Fontes *et al.*, 2016 a). A detecção por índice de refração (RI, do inglês *Refractive Index*) também é utilizada para analisar polióis provenientes da bioconversão de glicerina (Khan *et al.*, 2009). No entanto, esse detector é muito sensível a variações da composição da fase móvel, não sendo adequado para analitos cuja separação requer eluição em modo gradiente (Megoulas e Koupparis, 2005). Tanto ELSD quanto RID fornecem altos limites de detecção e quantificação, não atendendo, em sua totalidade, as necessidades de estudos prospectivos que, primeiro, buscam identificar os microrganismos produtores de analitos de interesse.

O grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia desenvolveu um protocolo de quantificação de 11 polióis empregando HILIC-UHPLC-ELSD (Fontes *et al.*, 2016 b), mas, novamente, trata-se de um protocolo para análise destes analitos produzidos em altas concentrações, o que ainda não atendia a etapa inicial de prospecção. Isso ficou evidente durante a etapa de identificação de microrganismos produtores de polióis por DI-HRMS, em que foram identificados microrganismos que produziram polióis de interesse, mas que devido à limitada sensibilidade do método, não foi possível realizar a quantificação dos mesmos pelo protocolo HILIC-UHPLC-ELSD. Dessa maneira, a proposição de uma metodologia mais sensível foi abordada nesse estudo.

Espectrometria de massas

A necessidade de ferramentas analíticas com alta sensibilidade que possam monitorar compostos em concentrações muito baixas faz com que métodos baseados em LC-MS sejam uma opção mais adequada (Sandín-España *et al.*, 2016).

A espectrometria de massas tem como princípio a geração de íons e sua separação de acordo com a razão massa/carga (m/z). Há uma variedade de técnicas de ionização usadas em espectrometria de massas. Um fator importante é a energia transferida durante o processo de ionização. Dependendo da quantidade de energia nesse processo, pode-se gerar uma extensa ou pouca fragmentação do íon precursor.

Técnicas de ionização como o impacto eletrônico (EI) promovem grande transferência de energia, o que gera extensa fragmentação, sendo esta opção útil para elucidação estrutural de analitos desconhecidos. Técnicas que utilizam menor transferência de energia são consideradas brandas e geram poucos fragmentos. Assim, a identificação do íon precursor é facilitada (Hoffmann, 2007). A ionização por electrospray (ESI) é considerada uma técnica branda que faz a transferência de íons em solução para a fase gasosa. Isso permite seu acoplamento com técnicas de cromatografia líquida (Gross, 2006).

A ionização por ESI ocorre à pressão atmosférica. Um campo elétrico, obtido através de uma diferença de potencial de 3-6 kV, é aplicado em um líquido que passa através de um tubo capilar a um fluxo baixo, geralmente de 1 a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Esse campo elétrico promove o acúmulo de cargas na superfície do líquido ao final do tubo capilar dando origem a gotículas altamente carregadas. As gotículas passam através de um gás inerte para remover as moléculas do solvente. Sob ação de um forte campo elétrico, a gota se alonga devido ao acúmulo de carga. Com o aumento da repulsão eletrostática, ocorre liberação de gotas menores (Hoffmann, 2007).

O grande benefício de ESI está na capacidade de gerar íons em fase gasosa diretamente da fase líquida, o que torna essa técnica apropriada para acoplar à cromatografia líquida. Além disso, a separação por cromatografia de moléculas em uma mistura complexa tem como benefício a possibilidade de reduzir uma possível supressão iônica (Want *et al.*, 2005).

A escolha do analisador de massas a ser utilizado é uma etapa importante para alcançar os objetivos. Para quantificação de analitos polares e pequenos, o analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) é considerado o mais adequado por oferecer boa sensibilidade e reprodutibilidade.

Um dos modos de operação desse tipo de analisador é o monitoramento de reação múltipla (MRM do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*). No QqQ três quadrupolos são dispostos em série. Cada um é composto de quatro hastes metálicas dispostas em paralelo conectadas eletricamente e submetidas a uma voltagem. O campo elétrico resultante possibilita que apenas determinados íons atravessem o quadrupolo. (Ho *et al.*, 2003)

O emprego da técnica MRM permite a detecção de íons específicos em amostras complexas. Nessa técnica, o íon precursor é selecionado no primeiro

quadrupolo (Q1), fragmentado no segundo quadrupolo (q) a partir da colisão com um gás inerte, geralmente argônio, e os fragmentos gerados são direcionados para o terceiro quadrupolo (Q3) até serem detectados (Figura 3). Maior seletividade é obtida utilizando o sistema QqQ quando comparado a técnicas que utilizam um único quadrupolo (Putri e Fukusaki, 2014).

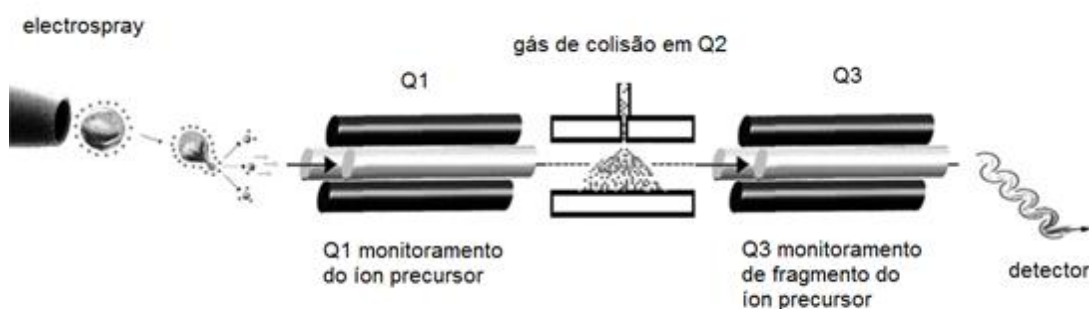


Figura 3. Esquema do monitoramento de reação múltipla (MRM) com triplo quadrupolo (adaptado de Want *et al.* 2005).

O acoplamento a técnicas de separação como a cromatografia líquida (LC) traz benefícios ao facilitar a identificação e quantificação de analitos de interesse em matrizes complexas, além de promover a separação dos compostos antes da detecção (Xiao *et al.*, 2012).

Embora fique evidente o grande potencial das técnicas de LC-MS, nota-se ainda certa carência de metodologias que utilizam UHPLC-MS para analisar de forma simultânea e rápida os compostos produzidos por processos biotecnológicos.

Assim, nesse trabalho foram abordadas as técnicas de UHPLC-PDA para análises de rotina de ácidos orgânicos provenientes de processos biotecnológicos e em condições já pré-otimizadas, além do uso da técnica de UHPLC-MS para auxiliar a seleção ou triagem de microrganismos com potencial para produzirem polióis e ácidos orgânicos, ainda na fase de triagem de bancos e/ou otimização das etapas de bioconversão.

Validação do método analítico

A validação compreende um processo de garantia da qualidade das medições químicas de modo que sejam gerados dados confiáveis. Diferentes guias fornecem as diretrizes para realização da validação, tais como: ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), EURACHEM, ICH (International Conference on Harmonization), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), USP (United States Pharmacopeia) (RIBANI *et al.*, 2004; ICH Guideline, 2005). Na etapa de validação dos protocolos analíticos desenvolvidos neste trabalho foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi desenvolver métodos analíticos baseados em cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-PDA) e cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS) para detectar e quantificar compostos químicos-alvo produzidos a partir da bioconversão de glicerina.

Objetivos específicos

1: Desenvolver método analítico baseado em UHPLC-PDA para quantificar os compostos-alvo (ácidos orgânicos): ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido xilônico;

2: Validar o método UHPLC-PDA desenvolvido;

3: Desenvolver método analítico baseado em UHPLC-MS para ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido xilônico) e polióis C4 (eritritol e treitol), C5 (arabitol, ribitol, xilitol), C6 (dulcitol, iditol, manitol, sorbitol) e C7 (volemitol);

4: Aplicar as metodologias desenvolvidas para detectar e quantificar compostos-alvo em amostras de glicerina após a bioconversão por microrganismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Neste estudo foram utilizados os padrões analíticos de ácidos orgânicos e polióis listados abaixo:

- Ácido cítrico, pureza $\geq 99,5\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido fumárico, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido L-glicérico, pureza $\geq 95,0\%$ Sigma-aldrich;
- Ácido kójico, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido láctico, pureza $\geq 85,0\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido mucônico, pureza $\geq 98,0\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido oxálico, pureza $\geq 99,0\%$ Sigma-aldrich;
- Ácido propiônico, pureza $\geq 99,8\%$, Sigma-aldrich;
- Ácido succínico, pureza $\geq 99,0\%$ Sigma-aldrich;
- Ácido xilônico, pureza $\geq 97,0\%$, Carbosynth;
- Arabitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Dulcitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Eritritol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Fucitol, pureza $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Iditol, pureza $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Manitol, pureza $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Ribitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Sorbitol, pureza $\geq 97,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Treitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Volemitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich;
- Xilitol, pureza $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich.

Os solventes e reagentes utilizados no preparo de soluções para a realização dos experimentos foram:

- Acetato de amônio grau LC-MS, Lichropur;
- Acetonitrila grau LC-MS, pureza $\geq 99,9\%$, Lichrosolv;
- Ácido fórmico grau LC-MS, pureza $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich;
- Ácido fosfórico, pureza 85% , Vetec;
- Fosfato Monobásico de Potássio, pureza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich;
- Isopropanol grau HPLC, pureza $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich;
- Metanol grau HPLC, pureza $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich;
- Metanol grau LC-MS, pureza $\geq 99,9\%$, Lichrosolv.

As soluções estoque de cada analito foram preparadas a partir da pesagem dos padrões dos ácidos orgânicos e polióis em balança analítica (AB 265-S/FACTDU, Mettler Toledo) e diluídos em água ultrapura (Milli-Q). As soluções estoque do ácido fumárico e do ácido mucônico foram diluídos em solução contendo metanol e água ultrapura na proporção 80:20 (v:v), definida experimentalmente.

O preparo da solução tampão utilizada na fase móvel para o método UHPLC-PDA envolveu a dissolução de 1,36 g de fosfato de potássio (KH_2PO_4), pesado em balança semi-analítica UX620H (Shimadzu®), em 1000 mL de água ultrapura (Mill-Q). O pH foi ajustado com ácido fosfórico, e para verificar o pH da solução foi utilizado o peagâmetro modelo 827 pH lab (Methohm®), previamente calibrado. Após o preparo, a solução tampão foi levada ao ultrassom por 15 min para a completa dissolução dos reagentes.

Métodos analíticos

UHPLC-PDA

A técnica de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos (UHPLC-PDA) foi utilizada inicialmente na etapa de desenvolvimento do método cromatográfico que realizou a distinção dos dez ácidos orgânicos avaliados nesse estudo (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido propiônico, ácido succínico e ácido xilônico), bem como na possibilidade de avaliação destes analitos em amostras reais de glicerina e/ou xilose/glicerina bioconvertidas por leveduras e fungos filamentosos.

As análises foram realizadas utilizando um UHPLC (modelo Acquity H-class, Waters) que consiste em um sistema de bombeamento quaternário de solventes, um desgaseificador a vácuo, um forno de coluna equipado com pré-aquecedor de solvente (pre-heater) e detector de arranjos de fotodiodos (PDA), todos controlados pelo software Empower 3 (Waters).

Diferentes condições analíticas foram testadas a fim de se obter separação e a melhor resolução cromatográfica para todos os ácidos orgânicos no menor tempo de análise possível. Foram avaliados, de forma unidimensional, diferentes valores de pH, vazão e composição da fase móvel, modo de eluição e temperatura da coluna. Duas colunas de fase reversa foram testadas: coluna C18 HSS T3 com dimensões 2,1 x 150 mm, 1,8 μm (Waters) e coluna BEH C8 com dimensões 2,1 x 150 mm, 1,7 μm (Waters). A fase móvel (FM) foi composta pelos solventes: A) Tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) pH 2,0 e B) Metanol. Os cromatogramas foram obtidos na faixa do UV (200 – 400 nm) e extraídos em dois comprimentos de onda específicos: 210 e 260 nm, os quais foram exclusivamente empregados na etapa de quantificação.

A condição de eluição otimizada foi realizada com a seguinte rampa da FM: isocrática de 0 a 1,5 min (100% A), gradiente linear de 1,5 a 5 min (100-95% A), gradiente linear de 5 a 8 min (95-75% A), isocrática de 8 a 9 (75% A) e isocrático de 9 a 15 min (100% A) para equilibrar a coluna antes da próxima injeção. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C. Todos os compostos eluíram em 10 min.

Validação de método analítico

Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da construção de curvas analíticas. Diante das distintas polaridades e absorvidade dos analitos, diferentes soluções estoque foram preparadas para viabilizar a construção das curvas analíticas.

Solução Estoque 1: composta pela mistura de ácido fumárico 400 $\mu\text{g/mL}$ e ácido mucônico 200 $\mu\text{g/mL}$. Esses padrões foram diluídos para a concentração final usando metanol/água (8:2, v/v) como solvente de diluição. Os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições dessa solução estoque.

Solução Estoque 2: composta pela mistura de ácido cítrico 6,00 mg/mL , ácido láctico 6,00 mg/mL e ácido oxálico 1,00 mg/mL . Esses padrões foram diluídos

para a concentração final usando água Milli-Q ultrapura como solvente de diluição. Os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições dessa solução estoque.

Solução Estoque 3: composta pela mistura de ácido kójico 600 µg/mL, ácido propiônico 6,00 mg/mL, ácido succínico 6,00 mg/mL e ácido xilônico 6,00 mg/mL. Esses padrões foram diluídos para a concentração final usando água Milli-Q ultrapura como solvente de diluição. Os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições dessa solução estoque.

Solução Estoque 4: composta por ácido glicérico 10,00 mg/mL. Esse padrão foi diluído usando água Milli-Q ultrapura como solvente de diluição. Os pontos da curva foram obtidos a partir de diluições dessa solução estoque.

A concentração das soluções-padrão utilizadas na obtenção de cada nível das curvas analíticas está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações das soluções utilizadas no ensaio de linearidade para obtenção das curvas analíticas.

Composto	Nível	Concentração (µg/mL)
Ácido fumárico	6	0,10; 0,20; 0,55; 1,10; 2,75; 5,50
Ácido mucônico	7	0,09; 0,13; 0,26; 1,30; 5,19; 10,38; 25,94
Ácido cítrico	9	37,60; 75,20; 150,41; 376,02; 752,04; 1504,08; 3008,16; 4512,24; 6016,32
Ácido láctico	9	37,91; 75,83; 151,65; 379,13; 758,27; 1516,54; 3033,07; 4549,61; 6066,14
Ácido oxálico	9	1,52; 3,05; 7,62; 15,24; 30,48; 76,21; 152,42; 304,84; 609,68
Ácido kójico	9	0,23; 0,75; 1,51; 3,02; 7,55; 15,09; 30,18; 75,45; 150,90
Ácido propiônico	7	30,03; 75,07; 150,14; 300,28; 750,71; 1501,42; 3002,83
Ácido succínico	6	30,05; 150,24; 751,20; 1502,40; 3004,80; 4507,20
Ácido xilônico	7	26,80; 66,99; 133,98; 267,95; 669,89; 1339,77; 2679,55
Ácido glicérico	7	50,87; 183,15; 381,56; 763,13; 1526,25; 3052,50; 4578,75

Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram obtidos com base na relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente (Ribani *et al.*, 2004).

Realizaram-se diluições sucessivas de soluções padrões até serem obtidos valores de concentração com relação sinal ≥ 3 para LOD e ≥ 10 para LOQ.

Precisão

A precisão foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada a partir da análise de soluções de três concentrações diferentes e em relação à faixa de calibração: baixa, média e alta. Cada solução foi preparada em triplicata sendo injetada uma vez cada. As análises foram realizadas em três períodos do dia e as soluções preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque a cada período de análise. Ao final foram obtidas nove soluções de mesma concentração analisadas no mesmo dia (intra-dia) e pelo mesmo analista (Ribani *et al.*, 2004).

A precisão intermediária (inter-dia) foi avaliada a partir da análise de soluções de três concentrações diferentes e em relação a faixa de calibração: baixa, média e alta. Cada solução foi preparada em triplicata sendo injetada uma vez cada. As análises foram realizadas em três períodos do dia e as soluções preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque a cada período de análise. Esse procedimento foi realizado durante três dias consecutivos. Ao final foram obtidas vinte e sete soluções de mesma concentração analisadas em três dias (inter-dia) e preparadas pelo mesmo analista (Ribani *et al.*, 2004). No primeiro dia de análise foram preparadas as soluções-estoque dos ácidos orgânicos que foram utilizadas para preparo das soluções nos três níveis de concentração para os três dias de análise.

As soluções foram analisadas por UHPLC-PDA e os dados obtidos avaliados através do cálculo do coeficiente de variação (CV) ou desvio-padrão relativo (RSD/DPR) das replicatas (Equação 1):

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

em que SD corresponde ao desvio padrão e $\overline{X}$ é a concentração média das concentrações experimentais calculadas a partir das equações de regressão linear.

Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais, obtidos pelo método em estudo, em relação a um valor aceito como verdadeiro. Esse parâmetro foi avaliado a partir da análise de soluções em três níveis de concentração e de acordo com a faixa de trabalho das curvas analíticas de cada ácido orgânico (Ribani *et al.*, 2004).

Foram realizados ensaios de recuperação em que se adicionou o padrão analítico a uma amostra branco de bioconversão (fortificação) e o valor encontrado na análise (concentração observada) foi comparado com o valor adicionado à amostra (concentração teórica). Para o cálculo da concentração experimental foram utilizadas as curvas analíticas do respectivo composto. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra conforme mostrado pela equação 2 (Ribani *et al.*, 2004).

Para cada nível de concentração foram calculados os valores de concentração média experimental, desvio padrão e coeficiente de variação. Para cálculo do coeficiente de variação foi utilizada a usada a equação 1.

A exatidão das concentrações calculadas foi obtida a partir da equação 2:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração observada}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

UHPLC-MS

Os experimentos de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência, acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-MS), foram realizados no espectrômetro de massas (modelo Acquity Xevo TQD, Waters) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (QqQ, TQD,

Waters). Os dados espectrais foram obtidos e processados pelo software Masslynx 4.1 (Waters).

Os parâmetros instrumentais do espectrômetro de massas (voltagem do capilar e energia do cone) foram otimizados a partir da técnica de infusão direta por espectrometria de massas (DIMS – do inglês, *Direct Infusion Mass Spectrometry*). O experimento de espectrometria de massas tandem (MS/MS) foi realizado para otimização dos valores de energia de colisão, necessária para fragmentar o íon precursor e gerar os íons fragmentos. Para isso, foram analisadas soluções individuais e soluções contendo a mistura dos padrões dos ácidos orgânicos na concentração de 10 µg/mL. A FM utilizada foi composta de 50% de H₂O com 0,2% de AF e 50% de MeOH.

Para os polióis foram utilizadas soluções individuais e soluções contendo a mistura dos padrões na concentração de 25 µg/mL. A fase móvel empregada na análise de polióis foi composta de 80% H₂O com 0,1% de AF e 20% ACN com 0,1% de AF. As soluções estoque dos padrões de polióis foram preparadas utilizando água Milli-Q ultrapura para solubilizar os padrões. Diluições das soluções estoque foram realizadas com a mistura de ACN:H₂O 80:20 (v:v). Para correta identificação de cada analito foram calculados os valores nominais das massas protonadas [M+H]⁺, desprotonada [M-H]⁻ e com aduto de sódio [M+Na]⁺ (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Valor nominal das massas: monoisotópica, protonada [M+H]⁺, desprotonada [M-H]⁻ e com aduto de sódio [M+Na]⁺ para os ácidos orgânicos estudados.

Composto	Massa monoisotópica	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻
Ácido cítrico	192,0270	193	215	191
Ácido fumárico	116,0110	117	139	115
Ácido glicérico	106,0266	107	129	105
Ácido kójico	142,0266	143	165	141
Ácido láctico	90,0317	91	113	89
Ácido mucônico	142,0266	143	165	141
Ácido oxálico	89,9953	91	112	88
Ácido propiônico	74,0368	75	97	73
Ácido succínico	118,0266	119	141	117
Ácido xilônico	166,0477	167	189	165

Tabela 3. Valor nominal das massas: monoisotópica, protonada $[M+H]^+$, desprotonada $[M-H]^-$ e com aduto de sódio $[M+Na]^+$ para os polióis estudados.

Composto	Massa monoisotópica	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$
Treitol	122,0579	123	145	121
Eritritol	122,0579	123	145	121
Ribitol	152,0685	153	175	151
Xilitol	152,0685	153	175	151
Arabitol	152,0685	153	175	151
Iditol	182,0790	183	205	181
Sorbitol	182,0790	183	205	181
Manitol	182,0790	183	205	181
Dulcitol	182,0790	183	205	181
Fucitol	166,0896	167	189	165
Volemitol	212,0896	213	235	211

Foram utilizados os modos de ionização positivo (ESI(+)-MS) e negativo (ESI(-)-MS) com os seguintes parâmetros instrumentais: voltagem do capilar: 3,0 V (para ácidos orgânicos) e 3,5 V (para polióis), temperatura de solvatação: 400°C (para ácidos orgânicos) e 350°C (para polióis), temperatura da fonte: 150°C, vazão do gás do cone: 20 L/h e vazão do gás de solvatação: 700 L/h.

Para separação cromatográfica dos 10 ácidos orgânicos nos experimentos de UHPLC-MS, foram utilizadas duas colunas cromatográficas. Inicialmente, utilizou-se a coluna HSS T3 (Waters) e o método de eluição em gradiente proposto pelo método UHPLC-PDA à temperatura de 30°C e utilizando a fase móvel A) H₂O com 0,2% de ácido fórmico e B) Metanol a uma vazão de 0,3 mL/min. Em um segundo momento, foi testada a coluna cromatográfica SeQuant ZIC HILIC (2,1 x 100; 3,5 µm), utilizando a fase móvel A) 90% ACN, 10% H₂O com acetato de amônio 10 mM e B) 40% ACN, 60% H₂O com acetato de amônio 10 mM; temperatura do forno de coluna 35°C.

Para separação cromatográfica dos polióis avaliados nesse estudo (glicerina, arabitol, dulcitol, eritritol, iditol, manitol, ribitol, sorbitol, treitol, volemitol e xilitol) foi utilizado como base o protocolo desenvolvido previamente pelo grupo (Fontes *et al.*, 2016 b), o qual é capaz de monitorar 11 polióis por HILIC-UHPLC-ELSD. Foi realizada uma modificação na composição da fase móvel para se adequar às análises

por espectrometria de massas e preservar o instrumento, de modo a utilizar ácido fórmico ao invés de TFA como modificador. A coluna empregada nessa separação foi a mesma proposta no estudo de Fontes e colaboradores (2016 b), coluna BEH Amida com dimensões 2,1 x 150 mm, 1,7 μ m (Waters), utilizada para retenção de compostos mais polares, e a fase móvel A) H₂O com 0,1% de AF e B) ACN com 0,1% AF, a uma vazão de 0,3 mL/min. Para alcançar a seletividade de separação de todos os 11 polióis, duas condições de separação foram necessárias. A primeira emprega gradiente de separação a 30°C e a segunda condição a 73°C, o que viabiliza a correta identificação de todos os isômeros de polióis.

Amostras de bioconversão

As amostras analisadas empregando os métodos desenvolvidos foram fornecidas pelo Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB) e pelo Laboratório de Processos Bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia. As amostras foram geradas por processos de bioconversão de glicerina e/ou glicerina/xilose por leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Os dados referentes aos microrganismos e às condições reacionais dos processos de bioconversão são protegidos.

Foram analisadas amostras obtidas por bioconversão de diferentes tipos de glicerina denominadas Glicerina Industrial 1, Glicerina Industrial 2 e Glicerina Industrial 3. As amostras utilizadas no processo de obtenção dos analitos foram codificadas e são mostrados na Tabela 4, juntamente com a concentração da fonte de carbono empregada.

Tabela 4. Códigos das amostras utilizadas nos processos de bioconversão e concentração da fonte de carbono utilizada.

Microrganismo	Código das amostras	Composto-alvo	Fonte de carbono
Fungos filamentosos	LQB-001 LQB-002 LQB-003 LQB-004	Ácido cítrico	30 g/L de glicerina
Bactéria	LQB-005 LQB-006 LQB-007 LQB-008 LQB-009 LQB-010 LQB-011 LQB-012 LQB-013 LQB-014 LQB-015 LQB-016 LQB-017	Ácido láctico	40 g/L de glicerina
Leveduras	LQB-018 LQB-019	Ácido xilônico	10 g/L de glicerina e 40 g/L de xilose
Fungos filamentosos	LQB-020 LQB-021	Ácido kójico	60 g/L de glicerina
Fungos filamentosos	LQB-022 LQB-023 LQB-024	Polióis C4, C5, C6	40 g/L de glicerina

CAPÍTULO 1:

Desenvolvimento de método analítico por UHPLC-PDA

A análise de compostos polares por fase reversa é um desafio, uma vez que eles são fracamente retidos. Devido à sua alta polaridade, esses compostos podem eluir no volume morto e a separação pode ser de difícil alcance (Boháčová *et al.*, 2016; Petucci *et al.*, 2016; Sandín-España *et al.*, 2016). O método UHPLC-PDA, proposto para a separação de 10 ácidos orgânicos nesse estudo, foi desenvolvido utilizando uma coluna C18 HSS T3, pois essa foi projetada para reter e separar compostos polares em fase reversa (Waters Corporation, 2007). Outras colunas como a Atlantis (do mesmo fabricante) são mais indicadas para a retenção de compostos polares. No entanto, elas têm diâmetros de partícula $\geq 5\mu\text{m}$, não sendo adequadas para o desenvolvimento de métodos rápidos de UHPLC (Guo e Gaiki, 2005).

Entre os compostos estudados, há características muito distintas tais como diferentes pK_a 's e polaridades. O ácido oxálico é um composto de alta polaridade e muitas vezes não é incluído nas análises de ácidos orgânicos por cromatografia em fase reversa (Sandín-España *et al.*, 2016). Já o ácido mucônico é um composto menos polar, o que demonstra a diversidade de propriedades dos compostos selecionados para esse estudo.

Diferentes parâmetros foram avaliados, de maneira univariada, para avaliar esses compostos cromatograficamente, incluindo: pH, vazão da fase móvel, temperatura da coluna e modo de eluição. O tempo de retenção, resolução e número de pratos teóricos foram considerados na seleção da melhor condição. Diferentes composições da fase móvel foram testadas, inicialmente utilizando modo isocrático, e posteriormente, modo gradiente. Para otimização da fase móvel, utilizou-se como

condição inicial o modo isocrático e fase móvel composta por tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10 mM e MeOH 98:2, além de temperatura de 30°C para fase estacionária e vazão a 0,4 mL/min.

Escolha do pH da fase móvel

O pH da fase móvel desempenha papel importante na separação cromatográfica. O controle desse parâmetro visa o deslocamento do equilíbrio químico dos analitos ácidos de modo a favorecer a ocorrência de espécies em uma única forma (Gupta *et al.*, 2012). Assim, foi verificada a influência do valor do pH da solução aquosa na separação, afim de evitar a duplicação das bandas cromatográficas geradas pelas formas dissociada e não dissociada dos compostos ácidos.

Inicialmente, a demanda do trabalho era o monitoramento de cinco ácidos orgânicos que foram apontados com potencial de serem produzidos pelos processos de bioconversão: ácido cítrico, ácido glicérico, ácido lático, ácido oxálico e ácido succínico. Para otimização do pH da fase móvel utilizou-se a condição inicial de eluição no modo isocrático, com fase móvel composta por tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10 mM e MeOH 98:2, além de temperatura de 30°C da fase estacionária e vazão a 0,4 mL/min.

Nessa avaliação foram analisados pH's na faixa de 2,0-3,5 (Figura 4). Como modificador de fase móvel utilizou-se tampão KH_2PO_4 10 mM acidificado com ácido fosfórico. Foram avaliados os parâmetros de fator de simetria do pico, número de pratos teóricos e tempo de retenção. Observou-se alargamento de pico dos analitos à medida que o pH aumentava e a melhor resposta cromatográfica foi alcançada empregando pH 2,0.

Valores de pH inferiores a 2,0 não foram avaliados por estarem fora da faixa de pH inferior recomendada para uso da coluna. A Figura 4 mostra os resultados obtidos para os parâmetros avaliados.

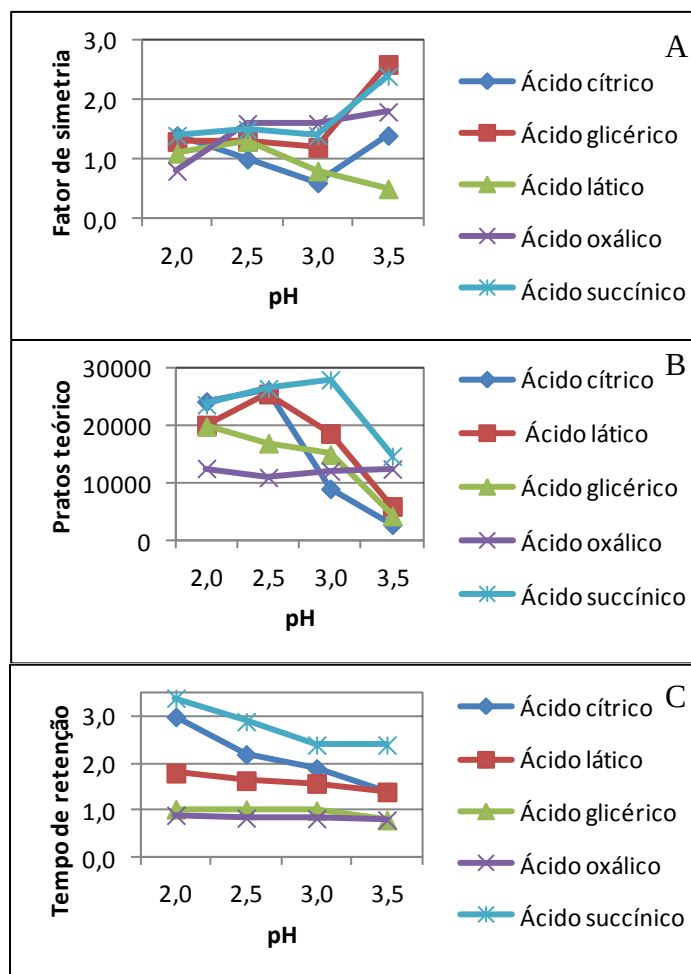


Figura 4. Influência do pH da fase móvel nos parâmetros cromatográficos: A) fator de simetria, B) número de pratos teóricos e C) tempo de retenção.

O controle adequado do pH da fase móvel é importante para a obtenção de picos simétricos. Quando em solução, ácidos carboxílicos sofrem dissociação formando o ânion carboxilato e próton H^+ , sendo que as formas dissociada e não dissociada coexistem em equilíbrio químico. A acidificação da fase móvel desloca o equilíbrio favorecendo a presença do ácido carboxílico em sua forma não dissociada.

O valor de pH escolhido traz benefícios ao evitar a formação de diferentes espécies carregadas que promovem o aparecimento de picos cromatográficos, em contrapartida, pode reduzir o tempo de vida útil da coluna por está no limite inferior recomendado. A Figura 5 ilustra o aparecimento de diferentes espécies em diferentes valores de pH para o ácido glicérico e ácido cítrico.

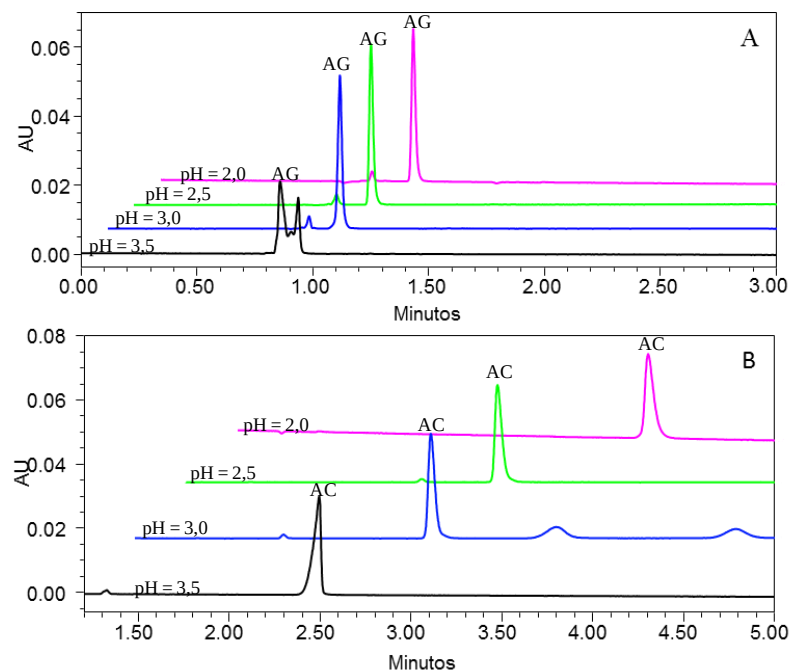


Figura 5. Cromatogramas adquiridos em 210 nm ilustrando o efeito da variação do pH da fase móvel na faixa de 2,0 – 3,5 para o ácido glicérico (A) e ácido cítrico (B) utilizando sistema de eluição isocrático.

Além da simetria do pico, o tempo de retenção também é um fator dependente do pH da fase móvel. Verificou-se que com aumento da acidez da fase móvel houve aumento retenção dos ácidos orgânicos estudados. Esta diminuição na retenção ocorre pelo aumento do grau de dissociação dos analitos à medida que o pH aumenta.

O valor de pH escolhido trouxe benefícios para análise do ácido oxálico, o qual corresponde ao composto mais polar e primeiro a ser eluído pelo método proposto. O uso do pH 2,0 trouxe ligeiro aumento do tempo de retenção, que auxilia na retenção desse composto (Figura 6).

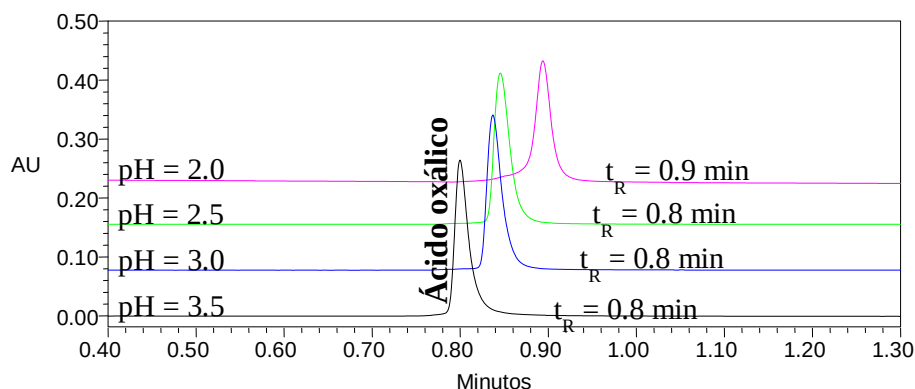


Figura 6. Efeito do pH no tempo de retenção do ácido oxálico utilizando sistema de eluição isocrático.

A coluna HSS T3 utilizada possui partículas de sílica de alta resistência com uma proteção, patenteada pela Waters, que possibilita o uso de baixos valores de pH na FM (Waters Corporation, 2007).

O método de eluição isocrática desenvolvido inicialmente utilizando como fase móvel tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10 mM, pH 2,0 e MeOH foi capaz de resolver simultaneamente o ácido cítrico, ácido glicérico, ácido láctico, ácido oxálico e ácido succínico com o último composto sendo eluído em menos de 5 min (Figura 7).

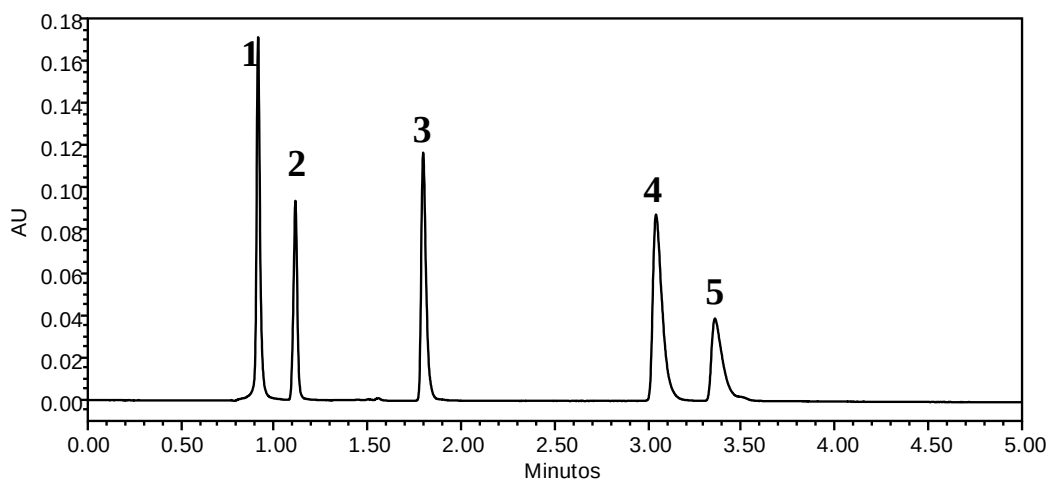


Figura 7. Separação cromatográfica obtida do ácido oxálico t_R 0,91 (1), ácido glicérico t_R 1,11 (2), ácido láctico t_R 1,80 (3), ácido cítrico t_R 3,04 (4), e ácido succínico t_R 3,36 (5), utilizando eluição isocrática com tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4) 10 mM pH 2,0 e MeOH 98:2, forno de coluna a 30°C e vazão a 0,4 mL/min. Cromatogramas adquiridos em 210 nm.

Gradiente de eluição

Com a possibilidade de produção biotecnológica de outros ácidos orgânicos: ácido fumárico, ácido kójico, ácido propiônico, ácido mucônico e ácido xilônico, tornou-se necessário trabalhar com modo gradiente de eluição para aumentar o número de analitos avaliados pela metodologia.

O ácido fumárico e o ácido mucônico se mostraram pouco solúveis em água. Dessa maneira, foi realizado um estudo para definir a mistura de solventes adequada para solubilizar esses compostos. Foram avaliadas as proporções da mistura Metanol:Água nas proporções de 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 (v/v), sendo que a proporção mais adequada foi a mistura de Metanol:Água 80:20 (v/v).

Com o aumento do número de analitos a serem avaliados e para garantir seletividade de separação de todos, tendo em vista que o modo isocrático estudado não permitiu a eluição do ácido mucônico, optou-se por empregar a eluição em modo gradiente.

Dentre o conjunto de ácidos orgânicos estudados notou-se que enquanto o ácido oxálico, ácido xilônico e ácido glicérico necessitam de solvente com menor força de eluição, o ácido mucônico requer solvente com maior de força de eluição. Por ser o analito menos polar, devido à maior cadeia carbônica em sua estrutura (Figura 1), o ácido mucônico interage mais fortemente com a fase estacionária C18 que os demais analitos. Já o ácido oxálico, ácido xilônico e ácido glicérico, por serem compostos mais polares, tendem a interagir fracamente com a fase estacionária C18 e eluem rapidamente da coluna.

Para aumentar a separação entre esses compostos e aumentar o tempo de interação com a coluna, optou-se por iniciar o método de eluição no modo isocrático utilizando 100% da fase aquosa. Nesse sentido, diferentes configurações do gradiente de eluição foram investigadas.

A utilização de uma rampa de gradiente chegando a 15% de metanol viabilizou a eluição do ácido mucônico. A Figura 8 mostra os cromatogramas do ácido xilônico, ácido fumárico, ácido propiônico e ácido mucônico obtidos nessa primeira condição utilizando vazão de 0,3 mL/min. A rampa de gradiente alcançando 5% de metanol em 5 min foi inserida para que houvesse uma maior separação entre os ácidos fumárico e succínico.

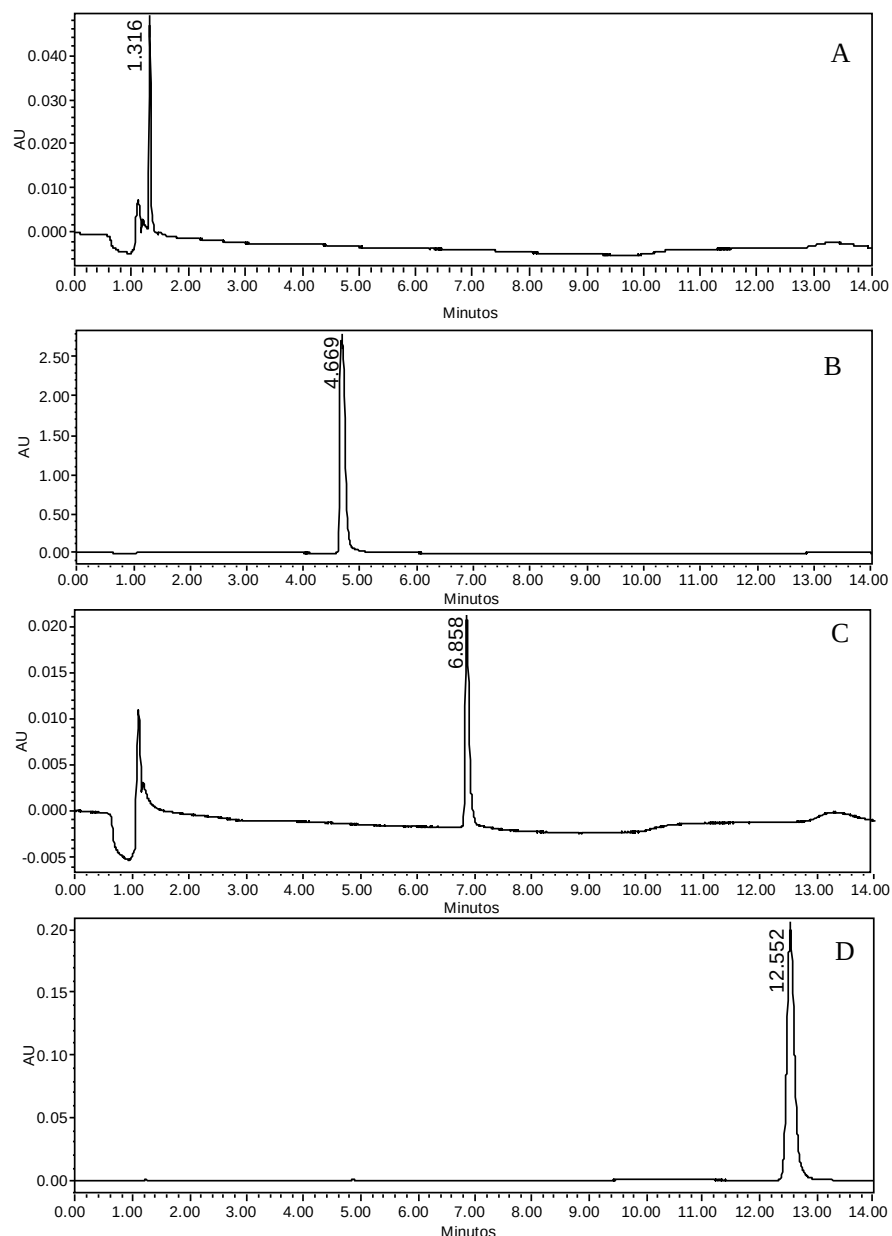


Figura 8. Cromatogramas individuais para o ácido xilônico (A), ácido fumárico (B) e ácido propiônico (C) adquiridos em 210 nm e ácido mucônico (D) adquirido em 260 nm, obtidos nas condições de eluição em gradiente chegando a 15% de MeOH.

Foi avaliada a utilização da coluna C8 2,1 x 150 mm; 1,7 μ m, a qual apresenta grupo hidrofóbico mais curto, podendo favorecer a retenção de compostos polares. Foram usadas as mesmas condições de eluição já utilizadas com a coluna C18 HSS T3 para a C8, ou seja, condições de alta concentração de solvente aquoso, permitindo assim a comparação e verificação de seletividade na separação.

Apesar de terem sido obtidos benefícios para separação do ácido fumárico e do ácido succínico, o uso da coluna BEH C8 promoveu menor retenção dos compostos. Além disso, houve coeluição total dos primeiros dois compostos eluídos: ácido oxálico e ácido xilônico. A Figura 9 mostra os cromatogramas obtidos com a coeluição total do ácido oxálico e do ácido xilônico com $t_R = 1,35$ min (A), e os cromatogramas para o ácido fumárico com $t_R = 3,28$ min (B), e para ácido succínico com $t_R = 3,72$ min (C).

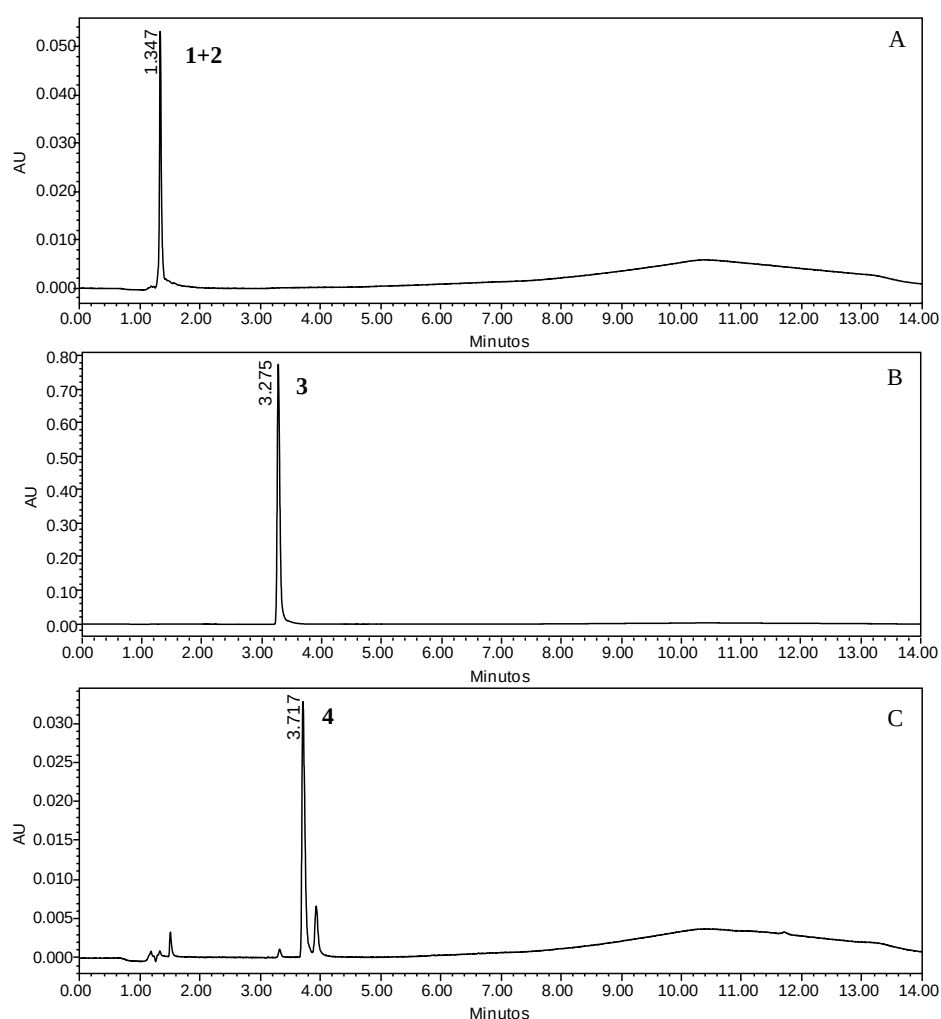


Figura 9. Cromatogramas obtidos a partir da utilização da coluna C8 mostrando piora na separação cromatográfica com coeluição total do ácido oxálico (1) e do ácido xilônico (2) (A), e melhora na separação entre o ácido fumárico (B) e ácido succínico (C). Os cromatogramas foram adquiridos em 210 nm.

O fato dos analitos estarem com o equilíbrio químico deslocado para a forma não dissociada faz com que a interação da cadeia carbônica seja mais efetiva que a do grupo ácido, por essa razão o uso de uma fase estacionária menos hidrofóbica (C8) promove menor interação dos ácidos orgânicos com a coluna C8. Assim, a coluna C18 HSS T3 demonstrou ser a melhor opção de fase reversa a ser utilizada.

Para resolver a baixa capacidade de retenção dos ácidos orgânicos mais polares foi avaliado também o uso de um trecho isocrático com 100% da fase aquosa tamponada sobre a separação. Duas condições com início isocrático com duração de 0,5 e 1,5 min, respectivamente, foram comparadas na vazão de 0,4 mL/min.

Observou-se melhora na resolução (R_s) entre o ácido succínico e o ácido fumárico passando de $R_s = 0,6$ (primeira condição), para $R_s = 0,9$ (segunda condição). Esse parâmetro mede a separação entre dois picos e valores mais elevados indicam uma melhor separação fornecendo evidência para utilização do trecho isocrático até 1,5 min na curva do gradiente (Collins *et al.*, 2006).

Houve ligeiro aumento na resolução entre o ácido xilônico e o ácido glicérico passando de $R_s = 3,8$ para $R_s = 3,9$ na condição de início isocrático até 0,5 min e na condição de início isocrático até 1,5 min respectivamente. Não houve alteração na resolução entre o ácido oxálico e ácido xilônico mantendo-se em $R_s = 1,5$ nas duas condições. Assim, optou-se por trabalhar com o método com início isocrático até 1,5 minutos. As Figuras 10 e 11 mostram os cromatogramas obtidos.

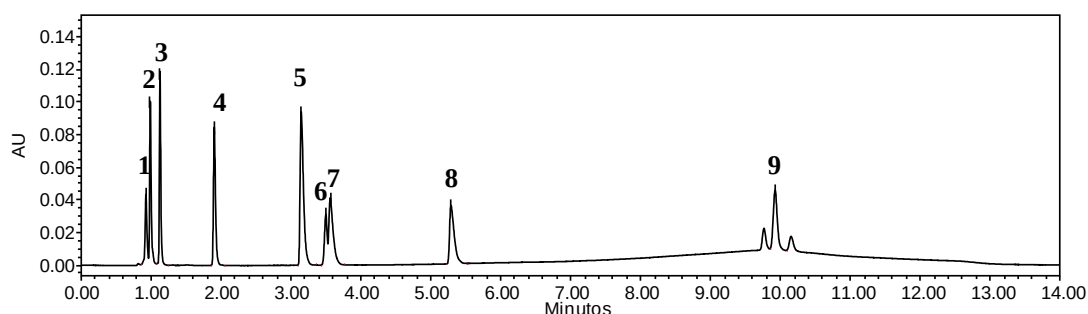


Figura 10. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 0,928 (1), ácido xilônico t_R 0,990 (2), ácido glicérico t_R 1,129 (3), ácido láctico t_R 1,905 (4), ácido cítrico t_R 3,150 (5), ácido fumárico t_R 3,501 (6), ácido succínico t_R 3,564 (7), ácido propiônico t_R 5,292 (8), ácido mucônico t_R 9,930 (9) adquiridos em 210 nm na condição de eluição com início isocrático até 0,5 min.

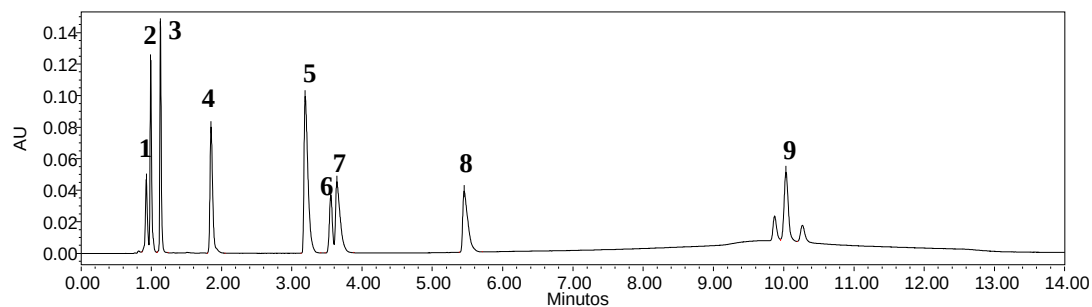


Figura 11. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 0,928 (1), ácido xilônico t_R 0,991 (2), ácido glicérico t_R 1,130 (3), ácido láctico t_R 1,850 (4), ácido cítrico t_R 3,191 (5), ácido fumárico t_R 3,555 (6), ácido succínico t_R 3,640 (7), ácido propiônico t_R 5,452 (8), ácido mucônico t_R 10,034 (9) adquiridos em 210 nm na condição de eluição com início isocrático até 1,5 min.

Vazão de fase móvel

A vazão da fase móvel foi avaliada nas razões de 0,3 e 0,4 mL/min a partir da análise dos padrões de ácidos orgânicos. Comparando o comportamento de alguns analitos com a variação da vazão, ficou demonstrado aumento da resolução entre os ácidos xilônico e glicérico de $R_s = 3,9$ para $R_s = 4,2$ com 0,4 e 0,3 mL/min respectivamente. Um ligeiro aumento na resolução entre os ácidos oxálico e xilônico de $R_s = 1,5$ para $R_s = 1,6$ foi observado com diminuição da vazão de 0,4 para 0,3 mL/min respectivamente. As Figuras 12 e 13 mostram os cromatogramas obtidos a partir dessa comparação.

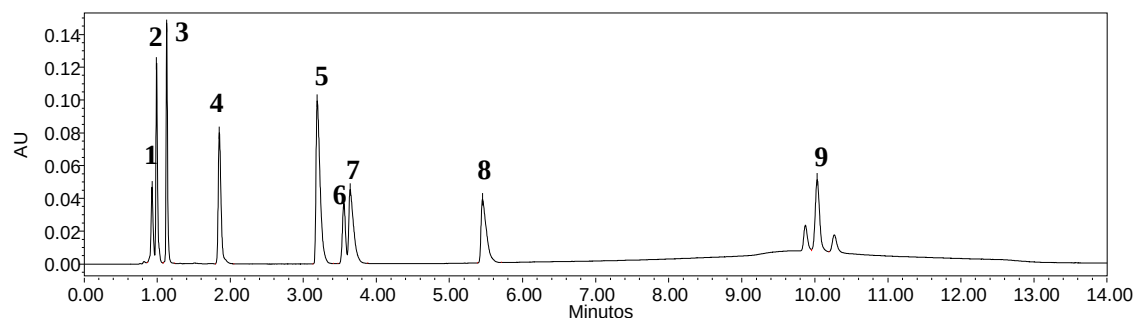


Figura 12. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 0,928 (1), ácido xilônico t_R 0,991 (2), ácido glicérico t_R 1,130 (3), ácido láctico t_R 1,850 (4), ácido cítrico t_R 3,191 (5), ácido fumárico t_R 3,555 (6), ácido succínico t_R 3,640 (7), ácido propiônico t_R 5,452 (8), ácido mucônico t_R 10,034 (9) adquiridos em 210 nm na condição de fluxo a 0,4 mL/min.

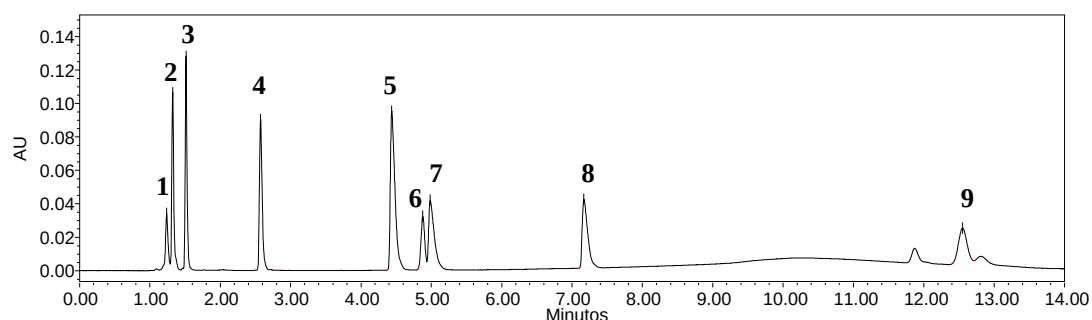


Figura 13. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 1,238 (1), ácido xilônico t_R 1,322 (2), ácido glicérico t_R 1,513 (3), ácido láctico t_R 2,572 (4), ácido cítrico t_R 4,437 (5), ácido fumárico t_R 4,879 (6), ácido succínico t_R 4,984 (7), ácido propiônico t_R 7,168 (8), ácido mucônico t_R 12,548 (10) adquiridos em 210 nm na condição de fluxo a 0,3 mL/min.

A redução da vazão para 0,3 mL/min trouxe benefícios na resolução dos compostos mais polares, entretanto houve alargamento do pico do ácido mucônico (Figura 14.A). Para obtenção de um pico mais simétrico para esse composto, alterou-se a porcentagem de solvente orgânico de 15% para 25%. A Figura 14 mostra os cromatogramas obtidos nas duas condições, adquiridos em 260 nm. Como o comprimento de onda 210 nm não é o ideal para o ácido mucônico, os

cromatogramas foram adquiridos em 260 nm, que promove maior absorção para o ácido mucônico.

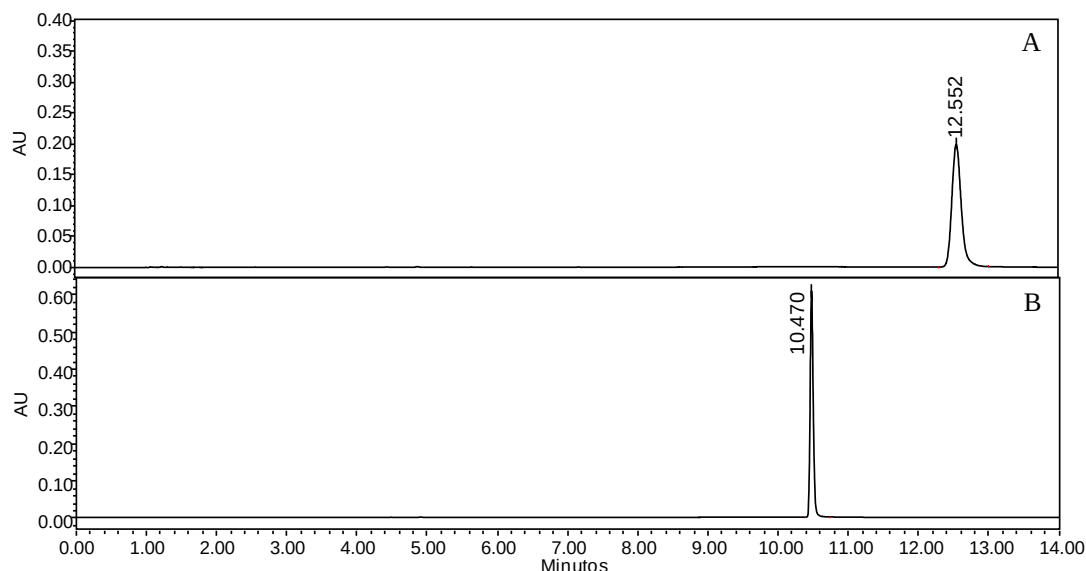


Figura 14. Comparação dos cromatogramas de ácido mucônico em gradiente atingindo 15% de solvente orgânico (A) e atingindo 25% de solvente orgânico (B) adquiridos em 260 nm.

Essa modificação trouxe melhora do fator de simetria do pico de 1,2 (condição com 15% MeOH) para 1,1 (condição com 25% de MeOH), aumento do número de pratos teóricos (N) de N = 44709 (condição com 15% MeOH) para N = 283186 (condição com 25% de MeOH), e redução do tempo de retenção do ácido mucônico de 12.55 minutos (condição com 15% de MeOH) para 10.47 minutos (condição com 25% de MeOH).

Avaliação da Temperatura

Um dos fatores que influenciam a retenção dos analitos é a temperatura, de modo que temperaturas mais elevadas facilitam a transferência do analito da fase estacionária para a fase móvel e diminuem o tempo de retenção. Da mesma maneira,

temperaturas mais baixas podem promover aumento do tempo de retenção por dificultar a transferência do analito da fase estacionária para a fase móvel (Lanças, 2009), o que poderia trazer benefícios para a separação do ácido oxálico e ácido xilônico. Desta forma, foi avaliado o comportamento cromatográfico, em especial para os ácidos orgânicos mais polares, a partir da redução da temperatura da coluna de 30 para 25°C. A Tabela 5 mostra os tempos de retenção obtidos para o ácido oxálico e ácido xilônico nas duas temperaturas avaliadas.

A diminuição da temperatura para 25°C não proporcionou alterações significativas para o aumento de retenção do ácido oxálico. Não foram realizados testes com temperaturas inferiores a 25°C por serem de difícil manutenção. Dessa maneira, a temperatura da coluna foi mantida em 30°C.

Tabela 5. Comparação do tempo de retenção médio do ácido oxálico e ácido xilônico nas temperaturas de 25°C e 30°C.

Composto	Tempo _{médio} de retenção a	Tempo _{médio} de retenção a
	25°C	30°C
Ácido Oxálico	1,26	1,24
Ácido Xilônico	1,33	1,34

Tempo de reequilíbrio da coluna

Na eluição em modo gradiente é necessário que haja o tempo de reequilíbrio da coluna para retorno às condições iniciais para uma próxima análise. Verificou-se que 6 min eram suficientes para reequilibrar a coluna. A Tabela 6 mostra os valores de desvio padrão e coeficiente de variação do tempo de retenção dos analitos em três injeções sequenciais.

Tabela 6. Desvio padrão e coeficiente de variação do tempo de retenção de três injeções sequenciais dos ácidos orgânicos.

Ácido	t _R 1 ^a injeção	t _R 2 ^a injeção	t _R 3 ^a injeção	Média	DP	CV (%)
Oxálico	1,223	1,222	1,224	1,223	0,001	0,082
Xilônico	1,304	1,305	1,304	1,304	0,001	0,044
Glicérico	1,491	1,493	1,492	1,492	0,001	0,067
Lático	2,530	2,536	2,533	2,533	0,003	0,118
Cítrico	4,374	4,389	4,385	4,383	0,008	0,177
Fumárico	4,803	4,817	4,815	4,812	0,008	0,157
Succínico	4,869	4,885	4,883	4,879	0,009	0,179
Kójico	6,069	6,092	6,095	6,085	0,014	0,234
Propiônico	6,913	6,930	6,934	6,926	0,011	0,161
Mucônico	10,418	10,420	10,427	10,422	0,005	0,045

Após o processo de otimização, as condições cromatográficas apresentaram os parâmetros listados abaixo. A Tabela 7 mostra o gradiente de eluição da fase móvel e a Figura 15 o perfil cromatográfico obtido para o conjunto de ácidos orgânicos avaliados.

- Fase móvel: Tampão Fosfato de Potássio 10 mmol/L pH 2,0
- Coluna: C18 HSS T3 2,1 X 150 mm, 1,8 µm, (Waters)
- Temperatura do forno da coluna: 30°C
- Vazão: 0,3 mL/min
- Volume de injeção: 1 µL
- Tempo de análise: 15 min
- Comprimentos de onda: 210 e 260 nm

Tabela 7. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min)	Eluente A (%): Tampão KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 2,0	Eluente B (%): MeOH	Vazão (mL/min)
0,00	100	0	0,3
1,50	100	0	0,3
5,00	95	5	0,3
8,00	75	25	0,3
9,00	75	25	0,3
9,01	100	0	0,3
15,00	100	0	0,3

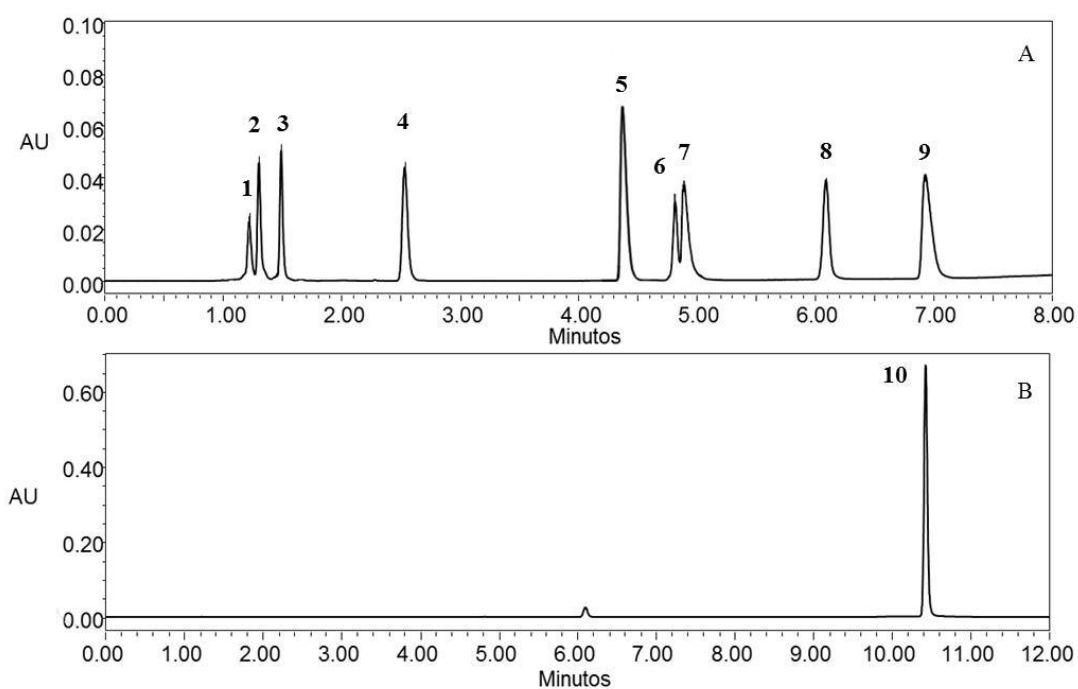


Figura 15. Cromatogramas por UHPLC-PDA dos analitos: ácido oxálico t_R 1,224 (1), ácido xilônico t_R 1,305 (2), ácido glicérico t_R 1,493 (3), ácido láctico t_R 2,536 (4), ácido cítrico t_R 4,389 (5), ácido fumárico t_R 4,822 (6), ácido succínico t_R 4,883 (7), ácido kójico t_R 6,092 (8), ácido propiônico t_R 6,930 (9) adquiridos em 210 nm (A), e ácido mucônico t_R 10,420 (10) adquirido em 260 nm.

Avaliação da sensibilidade

Devido às particularidades estruturais, tais como conjugações estendidas na estrutura, o ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico possuem maior absorvidade molar, o que se traduz na forma de maior sensibilidade durante a detecção por PDA. Pela análise das estruturas químicas (Figura 1), observa-se que esses compostos possuem, além do grupo ácido carboxílico, que corresponde a um cromóforo fraco, um sistema conjugado de ligações duplas e simples que promove maior absorção no UV. Enquanto que o ácido láctico, ácido glicérico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido propiônico e ácido xilônico não possuem essa alternância de ligações simples e duplas, o que resulta em menor absorvidade molar. Tendo em vistas essas características, foram avaliadas as concentrações em que se obtiveram máximas e mínimas respostas do detector (Tabela 8). Esse estudo da sensibilidade foi utilizado como base na etapa de construção das curvas analíticas.

Tabela 8. Valores de concentração dos ácidos orgânicos em que foram obtidas as respostas máximas e mínimas do detector.

Compostos	Concentração mínima (mg/mL)	Concentração máxima (mg/mL)
Ácido cítrico	0,05	12,0
Ácido fumárico	0,0001	0,4
Ácido glicérico	0,02	8,0
Ácido kójico	0,001	0,5
Ácido láctico	0,02	12,0
Ácido mucônico	0,0005	0,2
Ácido oxálico	0,001	2,0
Ácido propiônico	0,05	12,0
Ácido succínico	0,05	12,0
Ácido xilônico	0,02	12,0

Validação

Para garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos, foi realizada a validação do método UHPLC-PDA de ácidos orgânicos, contemplando os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. A etapa de validação incluiu a avaliação de amostras reais, seus brancos e controles de preparo.

Linearidade

O parâmetro de linearidade foi avaliado pelo método dos mínimos quadrados. De acordo os principais guias de validação, devem ser utilizados no mínimo cinco valores de concentração para construção das curvas analíticas (Ribani *et al.*, 2004; ICH Guideline, 2005). Foram construídas curvas por calibração externa pela análise de seis ou mais diferentes concentrações dos padrões dos 10 ácidos estudados, em triplicata de injeção. O ajuste das curvas foi realizado com o software *OriginPro 8.0*. As áreas de cada pico foram obtidas e a área média foi calculada para cada ponto. As curvas foram construídas traçando-se as áreas médias dos picos versus a concentração. Utilizou-se análise de variância para avaliar a qualidade do ajuste dos modelos. A partir do coeficiente de determinação linear (R^2) foram obtidas informações da variância dos dados que são explicados pelos modelos de regressão. A Tabela 9 mostra os dados de regressão linear obtidos, com a equação linear que representa o modelo, a faixa de aplicação, e o R^2 .

LOD e LOQ

A determinação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foi realizada com base na relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente. Estes parâmetros são mostrados na Tabela 9 e representam a menor concentração que pode

ser detectada, mas não necessariamente quantificada (LOD), e a menor concentração que pode ser quantificada (LOQ) com confiança.

Devido a particularidades estruturais, tais como conjugações prolongadas na estrutura, ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico apresentaram maior absorvidade molar. Isso promove alta sensibilidade na detecção de PDA com baixos valores de LOD e LOQ. O ácido láctico, o ácido glicérico, o ácido cítrico, o ácido succínico, o ácido propiônico e o ácido xilônico possuem apenas um cromóforo fraco (ácido carboxílico) que resulta na absorvidade molar inferior. Portanto, valores mais elevados de LOD e LOQ foram alcançados.

Tabela 9. Dados de regressão linear, coeficientes de regressão linear (R^2), limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), de ácidos orgânicos por UHPLC-PDA para os ácidos orgânicos investigados.

Compostos	Equação ($\mu\text{g/mL}$)	Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido cítrico	$y = 221383x - 67,7$	37,6-6016,3	0,9999	7,5	37,6
Ácido fumárico	$y = 22553x - 578$	0,2-5,5	0,9993	0,05	0,2
Ácido glicérico	$y = 117967,3x - 482,9$	50,9-4578	0,9999	12,2	50,9
Ácido kójico	$y = 14412x - 385$	0,2-150,9	0,9999	0,1	0,23
Ácido láctico	$y = 108959x - 159$	37,9-6066,1	0,9999	15,1	37,91
Ácido mucônico	$y = 41949x - 460$	0,1-25,9	0,9990	0,05	0,1
Ácido oxálico	$y = 2696x - 501$	1,5-609,6	0,9999	0,3	1,5
Ácido propiônico	$y = 112282x - 818$	30,0-3002,8	0,9999	15,0	30,0
Ácido succínico	$y = 116641,6x - 999,9$	30,0-4507,2	0,9999	15,0	30,0
Ácido xilônico	$y = 100036x - 117$	26,8-2679,5	0,9999	10,7	26,8

O método mostrou conformidade com a lei de Beer apresentando boa linearidade para todos os analitos. Foram obtidos valores de R^2 superiores a 0,99, demonstrando que os modelos lineares propostos explicam 99% da variação dos dados.

Precisão

A precisão foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). Esse parâmetro foi determinado pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio-padrão relativo (RSD/DPR) dos dados obtidos pelos ensaios realizados, calculado pela equação 1.

Cada nível foi preparado em triplicata em três períodos do dia por três dias consecutivos. Cada solução foi injetada uma única vez na metodologia da Tabela 7. Ao final de um dia, para cada nível de concentração foram obtidas nove determinações (repetibilidade). Ao final de três dias foram obtidas vinte e sete determinações para cada nível de concentração (precisão intermediária). O método mostrou precisão adequada ($CV \leq 4,06\%$) em todos os níveis de concentração avaliados, demonstrando uma dispersão dos resultados dentro da faixa tolerável (Tabela 10 e 11) (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2012).

Tabela 10. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico.

Concentração (µg/mL)	Ácido Fumárico			Ácido kójico		
	0.62	1.55	3.88	4.86	60.70	121.40
Dia 1	0.66 ± 0.01	1.65 ± 0.05	4.03 ± 0.02	4.94 ± 0.08	63.25 ± 0.17	127.13 ± 0.32
CV (%)	1.36	2.90	0.45	1.61	0.27	0.25
Exatidão	106.47	106.38	103.91	101.65	104.20	104.72
Dia 2	0.66 ± 0.01	1.69 ± 0.01	4.23 ± 0.04	4.91 ± 0.11	62.86 ± 0.30	126.29 ± 0.65
CV (%)	1.43	0.32	0.93	2.16	0.48	0.52
Exatidão	106.72	108.96	109.12	101.03	103.56	104.03
Dia 3	0.66 ± 0.01	1.68 ± 0.02	4.21 ± 0.03	4.56 ± 0.07	63.44 ± 0.31	127.78 ± 0.56
CV (%)	1.59	1.34	0.74	1.50	0.49	0.43
Exatidão	106.03	107.90	108.51	93.83	104.51	105.26
	Inter-day			Inter-day		
Média	0.661 ± 0.02	1.67 ± 0.06	4.16 ± 0.10	4.80 ± 0.195	63.19 ± 0.355	127.06 ± 0.80
CV (%)	3.78	3.56	2.47	4.06	0.56	0.63
Exatidão	106.41	107.74	107.18	98.77	104.10	104.66
Concentração (µg/mL)	Ácido mucônico			Ácido oxálico		
	0.71	7.05	17.70	18.01	180.12	450.30
Dia 1	0.67 ± 0.01	6.64 ± 0.09	16.44 ± 0.25	17.47 ± 0.40	176.59 ± 1.81	437.46 ± 2.27
CV (%)	1.06	1.32	1.54	2.29	1.02	0.52
Exatidão	94.64	94.19	93.40	96.99	98.04	97.15
Dia 2	0.68 ± 0.02	6.95 ± 0.08	17.34 ± 0.19	17.60 ± 0.34	176.23 ± 1.41	436.29 ± 1.38
CV (%)	2.74	1.19	1.07	1.94	0.80	0.32
Exatidão	96.69	98.57	98.53	97.73	97.84	96.89
Dia 3	0.65 ± 0.02	6.86 ± 0.15	17.23 ± 0.24	17.84 ± 0.44	175.57 ± 2.03	437.70 ± 2.69
CV (%)	3.60	2.19	1.38	2.49	1.16	0.61
Exatidão	92.28	97.29	97.89	99.04	97.47	97.20
	Inter-day			Inter-day		
Média	0.67 ± 0.02	6.82 ± 0.17	17.01 ± 0.46	17.64 ± 0.41	176.13 ± 1.75	437.15 ± 2.19
CV (%)	2.55	2.49	2.73	2.34	1.00	0.50
Exatidão	94.54	96.68	96.61	97.92	97.79	97.08

Tabela 11. Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para o ácido cítrico, ácido glicérico, láctico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido xilônico.

Concentração (mg/mL)	Ácido cítrico			Ácido glicérico			Ácido láctico		
	0.10	1.00	2.50	0.31	1.00	3.01	0.20	1.00	2.07
Dia 1	0.09 ± 0.01	0.96 ± 0.01	2.40 ± 0.01	0.30 ± 0.01	1.00 ± 0.01	2.99 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.97 ± 0.02	1.99 ± 0.01
CV (%)	2.10	1.08	0.39	2.51	0.68	0.50	1.75	2.01	0.72
Exatidão	93.15	96.36	95.96	98.19	99.49	98.88	94.88	96.50	96.30
Dia 2	0.09 ± 0.01	0.96 ± 0.01	2.39 ± 0.01	0.311 ± 0.01	0.99 ± 0.01	2.96 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.95 ± 0.01	1.96 ± 0.02
CV (%)	1.95	0.89	0.48	0.72	0.59	0.44	1.79	0.22	0.82
Exatidão	93.98	96.09	95.39	100.98	98.58	98.28	95.07	94.60	94.72
Dia 3	0.10 ± 0.01	0.954 ± 0.01	2.40 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.99 ± 0.01	2.97 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.97 ± 0.01	1.99 ± 0.04
CV (%)	2.61	1.27	0.97	0.99	0.46	0.32	1.35	0.55	1.91
Exatidão	94.81	95.38	95.97	100.89	98.59	98.75	95.79	96.31	95.97
	Inter-day			Inter-day			Inter-day		
Média	0.09 ± 0.01	0.96 ± 0.01	2.39 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.99 ± 0.01	2.97 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.96 ± 0.01	1.98 ± 0.02
CV (%)	0.01	0.01	0.003	2.02	0.71	0.49	0.01	0.01	0.01
Exatidão	93.98	95.94	95.77	100.01	98.89	98.64	95.25	95.81	95.66
Concentração (mg/mL)	Ácido propiônico			Ácido succínico			Ácido xilônico		
	0.50	1.08	2.16	0.10	1.00	2.00	0.10	1.00	2.00
Dia 1	0.51 ± 0.01	1.02 ± 0.02	2.06 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.97 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.04 ± 0.01	2.08 ± 0.01
CV (%)	1.47	1.84	1.29	4.00	1.36	0.57	1.60	0.52	0.51
Exatidão	102.85	94.99	95.66	100.89	98.57	98.70	101.27	104.36	103.892
Dia 2	0.50 ± 0.01	1.01 ± 0.01	2.02 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.97 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.03 ± 0.01	2.06 ± 0.01
CV (%)	2.00	0.740	1.02	4.00	1.36	0.57	3.05	0.79	0.56
Exatidão	99.92	93.631	93.57	100.70	98.57	98.70	101.58	103.68	102.68
Dia 3	0.48 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.95 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.97 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.97 ± 0.01	1.93 ± 0.01
CV (%)	2.21	0.89	0.22	4.00	1.36	0.57	3.47	0.52	0.31
Exatidão	96.05	92.54	90.32	100.71	98.57	98.70	96.35	96.76	96.34
	Inter-day			Inter-day			Inter-day		
Média	0.50 ± 0.02	1.01 ± 0.02	2.01 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.97 ± 0.01	0.10 ± 0.01	1.01 ± 0.04	2.02 ± 0.07
CV (%)	3.39	1.63	2.58	3.84	1.31	0.55	3.64	3.50	3.38
Exatidão	99.61	93.72	93.18	100.71	98.57	98.70	99.74	101.60	100.97

Exatidão

A exatidão foi determinada a partir de ensaios de recuperação em que o padrão analítico foi adicionado a uma amostra controle (fortificação). O valor encontrado na análise (concentração calculada) foi comparado com o valor adicionado à amostra (concentração teórica). A exatidão foi então calculada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica.

Foram avaliados três diferentes níveis de concentração cobrindo as faixas de trabalho. Cada nível foi preparado em triplicata. Amostras do branco foram diluídas 4 e 100 vezes para avaliar a acurácia dos ácidos orgânicos com menor e maior absorvidade molar, respectivamente. A precisão foi expressa como uma porcentagem da recuperação. Dados experimentais obtidos revelaram recuperações na faixa de 94,90-109,63% em todos os níveis avaliados, revelando flutuações inferiores a 10%. Os resultados são mostrados na Tabela 12 e 13 e estão de acordo com o critério de aceitação (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2012).

Tabela 12. Resultados da exatidão do ácido fumárico, ácido kójico, ácido mucônico e ácido oxálico.

Concentração (µg/mL)	Branco: Glicerina		
	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
Ácido fumárico	0.35	96.21	2.70
	1.15	105.45	2.34
	4.34	109.63	2.24
Ácido kójico	0.60	96.80	1.60
	78.10	102.20	0.40
	145.0	103.00	0.10
Ácido mucônico	0.23	101.51	1.46
	4.59	100.13	0.98
	14.96	103.47	1.20
Ácido oxálico	8.61	94.90	1.88
	88.00	97.92	2.65
	479.60	98.79	0.14

Tabela 13. Resultados da exatidão do ácido cítrico, ácido glicérico, ácido lático, ácido propiônico, ácido succínico e ácido xilônico.

Concentração (mg/mL)	Branco: Glicerina		
	Concentração (mg/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
Ácido cítrico	0.05	100.36	2.98
	2.02	96.60	0.04
	3.53	96.48	0.04
Ácido glicérico	0.08	104.84	2.24
	2.11	104.13	0.32
	4.22	103.85	0.31
Ácido lático	0.09	103.81	1.75
	1.34	98.94	0.18
	5.16	99.21	0.43
Ácido propiônico	0.07	95.84	1.55
	1.26	100.28	0.77
	2.53	99.76	0.33
Ácido succínico	0.07	104.66	1.52
	1.24	102.40	0.52
	2.50	101.58	0.32
Ácido xilônico	0.08	96.27	1.34
	1.57	105.58	1.15
	3.64	105.70	0.11

CAPÍTULO 2:

Desenvolvimento de métodos analíticos por UHPLC-MS/MS

Foram desenvolvidas ferramentas analíticas com alta sensibilidade baseadas em LC-MS para quantificação dos ácidos orgânicos investigados neste trabalho (ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido xilônico) e de polióis (glicerina, arabitol, dulcitol, eritritol, iditol, manitol, ribitol, sorbitol, treitol, volemitol e xilitol) em baixas concentrações.

Dessa maneira, microrganismos que estejam produzindo os analitos, mas que devido à limitada sensibilidade dos métodos de análise de ácidos orgânicos (UHPLC-PDA) e de polióis (UHPLC-ELSD) não são detectados, possam ser identificados e os analitos quantificados.

Ácidos orgânicos

Inicialmente foi realizado o experimento de infusão direta nos modos de ionização ESI(+)-MS e ESI(-)-MS dos padrões dos compostos: ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido xilônico e ácido kójico, sendo adquiridos espectros no modo *fullscan*. Com exceção do ácido kójico, todos os compostos mostraram melhor ionização no modo ESI(-)-MS. Assim, o modo ESI(-)-MS foi selecionado para análise do ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido láctico, ácido

mucônico, ácido oxálico, ácido succínico e ácido xilônico, e o modo ESI(+)-MS selecionado para análise do ácido kójico.

Substâncias contendo grupamentos ácidos, tais como os ácidos carboxílicos são facilmente desprotonados, portanto, são normalmente analisados utilizando espectrometria de massas no modo negativo. A análise do ácido kójico, entretanto, procedeu-se no modo positivo, uma vez que esse composto não possui uma carboxila formal em sua estrutura, o que justifica uma ionização menos eficiente no modo negativo.

Para otimização da voltagem do capilar, foi realizada infusão direta de uma solução contendo os dez ácidos orgânicos sendo analisado no modo negativo e no modo positivo. Não foi verificada diferença muito elevada nas intensidades dos sinais de cada padrão ao variar esse fator. Assim, o valor de 3,0 kV foi definido para ser utilizado na análise dos compostos estudados.

O espectrômetro de massas foi operado utilizando o modo MRM. Nesse modo, o íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), fragmentado no segundo quadrupolo (q) e os fragmentos selecionados no terceiro quadrupolo (Q3). Ao selecionar pares adequados de m/z em Q1 e Q3 e otimizar as energias do cone e de colisão, análises seletivas e sensíveis podem ser obtidas (Putri e Fukusaki, 2014).

As condições de energia do cone foram ajustadas de modo a obter os sinais da razão massa/carga (m/z) mais intensos para cada analito analisado. Experimentos de MS/MS foram realizados a partir da infusão direta dos ácidos orgânicos para obtenção dos perfis de fragmentação e seleção das energias de colisão que fornecessem os sinais mais intensos e/ou seletivos da razão m/z (Figuras 16-24).

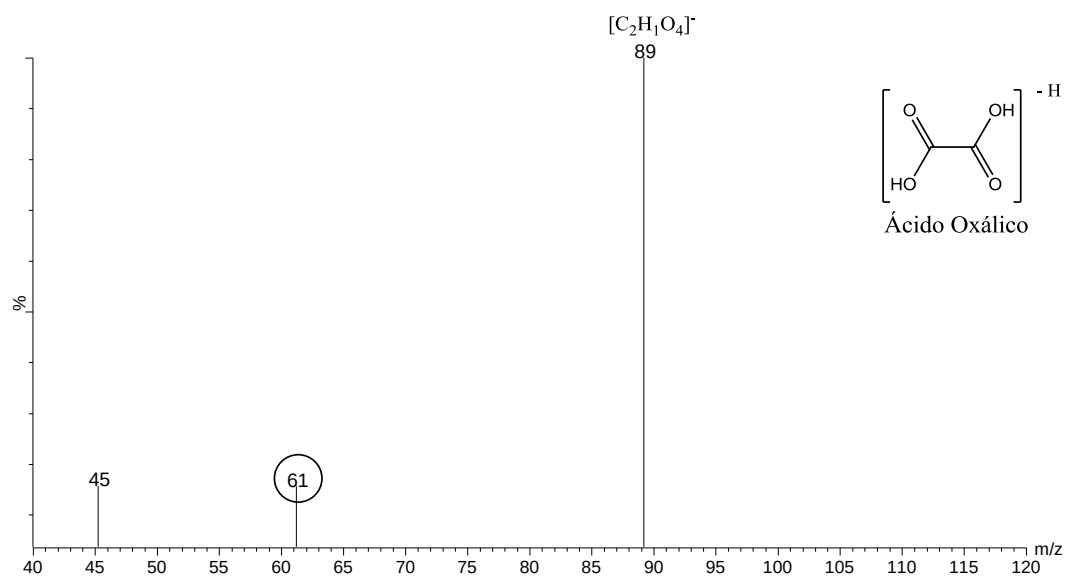


Figura 16. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido oxálico com m/z 89 ([M-H]⁻) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 7 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

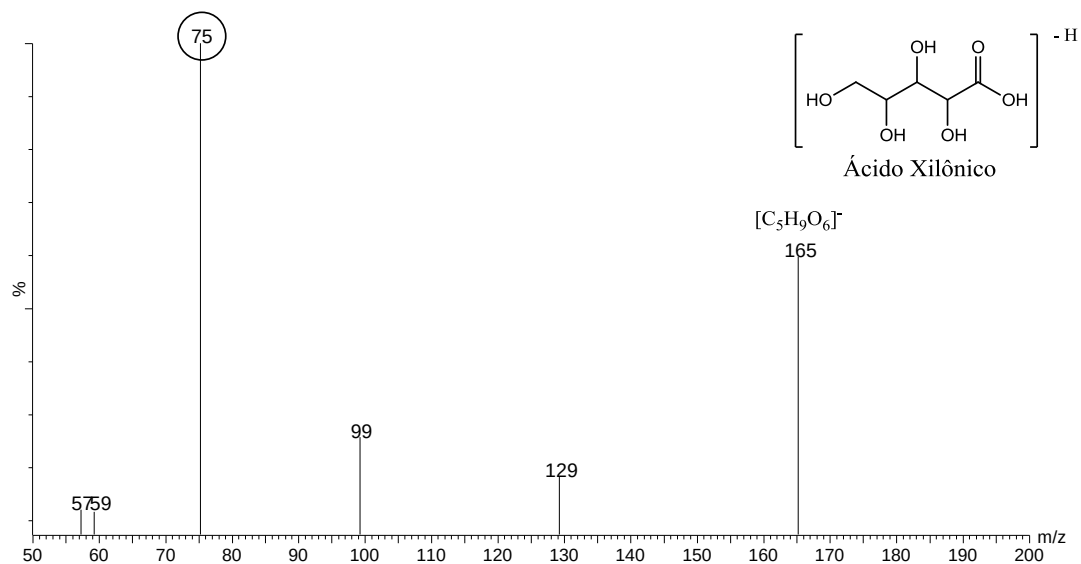


Figura 17. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido xilônico com m/z 165 ([M-H]⁻) com voltagem do cone 28 V e energia de colisão 15 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

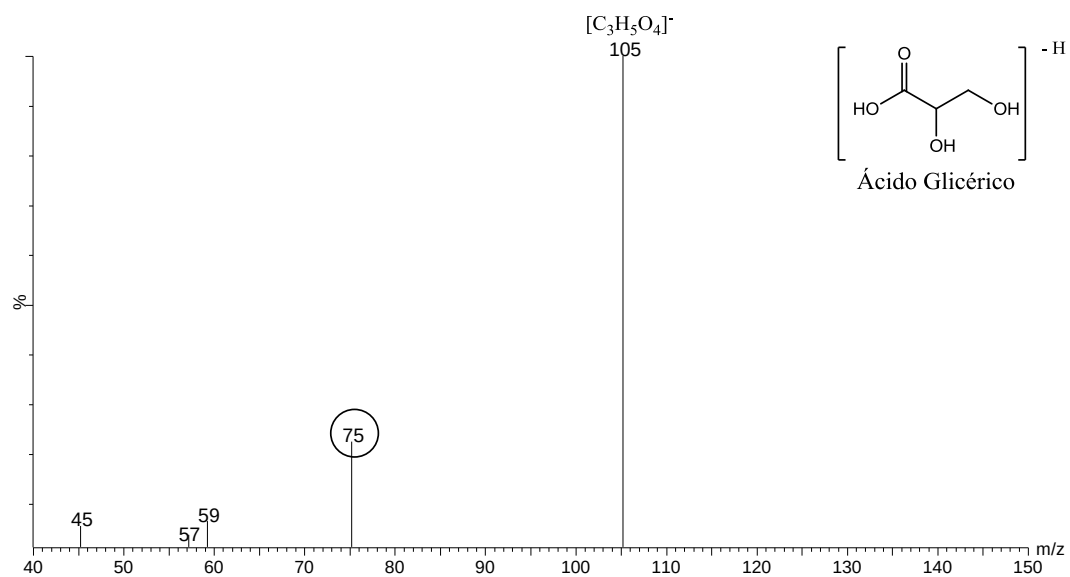


Figura 18. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido glicérico com m/z 105 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 27 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

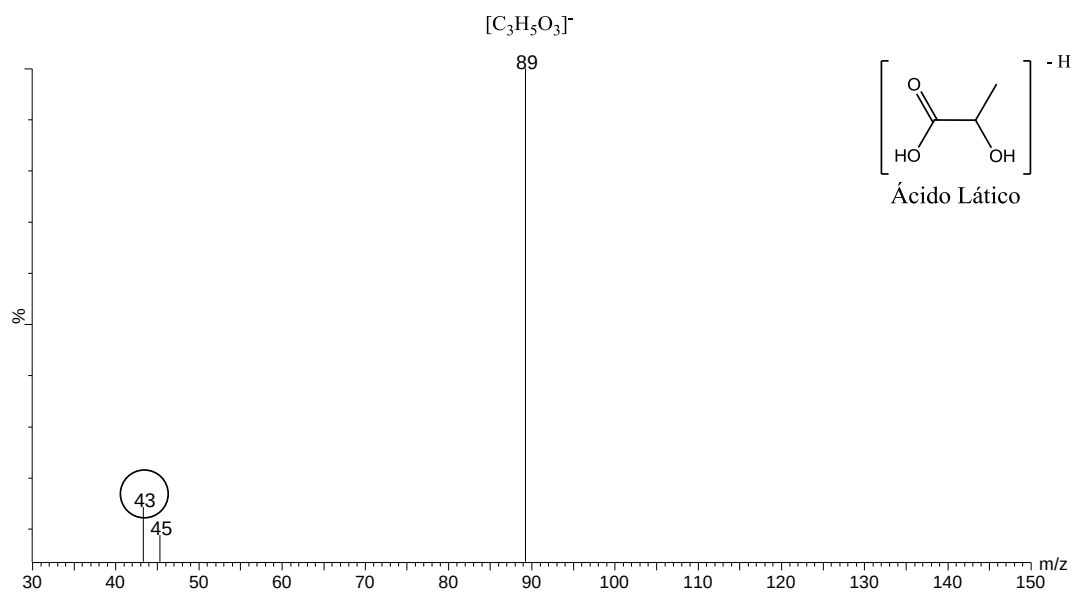


Figura 19. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido láctico com m/z 89 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

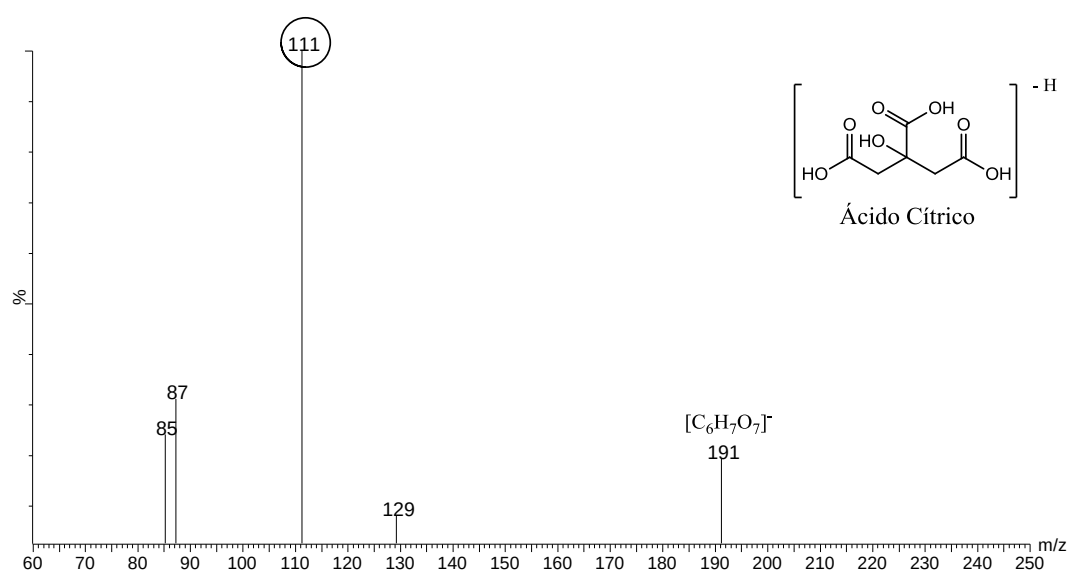


Figura 20. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido cítrico com m/z 191 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 16 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

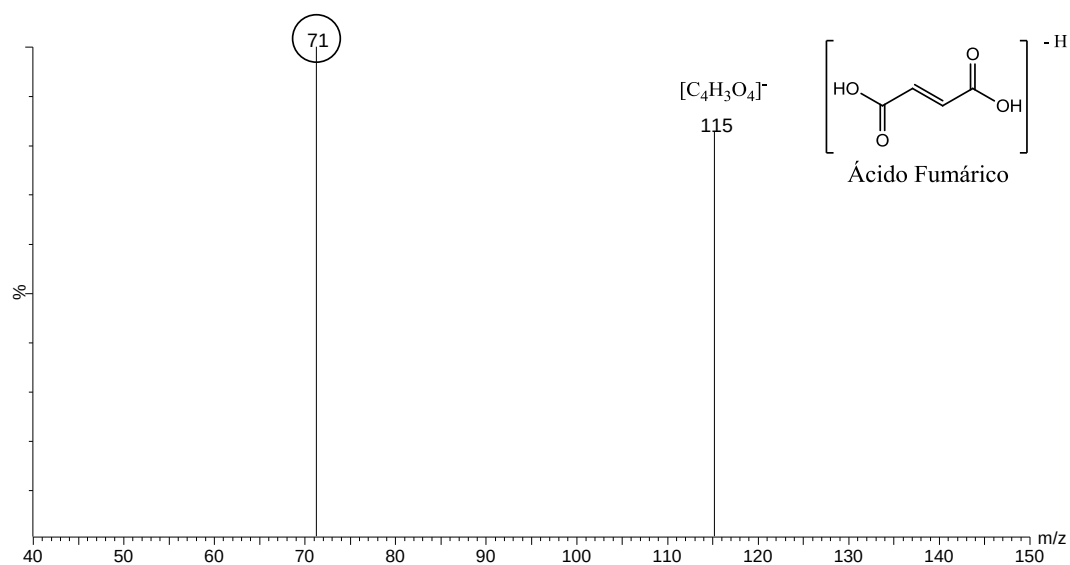


Figura 21. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido fumárico com m/z 115 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 7 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

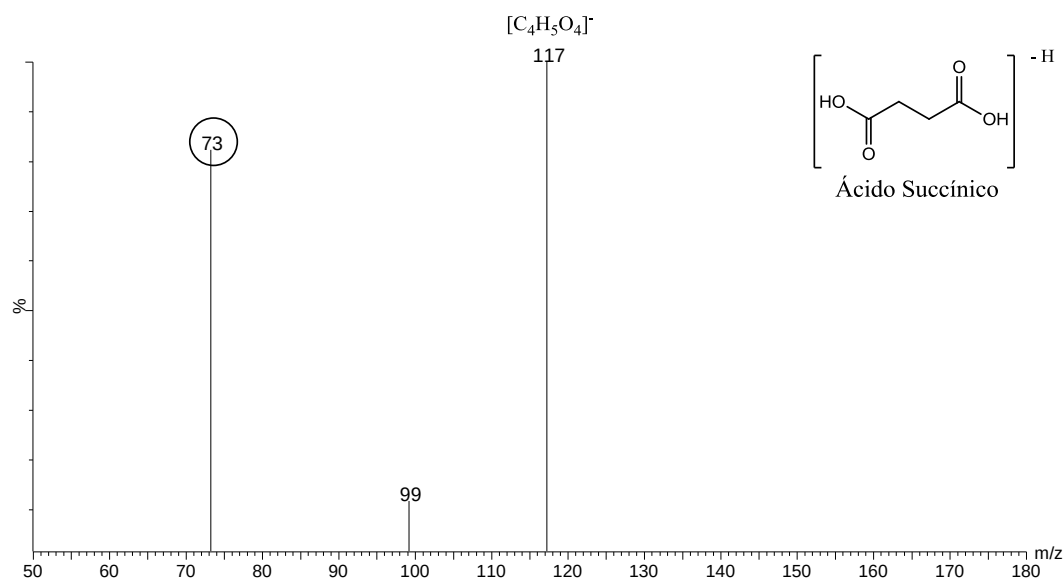


Figura 22. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido succínico com m/z 117 ($[M-H]^-$) com voltagem do cone 22 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

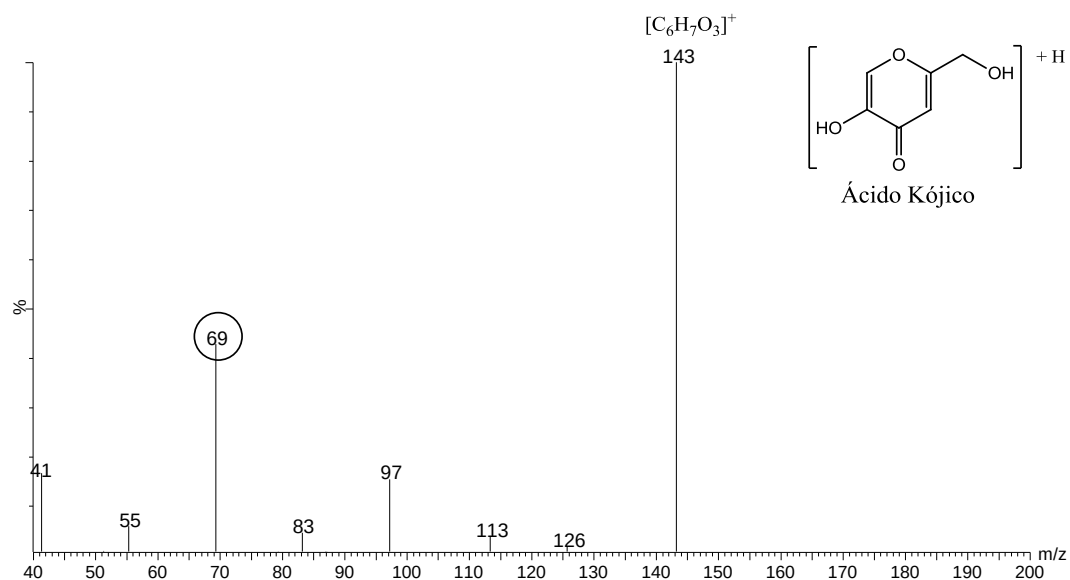


Figura 23. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de ácido kójico com m/z 143 ($[M+H]^+$) com voltagem do cone 35 V e energia de colisão 17 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

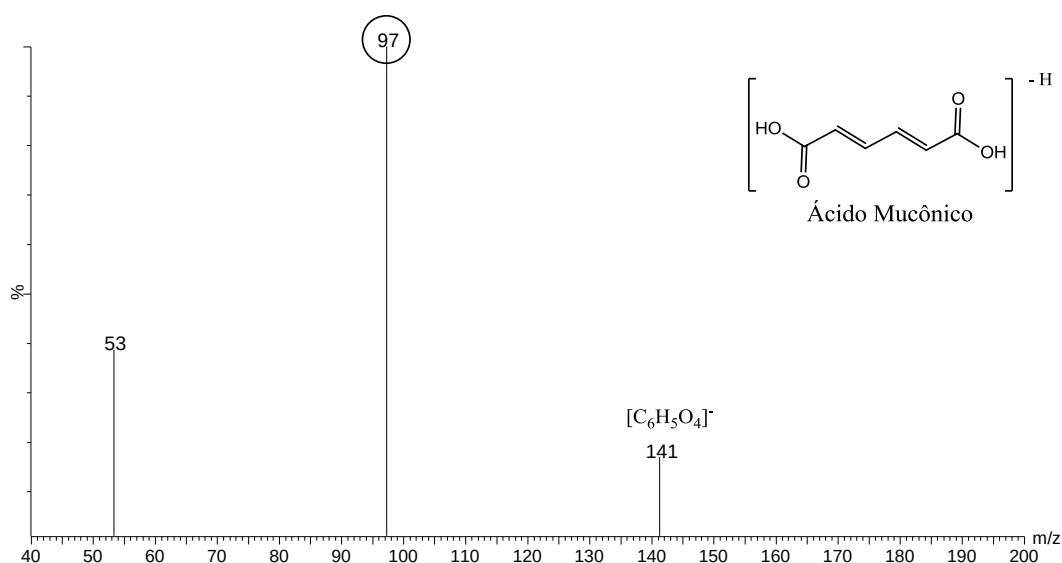


Figura 24. Espectro de massas obtido por ESI(-)-MS/MS para o padrão de ácido mucônico com m/z 141 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) com voltagem do cone 25 V e energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

Os espectros de massas do ácido oxálico (Figura 16), ácido glicérico (Figura 18), ácido láctico (Figura 19), ácido fumárico (Figura 21), ácido succínico (Figura 22) e ácido kójico (Figura 23) apresentaram íons precursores mais intensos que os fragmentos. Entretanto, os aumentos da energia de colisão para valores acima dos definidos forneceram sinais menos intensos, tanto para o íon precursor quanto para o íon fragmento. Para a maior parte dos ácidos estudados, a principal característica observada foi a geração de íons fragmentos com perda de CO_2 .

Como resultado desse ensaio, obteve-se o método MRM otimizado descrito na Tabela 14 que mostra as informações dos íons precursores (selecionados no 1º quadrupolo – Q1) e os respectivos fragmentos (selecionados no 3º quadrupolo – Q3). Para cada ácido orgânico foram selecionadas duas transições de massas, a primeira a ser utilizada para quantificação e segunda para confirmação do composto. Dentre os 10 padrões analisados, o ácido propiônico não pôde ser identificado, tendo em vista o valor muito baixo de massa.

Tabela 14. Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) dos padrões de ácidos orgânicos.

Composto	Voltagem do cone (V)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) Quantificação /Confirmação	Energia de colisão (eV)	Ionização
Ácido cítrico	25	191	111 / 87	15	ESI(-)
Ácido láctico	25	89	43 / 45	10	ESI(-)
Ácido fumárico	22	115	71	7	ESI(-)
Ácido glicérico	27	105	75 / 59	10	ESI(-)
Ácido kójico	35	143	69 / 97	17	ESI(+)
Ácido mucônico	25	141	97 / 53	10	ESI(-)
Ácido oxálico	22	89	61 / 45	7	ESI(-)
Ácido propiônico	-	-	-	-	ESI(-)
Ácido succínico	22	117	73 / 99	10	ESI(-)
Ácido xilônico	28	165	75 / 99	15	ESI(-)

Após a obtenção do método MRM e otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas, foram realizados experimentos utilizando a cromatografia líquida como etapa de separação dos compostos. Para que fosse possível que todos os ácidos fossem analisados em uma única análise, procedeu-se com a segmentação do método. De 0 a 5,50 min aplicou-se o modo ESI(-)-MS, de 5,50 a 8,00 min o modo ESI(+)-MS, e em 8,00 min retornou-se ao modo ESI(-)-MS.

Essa etapa de separação é fundamental já que o ácido kójico e o ácido mucônico são compostos isômeros. Inicialmente foi utilizada coluna de fase reversa HSS T3 e o perfil obtido foi comparado com o do método UHPLC-PDA.

O perfil cromatográfico obtido pela comparação das duas técnicas de detecção foi semelhante. Entretanto, os ácidos oxálico e propiônico não foram identificados por ESI(-)-MS. Esse problema pode estar associado ao pequeno tamanho da molécula. A Figura 25 mostra os cromatogramas de MRM para o conjunto dos oito ácidos orgânicos detectados.

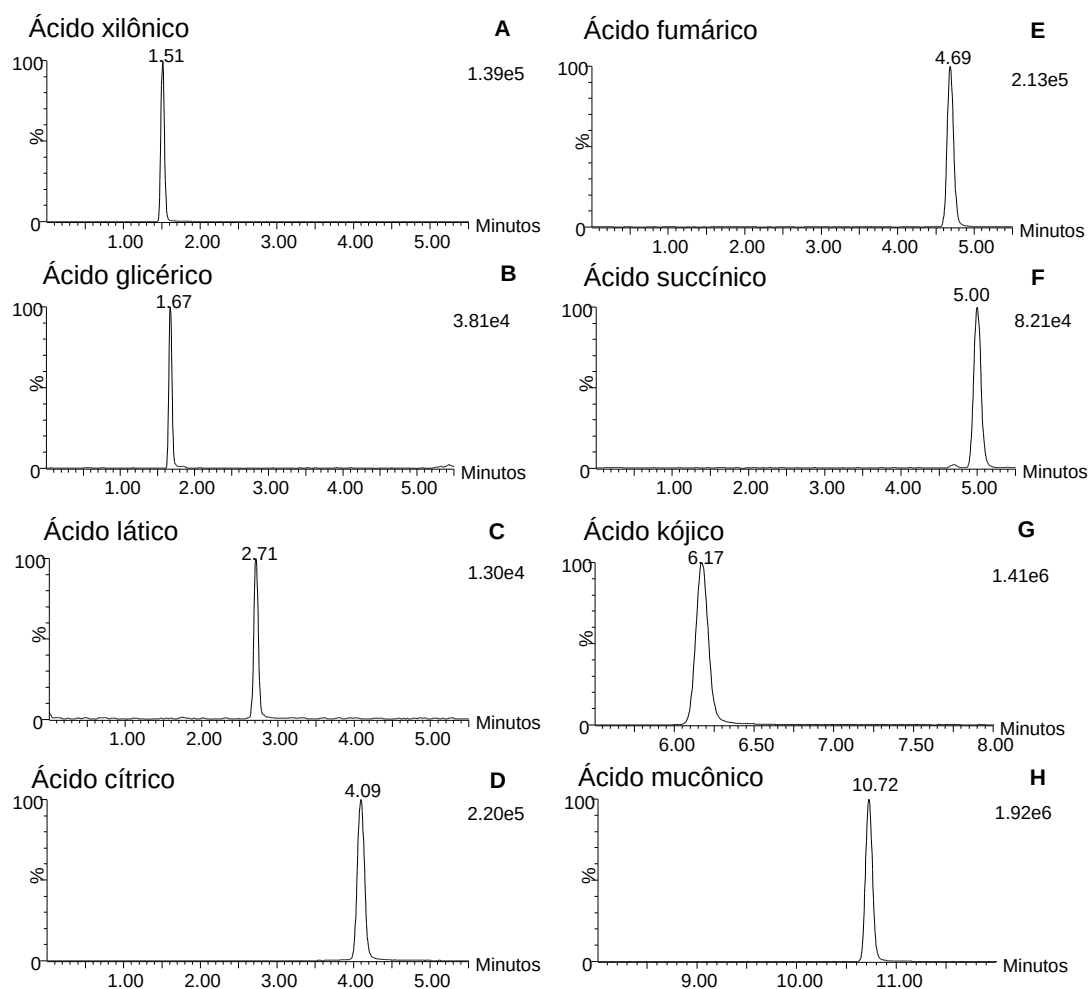


Figura 25. Cromatogramas de MRM analisados por UHPLC-MS/MS para o: A) ácido xilônico, B) ácido glicérico, C) ácido lático, D) ácido cítrico, E) ácido fumárico, F) ácido succínico, G) ácido kójico, H) ácido mucônico utilizando a coluna HSS T3.

Novos experimentos foram realizados com a coluna SeQuant HILIC para verificar se haveria melhora na detecção do ácido oxálico. O mecanismo de retenção dos compostos nesse tipo de coluna difere dos mecanismos de fase reversa (Lanças, 2010). Como característica desse modo de separação, pode-se citar a capacidade de reter substâncias polares, sendo que os analitos são eluídos em ordem decrescente de hidrofobicidade (Buszewski e Noga, 2012).

Foram realizados testes utilizando eluição em gradiente com fase móvel composta de A: 90% Acetonitrila, 10% H₂O com Acetato de amônio 10 mM; B: 40%

ACN, 60% H₂O com Acetato de amônio 10 mM. A Tabela 15 mostra o gradiente utilizado em que foi obtida a separação cromatográfica mostrada na Figura 26.

Tabela 15. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos utilizando a coluna SeQuant.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Eluente A (%):	Eluente B (%):
		90% ACN 10% H₂O + Acetato de Amônio 10mM	40% ACN 60% H₂O + Acetato de Amônio 10mM
0,00	0,4	90	10
8,00	0,4	50	50
10,00	0,6	50	50
14,50	0,6	90	10
15,00	0,4	90	10

A Figura 26 mostra os cromatogramas de MRM para o conjunto dos oito ácidos orgânicos detectados, utilizando a coluna SeQuant.

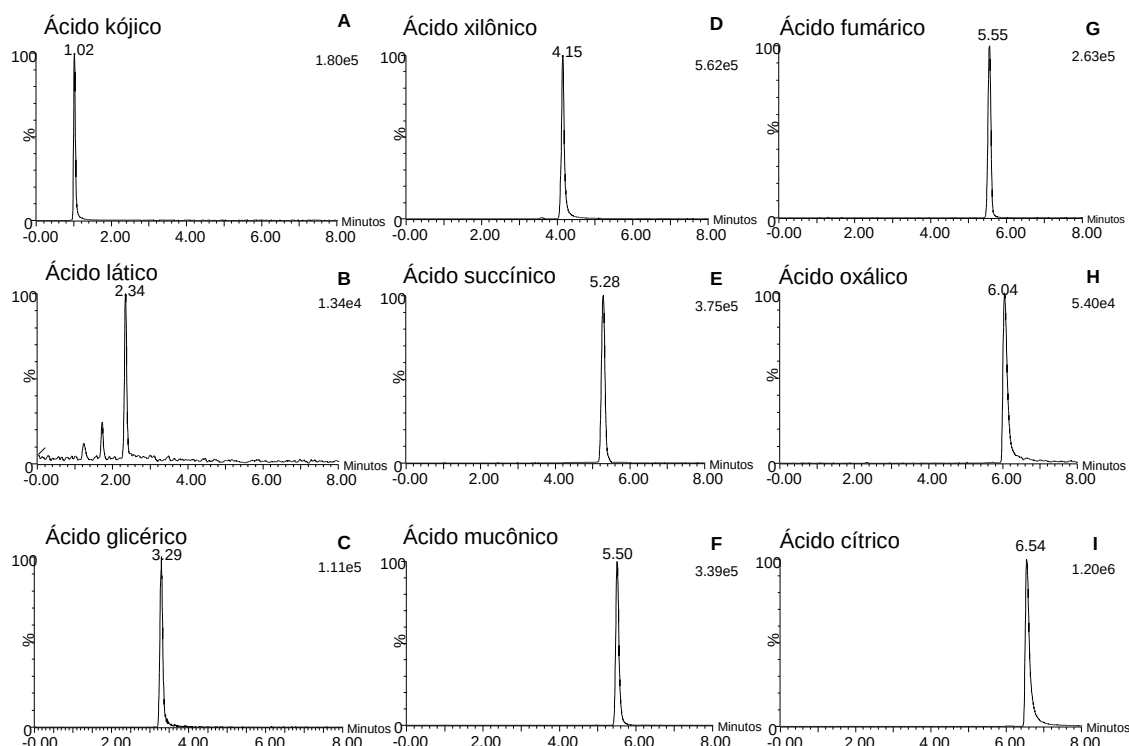


Figura 26. Cromatogramas de MRM analisados por UHPLC-MS/MS para: A) ácido kójico, B) ácido láctico, C) ácido glicérico, D) ácido xilônico, E) ácido succínico, F) ácido mucônico, G) ácido fumárico, H) ácido oxálico I) ácido cítrico utilizando a coluna SeQuant ZIC HILIC.

Diante do uso da coluna SeQuant, quimicamente modificada com um ligante sulfobetaína, outro perfil de separação foi obtido quando comparado ao da coluna C18, sendo eluído inicialmente o ácido láctico, o ácido glicérico e o ácido xilônico e por último o ácido oxálico e o ácido cítrico. Esse método proporciona uma maior retenção de compostos polares e representa uma alternativa na análise do ácido oxálico, que não foi identificado pelo método UHPLC-MS descrito anteriormente.

Entretanto, a coluna SeQuant possui um maior diâmetro de partícula e, por ser uma coluna HILIC, requer uma fase móvel com elevado percentual de acetonitrila. Essas são desvantagens desse método diante daquele desenvolvido com a coluna C18, que proporciona análises com baixo consumo de solvente orgânico, utilizando MeOH ao invés de ACN, além dos benefícios obtidos pelo uso de uma coluna de menor diâmetro de partícula.

Polióis

Foi realizado o experimento de infusão direta das soluções individuais de polióis no modo ESI(+)-MS sendo adquiridos espectros no modo *fullscan*. A análise das soluções individuais e não de uma mistura dos compostos se fez necessária devido à presença de muitos isômeros dentre o grupo de analitos estudados e por apresentarem um padrão de fragmentação muito semelhante. A estrutura química dos diferentes isômeros é mostrada na Figura 2. Foram otimizadas as condições do cone que forneceram os sinais mais intensos para cada composto.

Foi realizado um estudo da energia do capilar do método em desenvolvimento neste experimento para verificar a influência desse parâmetro. Foram investigados os valores de 3,0; 3,25 e 3,5 kV através de infusão direta das soluções individuais de polióis no modo ESI(+)-MS sendo adquiridos espectros no modo *fullscan*.

Foram comparadas as intensidades do íon precursor de cada poliol entre os três valores de energia do capilar avaliados. A partir dessa comparação, verificou-se que não havia um único valor de energia do capilar que fornecesse uma maior intensidade para todos os compostos, entretanto a energia de 3,5 kV fornecia um sinal elevado para um número maior de compostos. Padronizou-se o valor 3,5 kV para ser utilizado no método.

Foi realizado um estudo para verificar a sensibilidade do método quando se utiliza apenas um canal MRM e dois canais MRM. Para isso uma solução contendo uma mistura dos polióis a 0,25 µg/mL foi analisada nos dois métodos. A comparação das intensidades obtidas para cada íon demonstrou que não ocorre aumento significativo na sensibilidade quando é utilizado um método com monitoramento de somente um canal MRM ao invés de dois para o mesmo composto. Dessa maneira, foram utilizados dois canais para o método MRM. O canal que forneceu o íon fragmento de maior intensidade foi utilizado para quantificação, pois a intensidade dos fragmentos está relacionada com a sensibilidade do método, e o outro canal foi utilizado para confirmação da presença do composto analisado.

A partir dos experimentos MS/MS foram obtidos os perfis de fragmentação e selecionadas as energias de colisão que fornecessem os sinais mais intensos e seletivos para a escolha dos íons produtos com maior intensidade. Como resultado,

obteve-se o método MRM otimizado e descrito na Tabela 16, que mostra as informações de valores dos íons precursores $[M + H]^+$ em (Q1) e os respectivos fragmentos em (Q3). As Figuras 27-38 mostram os perfis de fragmentação obtidos.

Tabela 16. Condições experimentais otimizadas para experimentos de MRM dos padrões de metabólitos utilizando ESI(+)-MS/MS mostrando os valores de m/z selecionados em Q1 e em Q3.

Composto		Voltagem do cone (V)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z) Quantificação /Confirmação	Energia de colisão (eV)
C3	Glicerina	15	93	75 / 57	6
C4	Eritritol e	15	123	105 / 87	6
	Treitol	15	123	105 / 87	6
C5	Arabitol,	15	153	69 / 99	9
	Ribitol e	15	153	99 / 69	9
	Xilitol	15	153	69 / 99	9
C6	Dulcitol,	15	183	129 / 69	10
	Iditol,	15	183	129 / 69	10
	Manitol e	15	183	69 / 129	10
	Sorbitol	15	183	69 / 129	10
C6	Fucitol,	15	167	131 / 113	8
C7	Volemitol	15	213	81 / 141	12

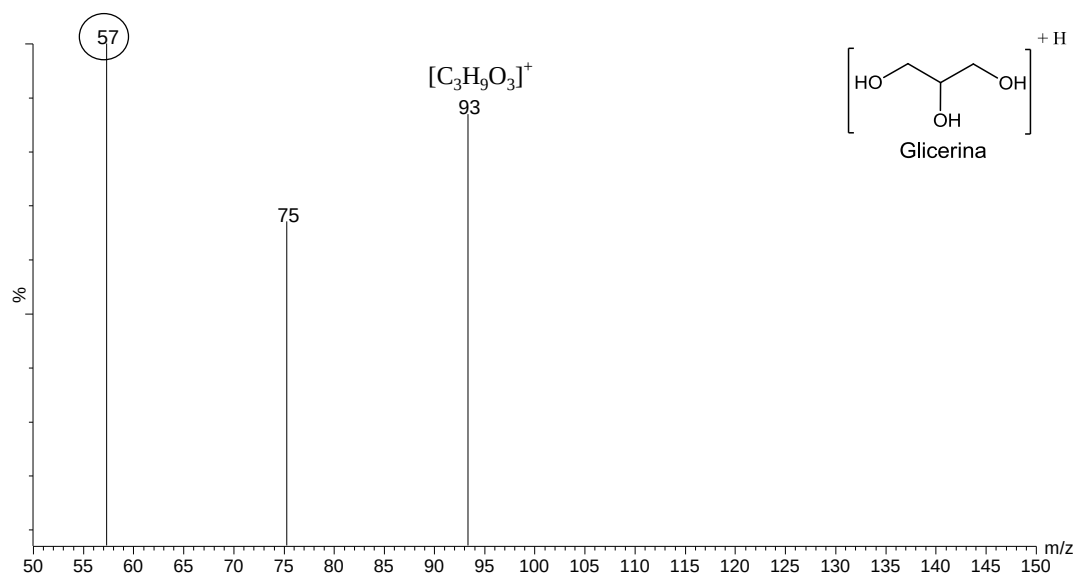


Figura 27. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de glicerina com m/z 93 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

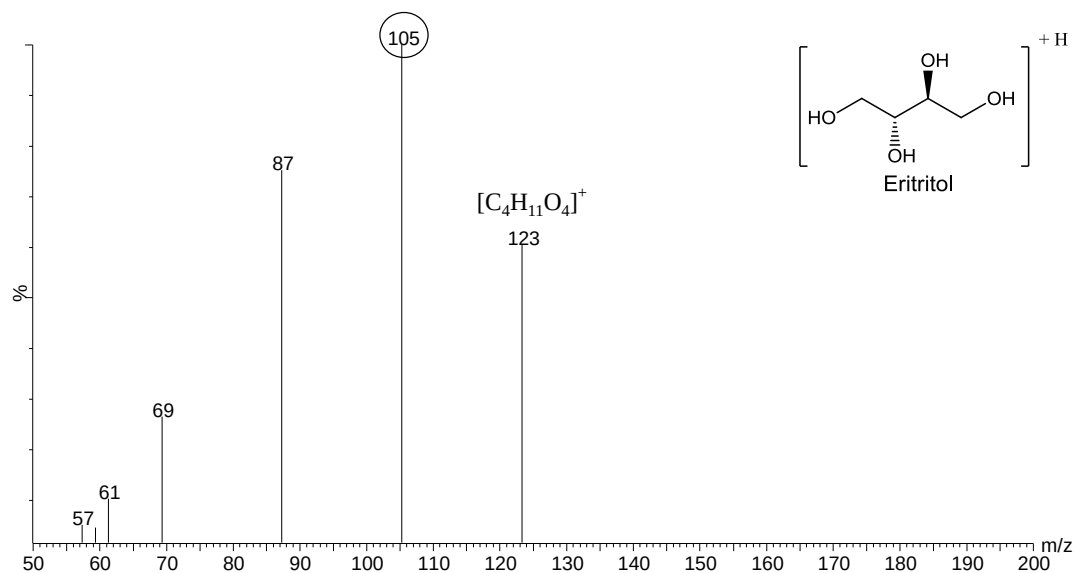


Figura 28. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de eritritol com m/z 123 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

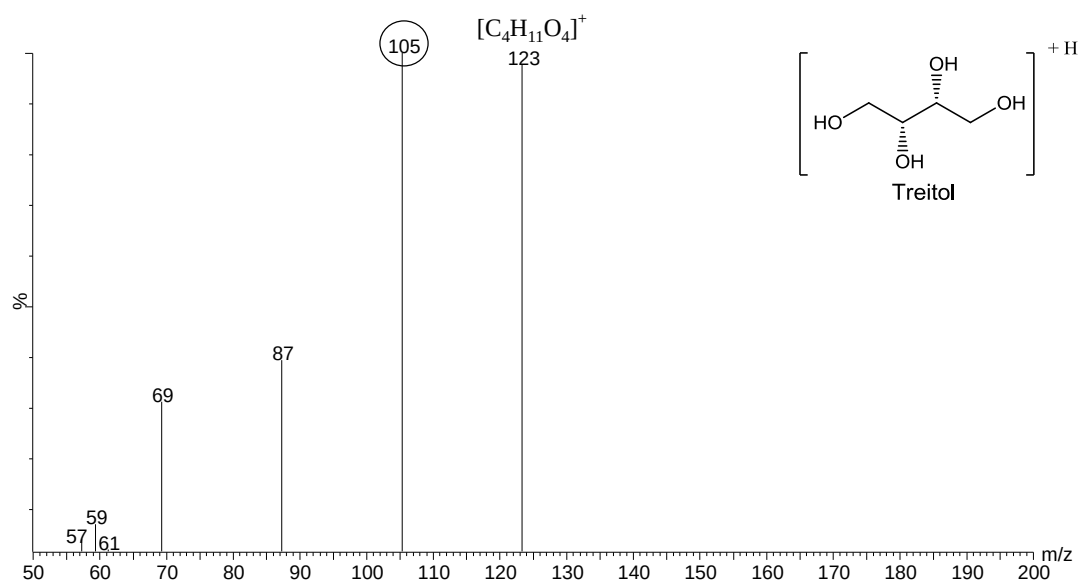


Figura 29. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de treitol com m/z 123 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 6 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

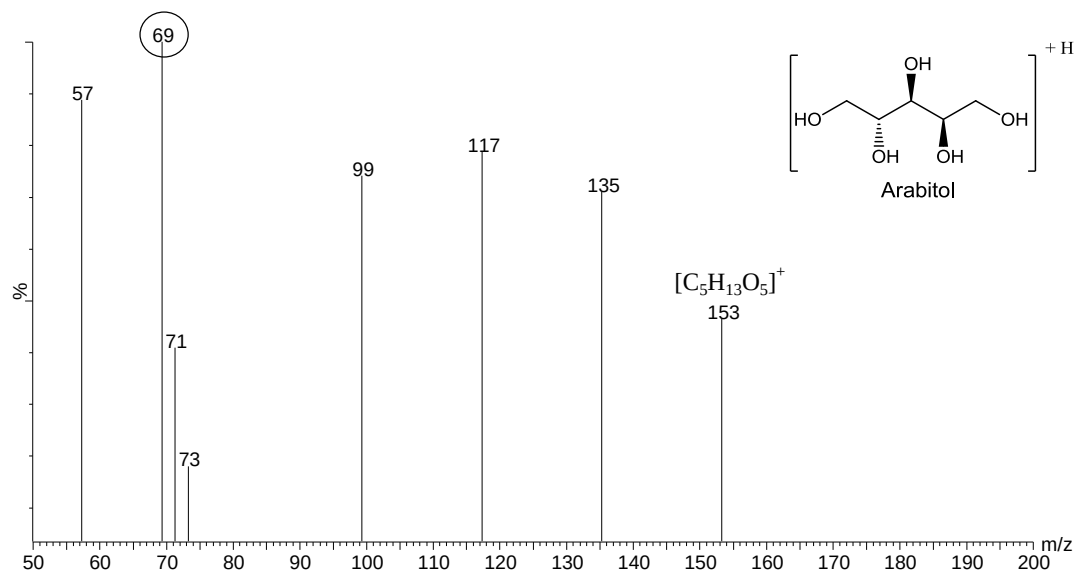


Figura 30. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de arabitól com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

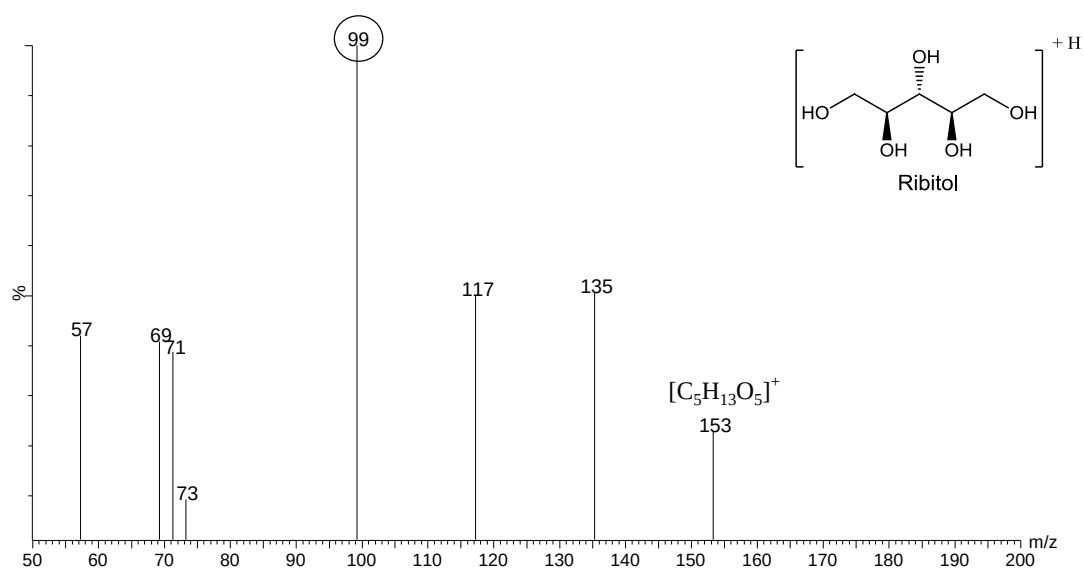


Figura 31. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de ribitol com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

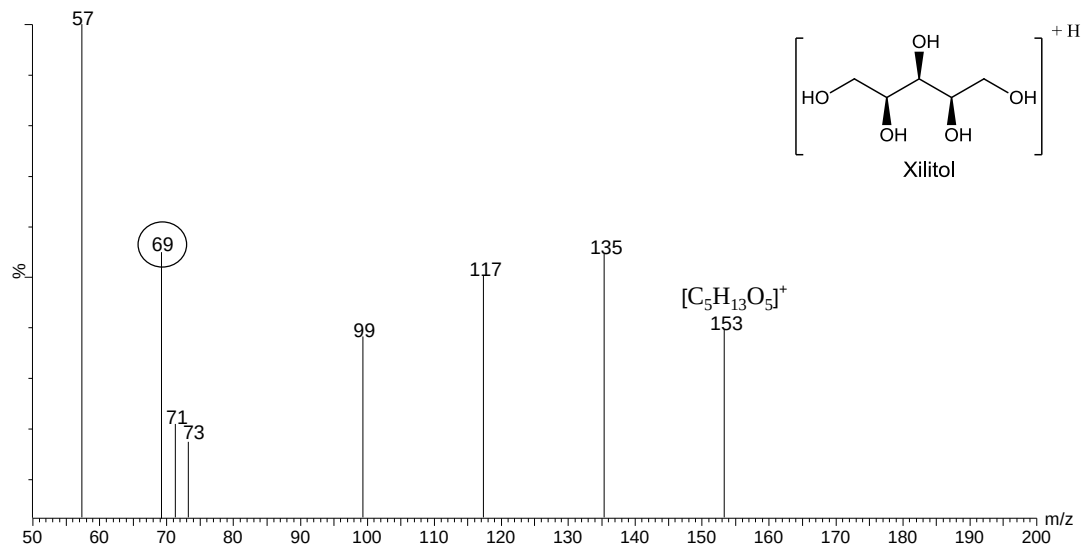


Figura 32. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de xilitol com m/z 153 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 9 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

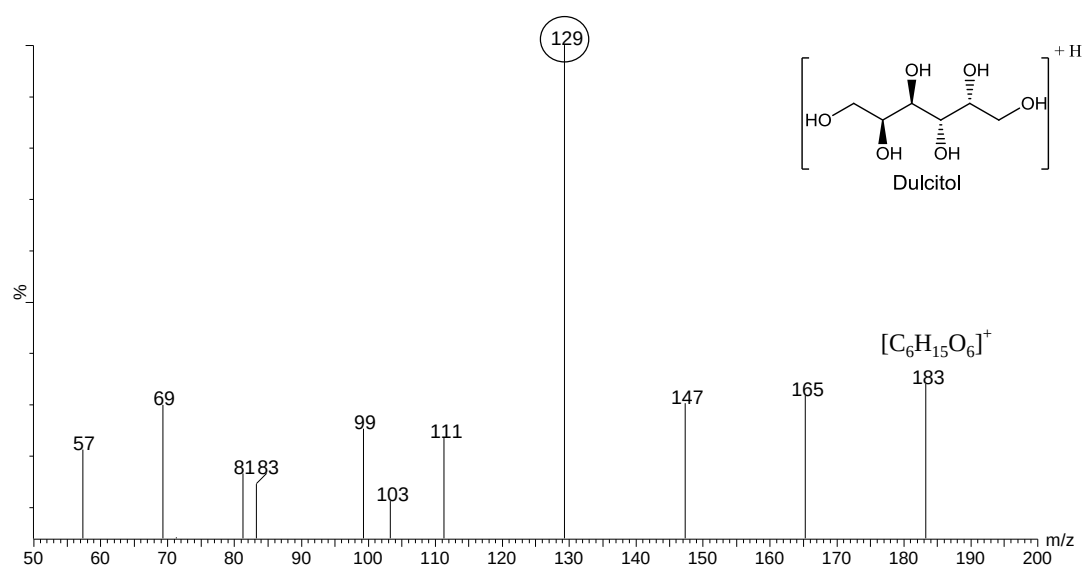


Figura 33. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de dulcitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

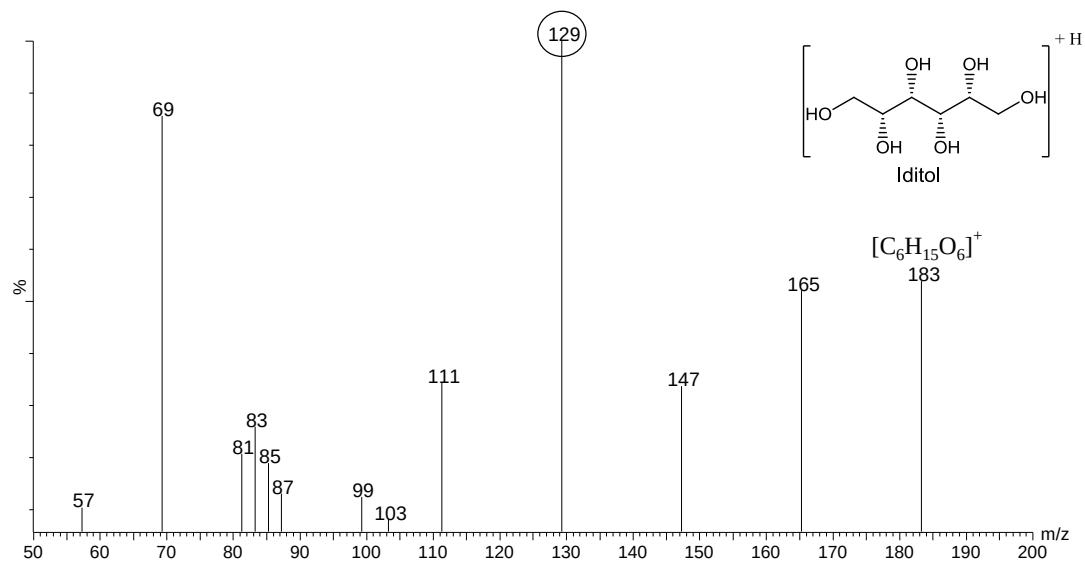


Figura 34. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de iditol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

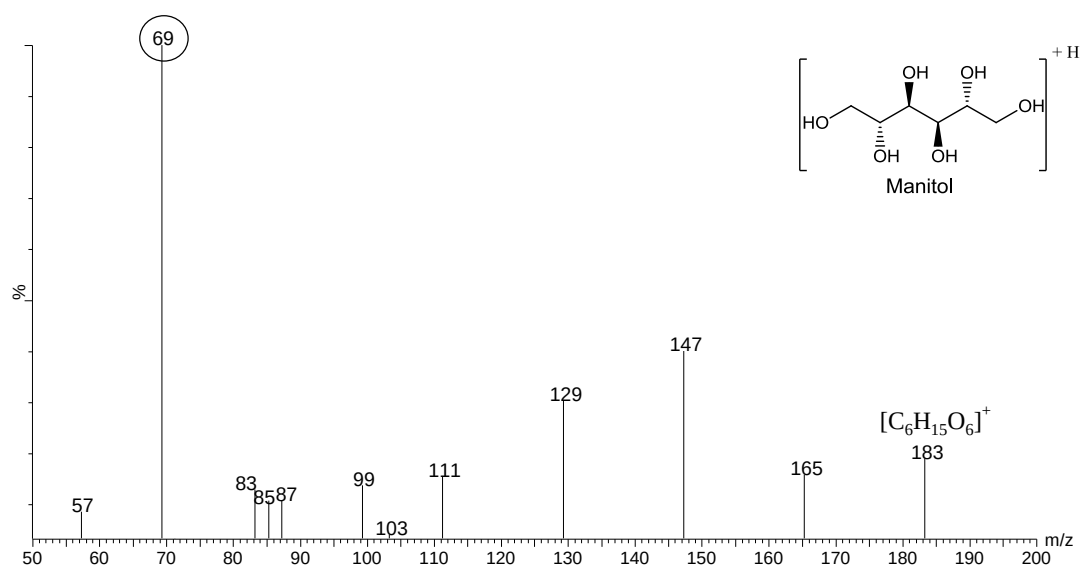


Figura 35. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de manitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

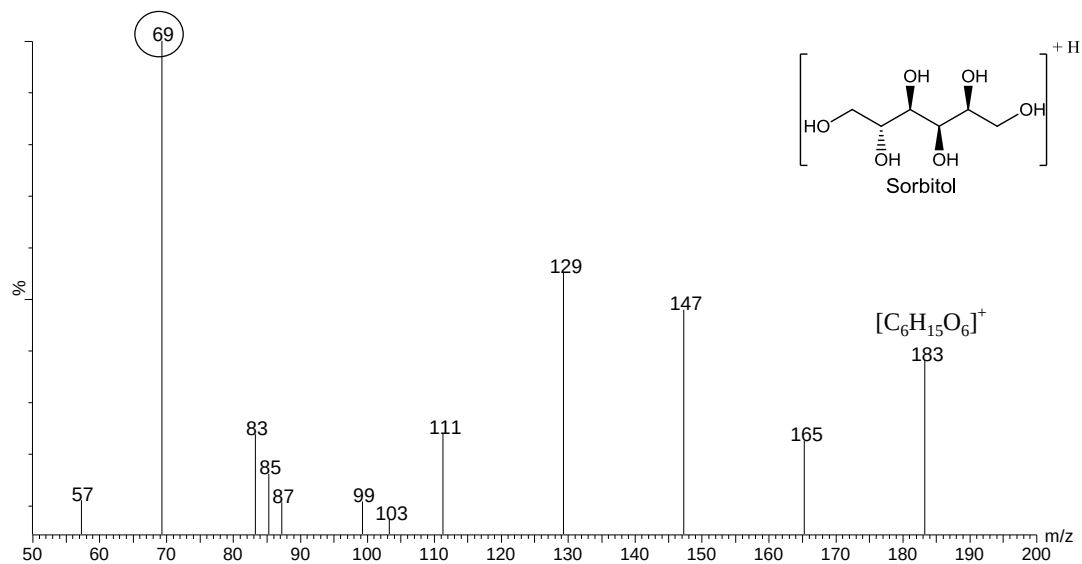


Figura 36. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de sorbitol com m/z 183 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 10 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

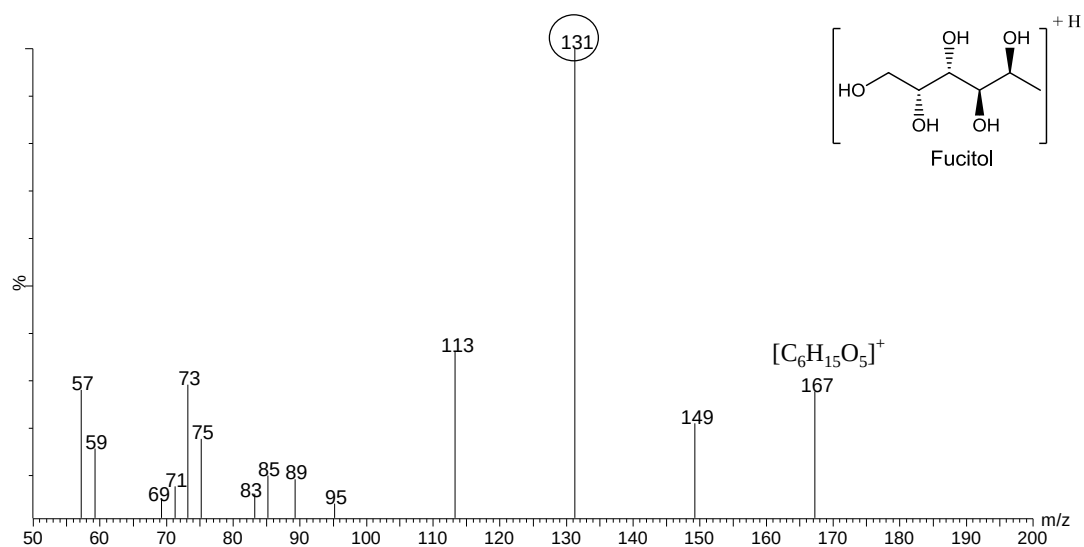


Figura 37. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de fucitol com m/z 167 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 8 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

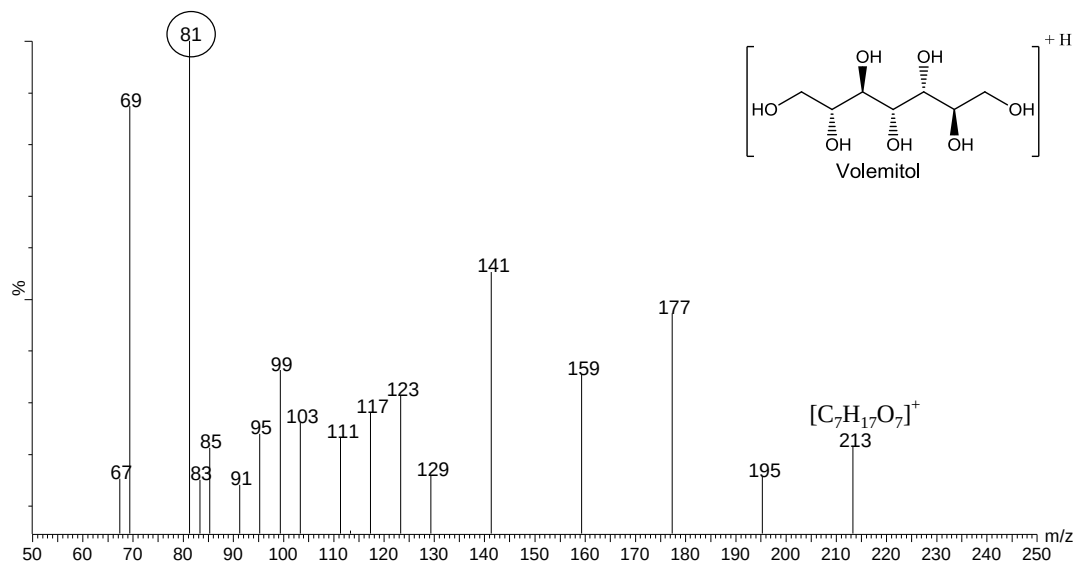


Figura 38. Espectro de massas obtido por ESI(+)-MS/MS para o padrão de volemitol com m/z 213 ($[M+H]^+$) com energia de colisão 12 eV. O fragmento m/z em destaque foi selecionado para o canal de quantificação.

O padrão de fragmentação dos polióis mostrados nas Figuras 27-38 corresponde a reações de eliminação de molécula de água, diferenciando-se, em alguns casos, o fragmento de maior intensidade.

Os isômeros eritritol e treitol, por exemplo, possuem o íon molecular m/z 123 e o mesmo padrão de fragmentação. Os íons fragmento m/z 105, m/z 87 e m/z 66 são resultado da perda de moléculas de água. Nesse caso foi selecionada a transição 123>105 para quantificação tanto de eritritol quanto de treitol.

Para os isômeros arabitól, ribitol e xilitol foram obtidos os mesmos íons fragmentos diferenciando-se na intensidade dos fragmentos. A transição 135>69 foi selecionada para quantificação de arabitól e xilitol, e a transição 135>99 para quantificação do ribitol.

Os isômeros com 6 carbonos, que possuem o íon molecular m/z 183, também apresentaram uma série de eliminações de água e os mesmos íons fragmentos diferenciando-se nas intensidades de cada um. Por isso, diferentes transições foram selecionadas para quantificação. Para o dulcitol e iditol selecionou-se a transição 183>129 e para o manitol e sorbitol, a transição 183> 69.

Para o fucitol, que foi adicionado para ser utilizado como padrão interno, foi selecionada a transição 167>131 e para o volemitol a transição 213>81. A Tabela 16 apresenta os parâmetros otimizados para voltagem do cone, energia de colisão, m/z do íon precursor, m/z do íon fragmento para quantificação e para confirmação.

Dentre os polióis analisados, existem diastereoisômeros, o que torna complexa a correta identificação. Dessa maneira, uma etapa de cromatografia para separação dos compostos torna-se extremamente necessária visto que é a forma de diferenciar os compostos com ocorrência de isômeros. O método cromatográfico utilizado é apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Gradiente cromatográfico utilizado na separação dos 11 polióis.

Tempo (min)	Vazão (mL/min)	Eluente A: H₂O + AF 0,1% (%)	Eluente B: ACN + AF 0,1% (%)
0,00	0,3	5,0	95,0
9,00	0,3	15,0	85,0
15,00	0,3	34,0	66,0
15,01	0,3	5,0	95,0
20,00	0,3	5,0	95,0

O método foi baseado no estudo realizado por Fontes *et al.*, (2016 b) que chegou a uma condição cromatográfica em que os polióis C4, C5, C6 e C7 são separados a partir da utilização de duas temperaturas diferentes utilizando o sistema HILIC-UHPLC-ELSD.

Nesse método, o par de compostos iditol e sorbitol são separados, mesmo que parcialmente, na temperatura de 73°C, enquanto que a temperatura ideal de separação para os demais polióis é 30°C. A identificação desse grupo de compostos é um desafio, pois além de serem isômeros, possuem padrões de fragmentação semelhantes. A Figura 39 mostra os cromatogramas de MRM obtidos a partir de uma solução contendo os 11 polióis analisados e da glicerina no método cromatográfico da Tabela 17 e com o método MRM otimizado (Tabela 16) nas temperaturas de 30°C e 73°C.

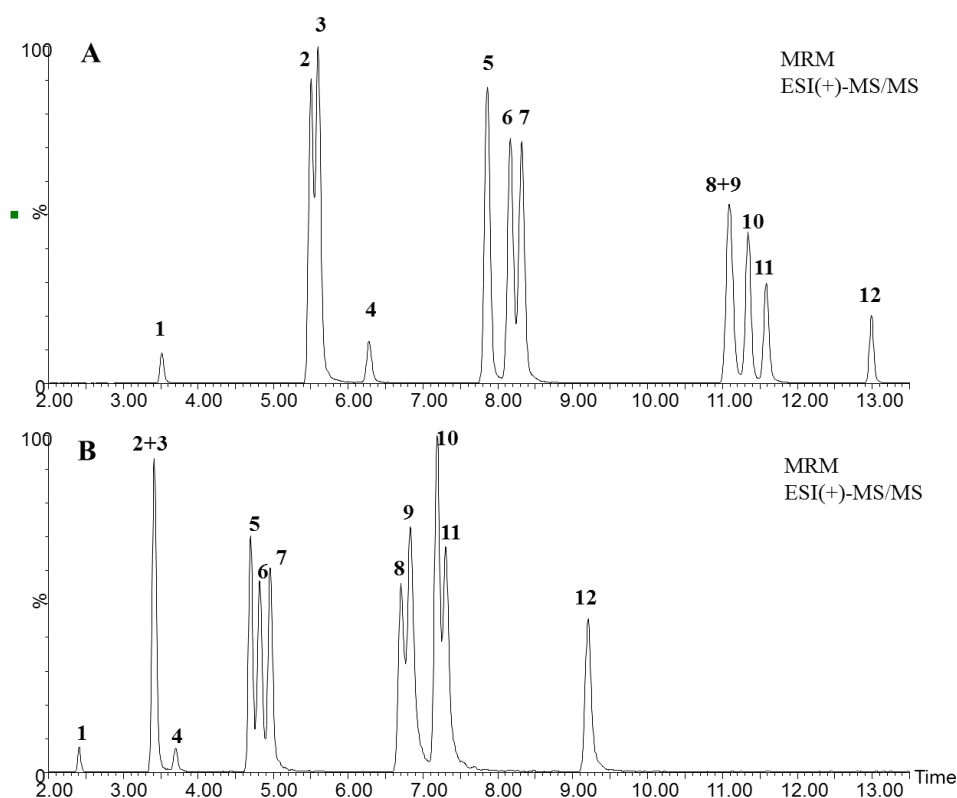


Figura 39. Cromatograma ESI(+)-MS/MS referente aos padrões de polióis a 5 µg/mL (1- glicerina, 2-eritritol, 3-treitol, 5-ribitol, 6-xilitol, 7-arabitol, 8-iditol, 9-sorbitol, 10-manitol, 11-dulcitol, 12-volemitol) e do 4-fucitol a 1 µg/mL. (A) Cromatograma a 30°C e (B) cromatograma a 73°C.

Observa-se que o uso da temperatura de 30°C permite a identificação de todos os polióis com exceção do par C6: iditol e sorbitol, que coeluem completamente nessa condição (Figura 39.A). No entanto, a separação desse par de isômeros é favorecida pelo uso da temperatura de 73°C (Figura 39.B). Assim, padronizou-se a realização das análises dos polióis à temperatura de 30°C e o uso da temperatura de 73°C somente para os casos em que fosse constatada a presença dos polióis C6: iditol ou sorbitol, de modo a realizar sua correta identificação.

Na Figura 39, nota-se que alguns isômeros eluem próximos uns dos outros, como pode ser observado para o par C4: eritritol e treitol. No entanto, essa proximidade não gera prejuízos para o método de análise, visto que se adotou o procedimento de coinjeção com padrões para confirmar a identidade dos analitos nas amostras. Esse ensaio foi realizado a partir da adição de padrão analítico à amostra. O aumento na intensidade do pico investigado indica a presença da substância correspondente ao padrão nas amostras. Em contrapartida, o surgimento de outro pico indica que a substância presente na amostra não corresponde ao padrão adicionado. Assim, além da comparação do tempo de retenção dos analitos com padrões analíticos, foi utilizado o procedimento de coinjeção com padrões para comprovação da identidade da substância nas amostras.

Os métodos apresentados são capazes de analisar satisfatoriamente os polióis eritritol, treitol, ribitol, xilitol, arabitól, iditol, sorbitol, manitol, dulcitol, volemitol e o glicerina em 20 min.

Método isocrático para análise de glicerina

O método apresentado pela Tabela 17 é capaz de analisar glicerina, eritritol, treitol, ribitol, xilitol, arabitól, iditol, sorbitol, manitol, dulcitol e volemitol em 20 min. No entanto, análises que pretendam quantificar somente glicerina, podem ser realizadas em menor tempo. Como a glicerina é o primeiro composto a ser eluído, não é necessário utilizar o gradiente indicado para separação dos polióis C4-C7. Assim, foi desenvolvido um método rápido de análise desse analito.

Utilizou-se o modo de eluição isocrático. Foram investigadas condições de eluição semelhantes às do método utilizado para os polióis: as proporções de 92:8 (A:B) e 95:5 (A:B) da fase móvel H₂O +AF 0,1% (A) e ACN +AF 0,1% (B). A Figura 40 mostra os cromatogramas da solução de glicerina a 25 µg/mL, o tempo de retenção do pico e a intensidade obtida em cada uma das condições. Por fornecer uma maior intensidade e menor tempo de retenção, optou-se por trabalhar na condição de 92:8 (A:B) (Figura 40.A).

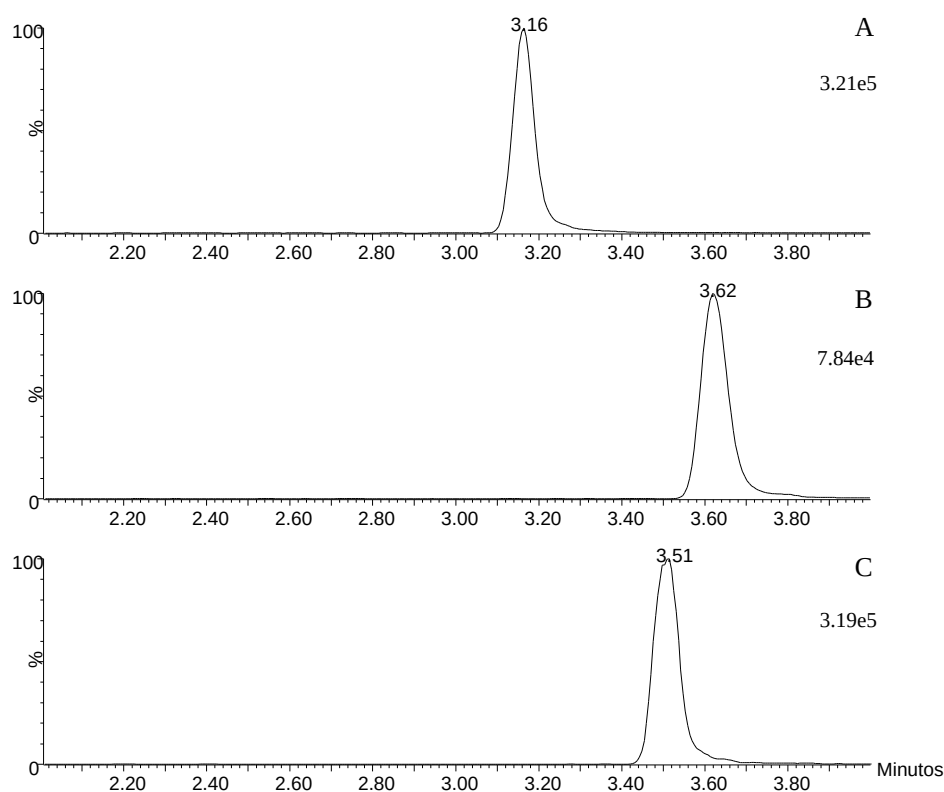


Figura 40. Cromatograma dos canais de MRM padrão de glicerina com m/z 93 ($[M+H]^+$) a 25 µg/mL utilizando: (A) eluição isocrática com 92:8 (H₂O +AF 0,1% : ACN +AF 0,1%); (B) eluição isocrática com 95:5 (H₂O +AF 0,1% : ACN +AF 0,1%); (C) eluição no gradiente mostrado na Tabela 17.

CAPÍTULO 3:

Determinação de compostos químicos produzidos a partir de glicerina por rotas biotecnológicas

Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados na análise de diferentes amostras para identificação e quantificação dos compostos-alvo de interesse. Foram analisadas mais de duas mil (2.000) amostras ao longo desse trabalho, provenientes de processos de bioconversão da glicerina e/ou xilose/glicerina bioconvertidas por leveduras, fungos filamentosos e bactérias, utilizando diferentes condições reacionais.

Os resultados obtidos foram utilizados na seleção de microrganismos potenciais para a produção dos compostos-alvo e na otimização de processo para obtenção desses compostos, a partir do processo de bioconversão. Os dados referentes aos microrganismos e às condições reacionais dos processos de bioconversão são protegidos e os códigos utilizados neste trabalho são apresentados na Tabela 4.

Análises por UHPLC-PDA

O método UHPLC-PDA para análise dos ácidos orgânicos foi utilizado no monitoramento da produção dos compostos-alvo em amostras que se mostraram promissoras a partir das análises de DI-HRMS. As amostras foram obtidas por

bioconversão de diferentes tipos de microrganismos pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa Agroenergia (Brasília, DF). Os ácidos orgânicos produzidos em maior quantidade foram: ácido cítrico, ácido láctico, ácido xilônico e ácido kójico.

A quantificação de ácido cítrico foi realizada em amostras de bioconversão de glicerina obtidas de várias fontes, sempre na concentração inicial de 30 g/L: glicerina industrial 1, glicerina industrial 2, glicerina industrial 3. A fermentação foi realizada a partir de fungos filamentosos codificados como LQB-001, LQB-002, LQB-003 e LQB-004.

O ácido cítrico é tradicionalmente produzido por via fermentativa a partir do fungo *Aspergillus niger*. Como substratos comumente empregados pode-se citar o melaço de cana e de beterraba (Soccol *et al.*, 2006; Sivasankaran *et al.*, 2015). O mercado de ácido cítrico é considerado um dos de maior crescimento na indústria biotecnológica. Grandes quantidades de ácido cítrico são utilizadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica, assim como na produção de polímeros, corantes e papel (Kamzolova e Morgunov, 2017). A obtenção de ácido cítrico a partir de fontes renováveis e baratas de carbono, como resíduos agroindustriais, oferece vantagens como a redução nos custos de produção. No entanto, há muitos trabalhos que utilizam açúcares como fonte de carbono e ainda há poucos dados disponíveis com a utilização da glicerina (Rymowicz *et al.*, 2006; Ozdal e Kurbanoglu, 2018).

Dentre os compostos monitorados pelo método desenvolvido, apenas o ácido cítrico foi encontrado nessas amostras, o que demonstra a seletividade dos microrganismos. O gráfico da Figura 41 apresenta a concentração final de ácido cítrico produzido a partir da bioconversão de glicerina por fungos filamentosos em que R1, R2 e R3 representam as réplicas biológicas. A Figura 42 mostra os cromatogramas obtidos na análise com a identificação do pico de ácido cítrico.

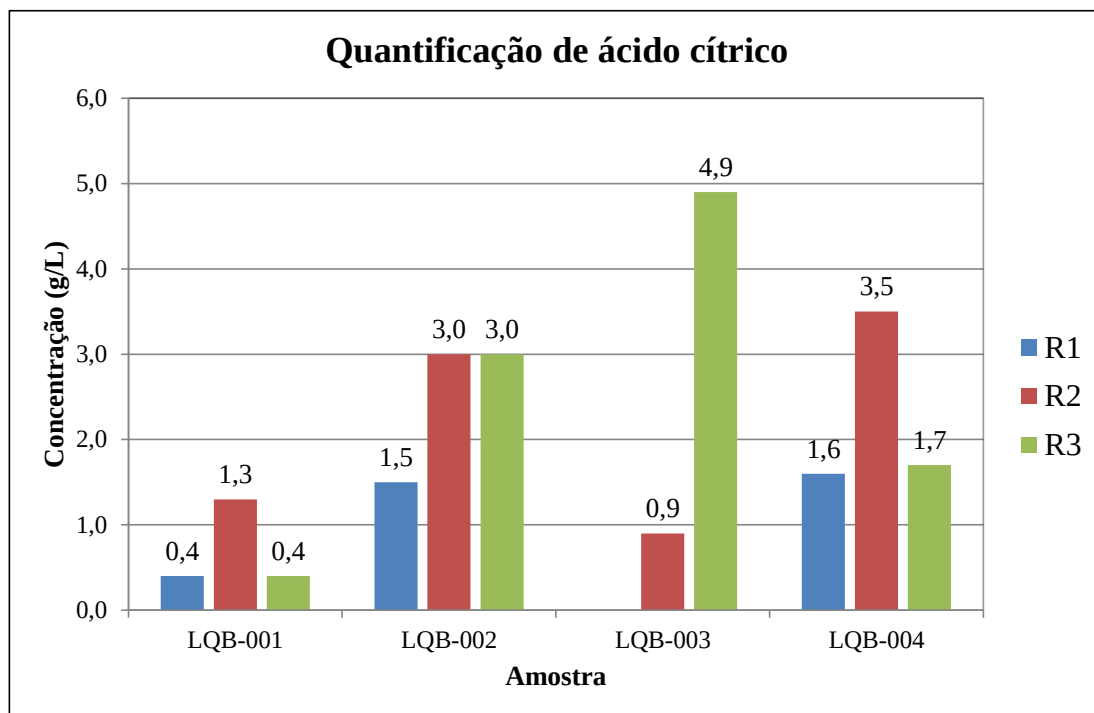


Figura 41. Gráfico com a concentração de ácido cítrico produzida nas amostras LQB-001, LQB-002, LQB-003 e LQB-004 a partir de bioconversão de diferentes tipos de glicerina a 30 g/L por fungos filamentosos. Dados obtidos em triplicata biológica de fermentação (R1, R2 e R3).

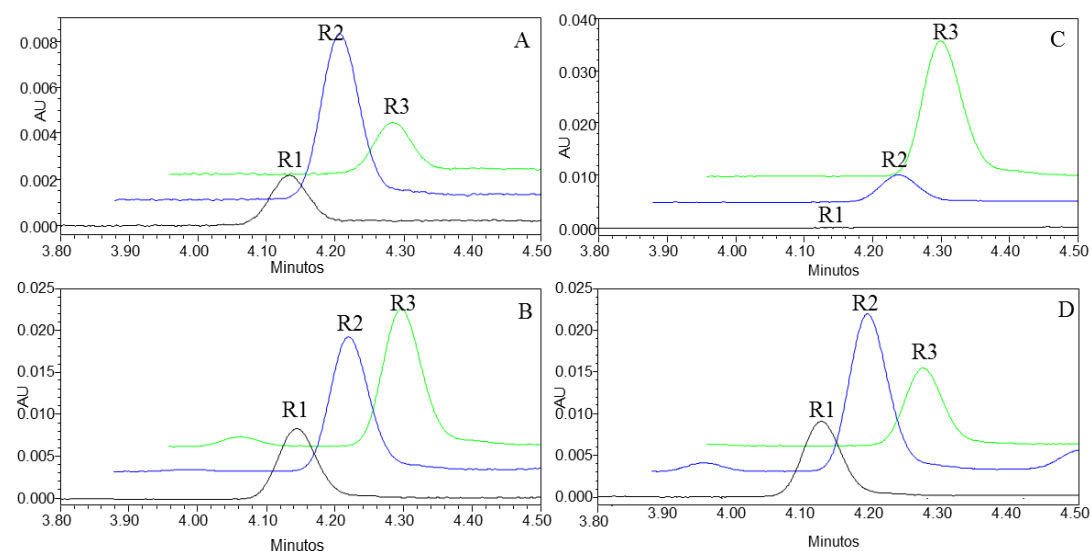


Figura 42. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA de ácido cítrico identificados em amostras de bioconversão obtidas em triplicata biológica (R1, R2, R3) de quatro diferentes fungos filamentosos: LQB-001 (A), LQB-002 (B), LQB-003 (C), LQB-004 (D).

Como pode ser visto na Figura 41, a amostra LQB-003 apresentou produção elevada de ácido cítrico, chegando até 4,9 g/L. De oito linhagens de leveduras avaliadas, as quatro indicadas na Figura 41, mostraram-se capazes de consumir glicerina para produção de ácido cítrico. No entanto, houve baixa reprodutibilidade entre as réplicas biológicas.

Outros grupos reportaram produção de ácido cítrico a partir de glicerina. West (2013) obteve uma condição ótima que empregou 60 g/L de glicerina com produção de até 11,3 g/L de ácido cítrico, o que demonstra o potencial de utilização da glicerina para obtenção desse metabólito.

O ácido láctico foi identificado e quantificado em amostras de bioconversão que empregaram 40 g/L de glicerina industrial 1 e linhagem de bactéria selvagem da coleção de trabalho da Embrapa Agroenergia.

Esse composto possui vasta aplicação industrial. Possui utilização na indústria alimentícia, na indústria farmacêutica e de cosméticos, na indústria química como blocos construtores e na produção de polímeros biodegradáveis. O consumo de ácido láctico pelo mercado global tem aumentado a uma taxa de 16,2% ao ano. Em 2016 foram utilizados 1220,0 kt de ácido láctico e espera-se que a demanda atinja 1960,1 kt em 2025 (de Oliveira *et al.*, 2018).

O principal método de produção dessa substância é a fermentação bacteriana, usado em cerca de 90% do ácido láctico produzido mundialmente. Apesar de ser um produto já consolidado no mercado mundial, a indústria do ácido láctico ainda tem muitos desafios a serem superados, principalmente em relação ao alto custo dos carboidratos utilizados como substrato e às exigências nutricionais das bactérias utilizadas. Sabe-se que microrganismos são capazes de consumir glicerina para produzir ácido láctico. No entanto, a conversão direta, sem a utilização de microrganismos geneticamente modificados ainda é considerada um desafio (de Oliveira *et al.*, 2018).

O gráfico da Figura 43 mostra a concentração de ácido láctico quantificado em amostras oriundas da fermentação por bactéria. Não foram geradas replicatas biológicas para esse experimento. Os códigos (LQB-005, LQB-006, LQB-007, LQB-008, LQB-009, LQB-010, LQB-011, LQB-012, LQB-013, LQB-014, LQB-015, LQB-016 e LQB-017) representam as diferentes condições reacionais empregadas.

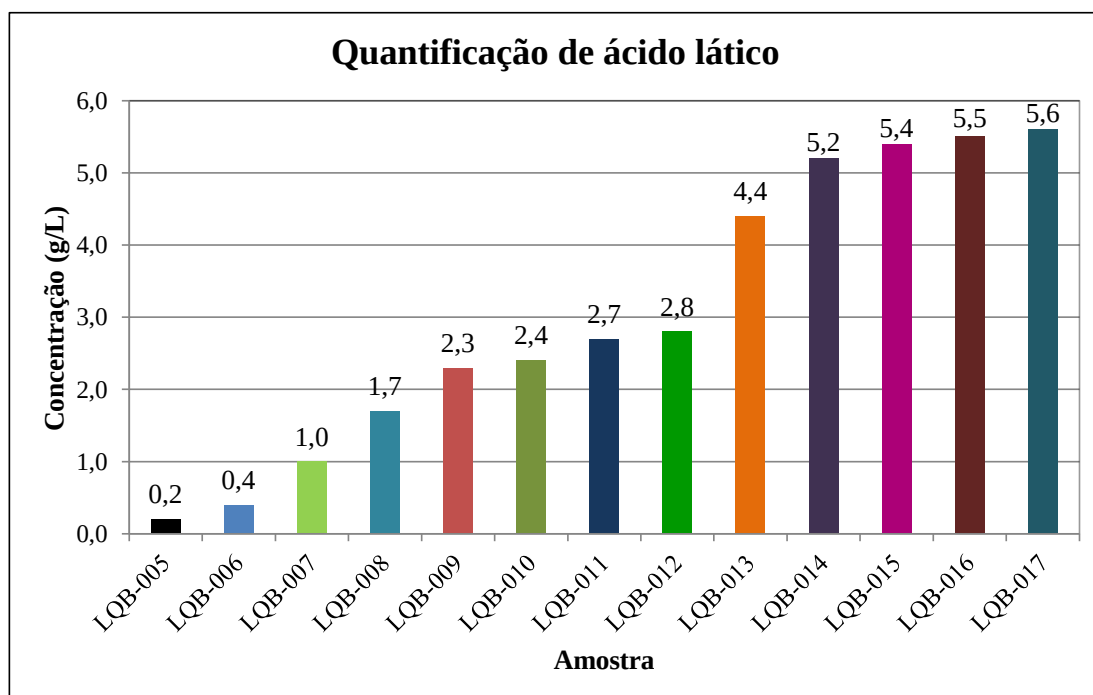


Figura 43. Gráfico de concentração de ácido láctico em diferentes amostras obtidas por bioconversão de glicerina industrial 1 a 40 g/L por bactéria.

De diferentes condições avaliadas de bioconversão de glicerina por bactéria, nas 13 amostras indicadas na Figura 43, foi possível obter ácido láctico a partir dessa matéria-prima. A partir do gráfico da Figura 43, observa-se que das 13 amostras, cinco apresentaram produção de ácido láctico superior a 5,0 g/L, entre 5,2 e 5,6 g/L.

A utilização da glicerina como fonte de carbono traz vantagens diante de outras fontes utilizadas atualmente para produção de ácido láctico, tais como glicose, lactose, maltose e sacarose. A glicerina é uma matéria prima abundante e barata, o que contribui para redução dos custos de produção do ácido láctico, podendo substituir esses carboidratos nos processos de fermentação empregados industrialmente (da Silva *et al.*, 2009; de Oliveira *et al.*, 2018).

A produção de ácido xilônico foi monitorada em amostras de leveduras submetidas a processos biotecnológicos. O ácido xilônico é um composto valioso devido a suas aplicações em diversos campos. Pode ser utilizado como precursor na biossíntese do 1,2,4-butanotriol, como aditivo na produção de concreto, e como agente quelante. Esse metabólito é naturalmente produzido por algumas bactérias pela ação da enzima d-xilose desidrogenase ou d-glicose desidrogenase. Entretanto, a

utilização de bactérias para produção dessa substância possui algumas limitações, tais como exigências nutricionais complexas, não possuindo um bom custo benefício para produção industrial. Pesquisas têm investigado microrganismos alternativos para produção de ácido xilônico pela introdução de genes que produzem esse composto em diferentes microrganismos (Toivari *et al.*, 2012).

Neste trabalho, leveduras transformadas com diferentes genes foram avaliadas para produção de ácido xilônico em meio contendo xilose e/ou glicerina como fonte de carbono. Como resultado, foram identificadas linhagens produtoras de ácido xilônico. O gráfico da Figura 44 mostra o resultado da quantificação de ácido xilônico em duas linhagens de leveduras transformadas com dois genes diferentes: LQB-018, LQB-019, e submetidas ao processo de fermentação em meio contendo 10 g/L de glicerina industrial e 40 g/L de xilose por 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46, 50 horas. Ressalta-se que não foram geradas replicatas biológicas para esse experimento.

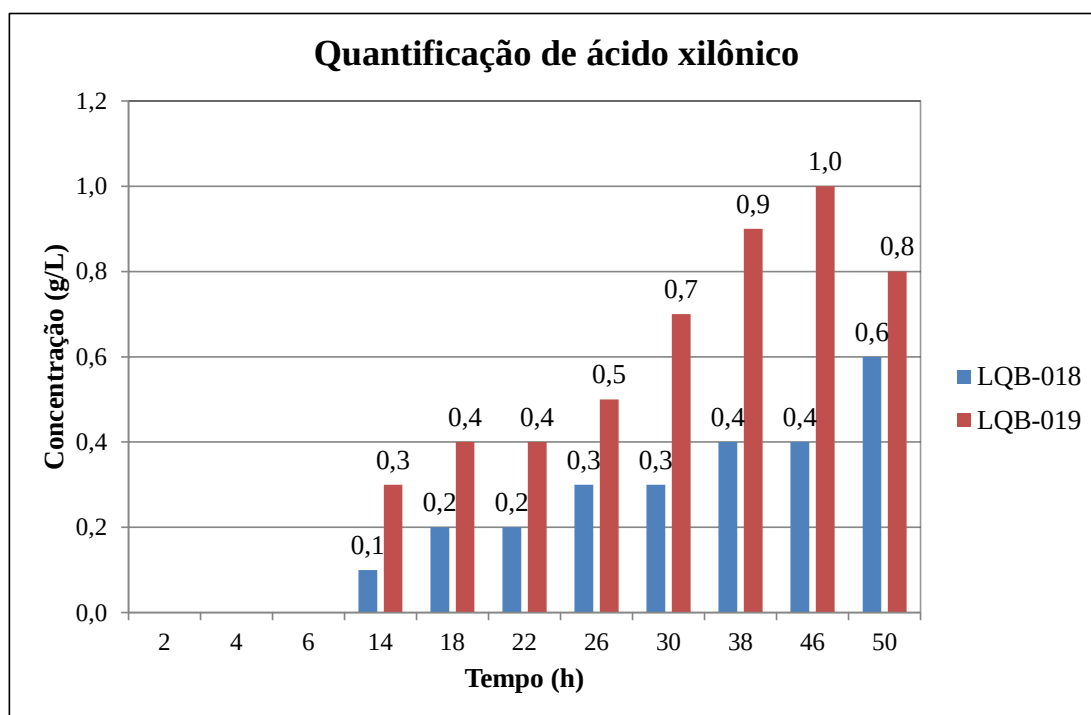


Figura 44. Gráfico de monitoramento da produção de ácido xilônico pelos microrganismos LQB-018 e LQB-019 em 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46, 50 horas de bioconversão em meio contendo 10 g/L de glicerina industrial e 40 g/L de xilose.

A análise dos dados obtidos na quantificação (Figura 44) mostrou uma produção superior de ácido xilônico pelo microrganismo LQB-019. Em 46h de bioconversão, a produção de ácido xilônico foi de 1,0 g/L pela levedura LQB-019, e de 0,4 g/L pela levedura LQB-018.

A Figura 45 mostra os cromatogramas obtidos a partir da análise dessas duas leveduras em 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46, 50h de bioconversão.

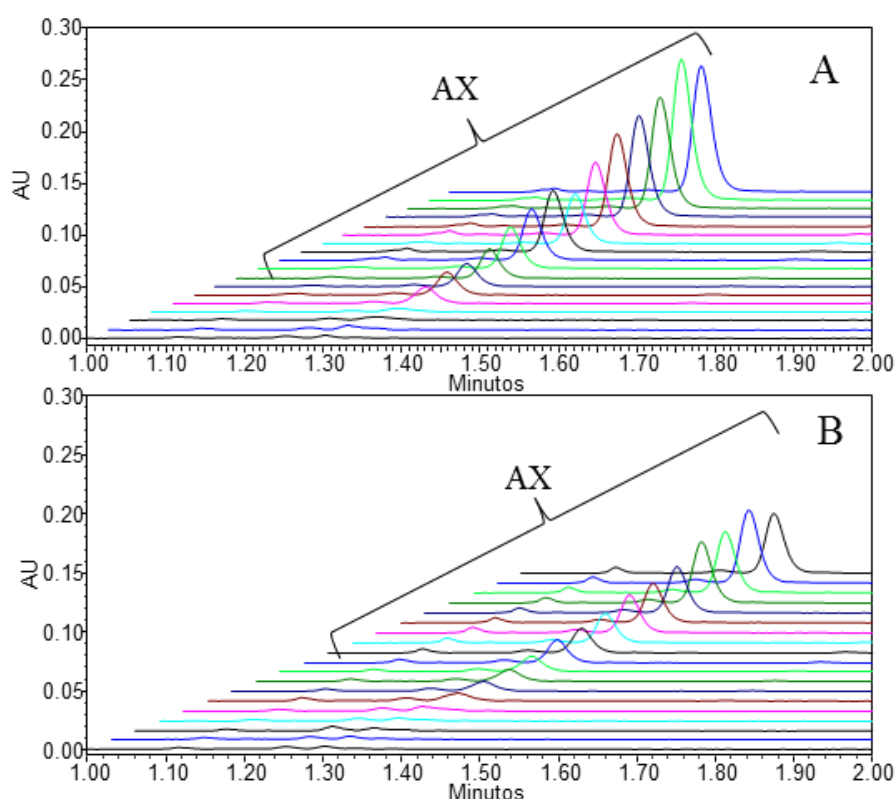


Figura 45. Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA de ácido xilônico (AX) identificados em amostras de fermentação obtidos de dois microrganismos diferentes: (A) LQB-018, (B) LQB-019 em 2, 4, 6, 14, 18, 22, 26, 30, 38, 46 e 50h de bioconversão, mostrados de baixo para cima.

Diversas linhagens de leveduras foram analisadas durante esse trabalho. A aplicação da metodologia permitiu a identificação daquelas que expressaram os genes produtores de ácido xilônico, sendo as mostradas no gráfico da Figura 44 promissoras para produção desse composto. Assim, os resultados obtidos apontaram novos genes que são capazes de utilizar as fontes de carbono e produzir o composto alvo.

Por fim, o método desenvolvido foi aplicado para a identificação e quantificação do ácido kójico em amostras de bioconversão de glicerina por fungos filamentosos. O ácido kójico é um valioso composto produzido a partir de diferentes espécies de fungos. Possui aplicação na indústria médica, pela ação antibacteriana e antifúngica, e tem se destacado na indústria cosmética por sua eficácia no clareamento de manchas de pele (Chaudhary *et al.*, 2014).

O método UHPLC-PDA foi aplicado em amostras de fungos filamentosos com o objetivo de selecionar os microrganismos que forneciam a maior produção e as melhores condições experimentais de bioconversão de glicerina para ácido kójico. A partir destes resultados dois fungos filamentosos foram selecionados, LQB-020 e LQB-021.

A partir das análises realizadas com o método desenvolvido, foi possível otimizar e selecionar as melhores condições de fermentação. A Figura 46 mostra o gráfico construído com os dados obtidos na quantificação das amostras destes fungos em duas condições que forneceram elevada produção de ácido kójico. As amostras foram geradas com 5 e 10 dias de bioconversão e empregaram 60 g/L de glicerina industrial. Os códigos C1 e C2 representam as condições de cultivo e R1, R2 e R3 representam as réplicas biológicas.

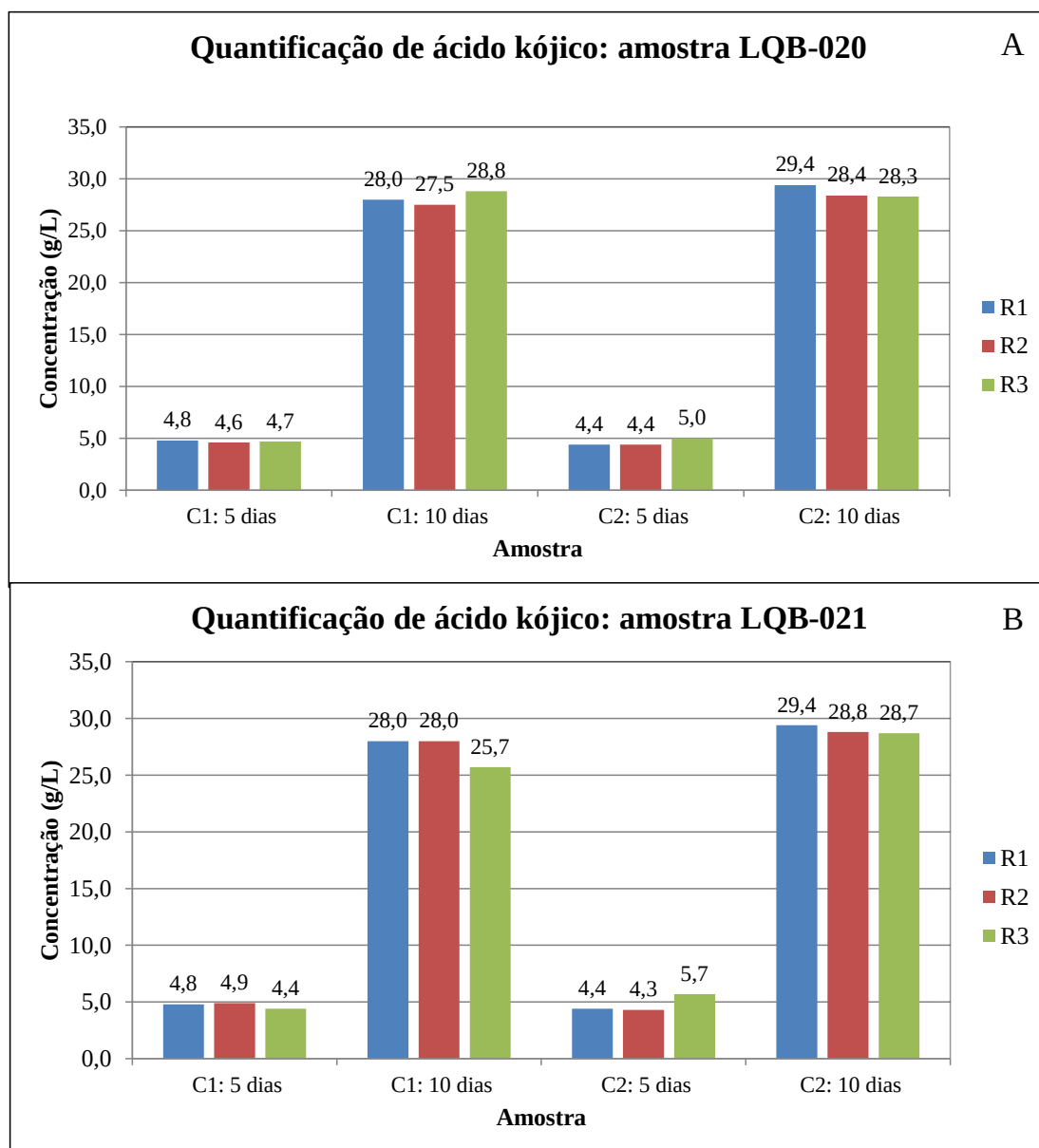


Figura 46. Gráfico de produção de ácido kójico pelos microrganismos LQB-020 (A) e LQB-021 (B) com 5 e 10 dias de bioconversão de glicerina industrial a 60 g/L, em que C1 e C2 representam as condições de cultivo e R1, R2 e R3 representam as réplicas biológicas.

A produção média de ácido kójico pelas replicatas, após 5 e 10 dias de cultivo na condição C1, foi de 4,7 e 28,1 g/L pelo microrganismo LQB-020; e de 4,6 g/L e 26,4 g/L pelo microrganismo LQB-021.

A produção média de ácido kójico após 5 e 10 dias de cultivo na condição C2, foi de 4,6 g/L e 28,7 g/L pelo microrganismo LQB-020; e de 4,9 g/L e 28,4 g/L pelo microrganismo LQB-021.

A Figura 47 mostra os cromatogramas obtidos nas análises das amostras C1 com 5 (A) e 10 dias (E) de bioconversão e das amostras C2 com 5 (B) e 10 dias (F) de bioconversão pelo microrganismos LQB-021; das amostras C1 com 5 (C) e 10 dias (G) de bioconversão e amostras C2 com 5 (D) e 10 dias (H) de bioconversão pelo microrganismos LQB-020.

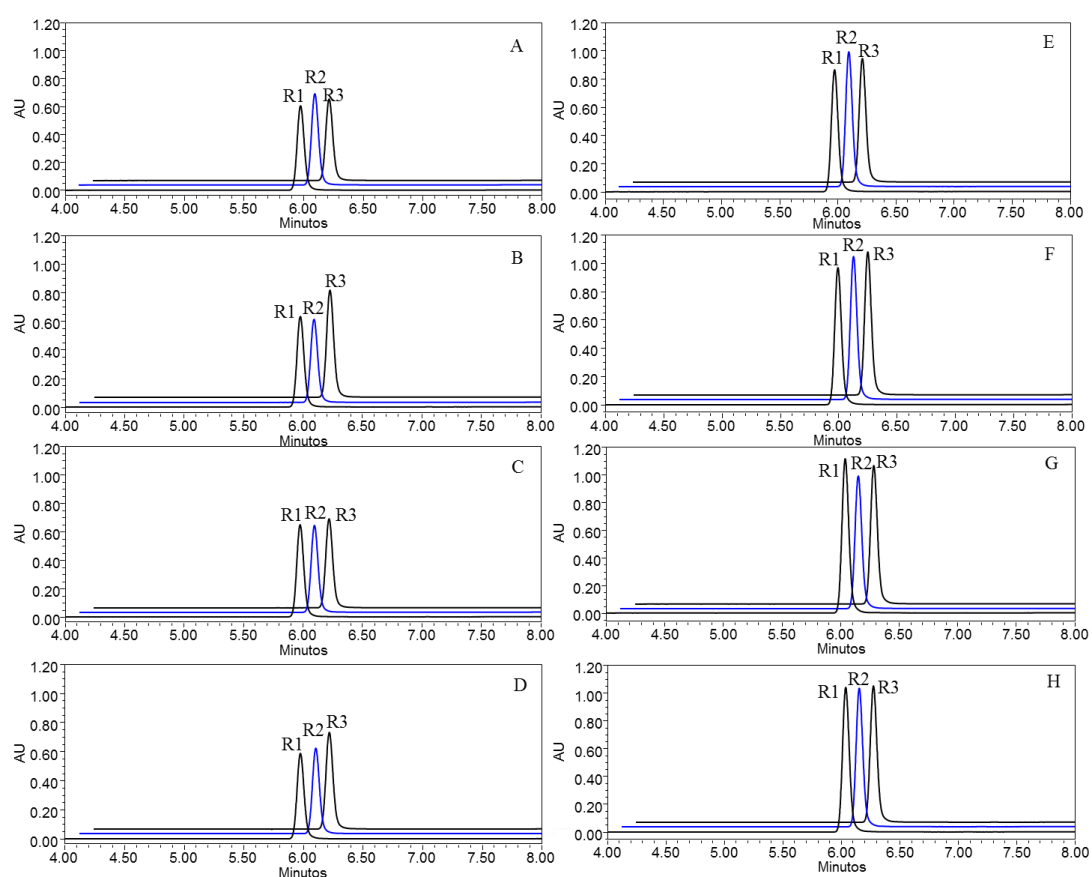


Figura 47. Cromatogramas obtidos nas análises por UHPLC-PDA de ácido kójico identificados em amostras de bioconversão de glicerina (C1 e C2) obtidos por dois microrganismos diferentes: amostra C1 com 5 (A) e 10 dias (E) de bioconversão e amostra C2 com 5 (B) e 10 dias (F) de bioconversão pelo microrganismos LQB-021; amostra C1 com 5 (C) e 10 dias (G) de bioconversão e amostra C2 com 5 (D) e 10 dias (H) de bioconversão pelo microrganismos LQB-020.

Com a aplicação da metodologia desenvolvida foram avaliadas diferentes condições para otimização da etapa de fermentação, sendo as condições C1 e C2 indicadas na Figura 46 como as mais adequadas para a produção de ácido kójico (4,6 – 28,7 g/L). Outros resíduos agroindustriais têm sido investigados para produção de ácido kójico. El-Kady e colaboradores (2014) obtiveram uma elevada produção de ácido kójico, 53,5 g/L, a partir de 100 g/L de glicose. No entanto, utilizando glicerina como fonte de carbono, foi reportado uma produção de 29 g/L utilizando 100 g/L de glicerina na condição otimizada (Mattam *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos com a aplicação do método indicaram que os microrganismos selecionados são capazes de consumir glicerina como única fonte de carbono e produzir ácido kójico e que as condições de cultivo selecionadas garantem uma elevada produtividade dessa substância quando comparado com outros trabalhos.

Análises por UHPLC-MS

O método UHPLC-MS de análise de polióis foi utilizado pelo grupo da Embrapa Agroenergia para quantificação desses compostos obtidos através de processos de bioconversão de glicerina por fungos filamentosos. Como não foi identificado pico referente aos compostos iditol e sorbitol nas amostras, apenas o método que utiliza a temperatura de 30°C foi aplicado.

Polióis têm sido cada vez mais utilizados pela indústria de alimentos. Após o sorbitol, o manitol é o segundo poliól mais utilizado nesse ramo (Zada *et al.*, 2017). Essas substâncias oferecem benefícios aos diabéticos pela possibilidade de serem utilizados como substitutos do açúcar, uma vez que possuem pouco efeito na liberação de insulina no organismo. Entre os polióis, o eritritol se destaca por possuir um valor calórico próximo a zero e não induzir alterações nos níveis de insulina no sangue. Além disso, pode causar menos efeitos colaterais comuns aos polióis, tais como distensão abdominal, flatulência e efeito laxativo, por possuir uma dose segura

maior que a de outros polióis. Entretanto, o preço relativamente alto tem limitado o emprego do eritritol pela indústria alimentícia (Rzechonek *et al.*, 2018).

Polióis ocorrem naturalmente em alimentos, porém em baixas quantidades, o que inviabiliza a aplicação industrial a partir de tais fontes. Assim, são produzidos por via química ou biotecnológica. Atualmente, a glicose é o principal substrato utilizado na produção de eritritol. Entretanto, sua obtenção a partir da glicerina pode diminuir os custos de produção (Rzechonek *et al.*, 2018).

Os polióis: eritritol, treitol, arabitol e manitol foram identificados e quantificados em amostras de glicerina bioconvertida por fungos filamentosos. As amostras LQB-022, LQB-023 e LQB-024 foram geradas com 5 e 10 dias de bioconversão, em triplicata biológica, representadas por R1, R2 e R3. A Figura 48 mostra os gráficos construídos com os dados obtidos na quantificação das amostras LQB-022, LQB-023 e LQB-024.

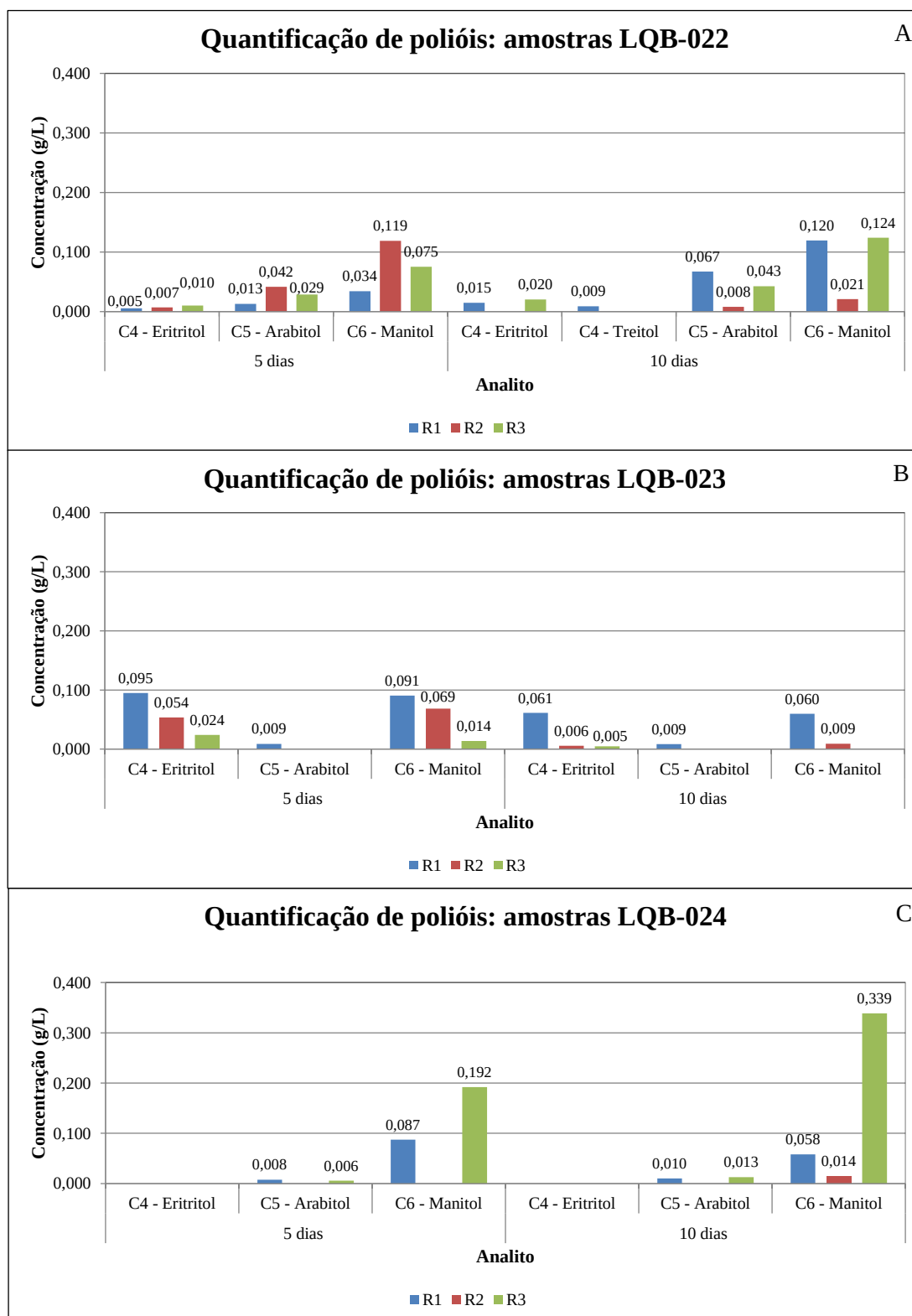


Figura 48. Gráfico de produção de polióis a partir de diferentes amostras de fungos filamentosos: LQB-022 (Figura 48.A), LQB-023 (Figura 48.B), LQB-024 (Figura 48.C), geradas com 5 e 10 dias de bioconversão de glicerina industrial a 40 g/L, em triplicata biológica.

Como é mostrado na Figura 48, foi produzido eritritol pelas amostras LQB-022 e LQB-023. A produção média de eritritol pela amostra LQB-022, foi de 0,008 g/L, após 5 dias de cultivo, e com 10 dias não houve reprodutibilidade entre as réplicas biológicas. Para a amostra LQB-023, foi obtida uma produção média de 0,058 e 0,024 g/L após 5 e 10 dias de cultivo, respectivamente. O isômero treitol também foi detectado, porém apenas uma das replicatas da amostra LQB-022 com 10 dias de cultivo, produziu esse poliols.

Foi identificado arabitól nas amostras LQB-022, LQB-023 e LQB-024 sendo que a amostra LQB-022 mostrou a maior produtividade. Após 5 e 10 dias de cultivo, a produção média de arabitól foi de 0,028 e 0,039 g/L pela amostra LQB-022. Para LQB-023 e LQB-024, no entanto, não houve reprodutibilidade entre as réplicas biológicas.

Manitol foi produzido pelas amostras LQB-022, LQB-023 e LQB-024. Para a amostra LQB-022, a produção média de manitol após 5 e 10 dias de cultivo, foi de 0,076 e 0,088 g/L. Para a amostra LQB-023, a produção média de manitol, após 5 dias de cultivo, foi de 0,058 g/L, e com 10 dias não houve reprodutibilidade entre as réplicas biológicas. A amostra LQB-024 foi a que apresentou a produção mais elevada de manitol, com uma média de 0,137 g/L, após 10 dias de cultivo.

A partir do método utilizado foi possível quantificar os polióis nas amostras de fungos filamentosos e realizar a distinção entre os isômeros produzidos. Apesar da baixa produtividade dos analitos avaliados, sua quantificação é fundamental para avaliação dos métodos produtivos. Assim, o método apresentou sensibilidade satisfatória e mostrou-se adequado para a finalidade para a qual foi desenvolvido.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos de análise baseados em UHPLC para dois grupos de compostos químicos: ácidos orgânicos e polióis. Os compostos monitorados neste estudo possuem polaridades diferentes, com analitos apresentando retenção muito baixa e outros com alta retenção.

O método por UHPLC-PDA demonstrou-se rápido (15 min) e simples para detectar e quantificar dez ácidos orgânicos de cadeia curta (C2-C6): ácido cítrico, ácido fumárico, ácido glicérico, ácido kójico, ácido láctico, ácido mucônico, ácido oxálico, ácido propiônico, ácido succínico e ácido xilônico. A presença de grupos cromóforos na estrutura desses compostos permite que absorvam na região do UV e assim sejam detectados por PDA. Dessa maneira, o detector adotado mostrou-se satisfatório para o objetivo que foi proposto. Esse método oferece diversas vantagens pela abrangência de substâncias capaz de analisar, pela rapidez com que as análises são realizadas e pelo baixo consumo de solvente, com a possibilidade de análise de quase cem amostras em um período de 24 h.

Para garantir a obtenção de resultados confiáveis e de qualidade, o método foi validado e apresentou coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,999, indicando boa linearidade e demonstrou ser preciso e exato, com coeficientes de variação intra-dia e inter-dia inferiores a 4,06%, e recuperação variando de 94,90% a 109,63%.

Dentre as mais de 2000 amostras analisadas por este método, foram identificados potenciais fungos e leveduras que produziram ácido cítrico, ácido kójico, ácido xilônico, e bactérias produtoras de ácido láctico.

Os métodos UHPLC-MS foram desenvolvidos como uma alternativa aos que vinham sendo utilizados pelo grupo para detectar e quantificar esses dois grupos de compostos químicos, mostrando ser até 500 vezes mais sensível que as demais técnicas.

A equipe de pesquisa da Embrapa utilizou o método UHPLC-MS de análise de polióis desenvolvido neste trabalho na quantificação de amostras que, devido à baixa produtividade, não puderam ser quantificadas pelo protocolo HILIC-UHPLC-ELSD. A identificação dos onze polióis é complexa visto que vários deles são diastereoisômeros, e por apresentarem a mesma conectividade entre os ligantes,

apenas com distribuição espacial distinta, são de difícil diferenciação. Os métodos apresentados, que empregaram duas temperaturas para identificação todos os polióis, forneceram a sensibilidade necessária para a identificação e diferenciação dos isômeros dos polióis estudados. Com a aplicação desse método, arabitól, eritritol, manitol e treitol foram identificados e quantificados em amostras de glicerina bioconvertida por fungos filamentosos.

Os métodos analíticos desenvolvidos são úteis para prospecção de microrganismos e otimização dos processos biotecnológicos, para a detecção e quantificação de compostos-alvo em amostras reais de glicerina obtida após bioconversão por microrganismos. Mas podem também ser aplicados na quantificação desses compostos provenientes de outros processos biotecnológicos ou químico-catalíticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. R.; FÁVARO, L. C.; QUIRINO, B. F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for biofuels*, v. 5, n. 1, p. 48, 2012.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 5, p. 2671-2686, 2012.

BOHÁČOVÁ, I; HALKO, R; JANDERA, P. The effects of temperature and mobile phase on the retention of aliphatic carboxylic acids in hydrophilic interaction chromatography on zwitterionic stationary phases. *Journal of separation science*, v. 39, n. 24, p. 4732-4739, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registros e pós-registro de medicamentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 22 de maio de 2012

BRASIL. Resolução CNPE nº 11, de 14 de dezembro de 2016. Dispõe sobre adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 01 de março de 2017.

BUSZEWSKI, B; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.

CHEN, X.; JIANG Z. H.; CHEN S.; QIN W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International journal of biological sciences*, v. 6, n. 7, p. 834, 2010.

CHUAH, L. F.; KLEMEŠ, J. J.; YUSUP, S.; BOKHARI, A.; AKBAR, M. M. A review of cleaner intensification technologies in biodiesel production. *Journal of Cleaner Production*, v. 146, p. 181-193, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

DA SILVA G. P.; MACK M.; CONTIERO J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

DE OLIVEIRA, R. A.; KOMESU, A.; ROSSEL C. E. V., MACIEL FILHO, R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 2018.

DE SENA AQUINO, A. C. M; AZEVEDO, M. S.; RIBEIRO, D. H. B.; COSTA, A. C. O.; AMANTE, E. R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food chemistry*, v. 172, p. 725-730, 2015.

DONG, M. W.; ZHANG, K. Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 63, p. 21-30, 2014.

EL-KADY I. A.; ZOHRI A. Naser A.; HAMED S. R. Kojic acid production from agro-industrial by-products using fungi. *Biotechnology research international*, v. 2014, 2014.

ELZANFALY, E. S. HEGAZY, M. A.; SAAD, S. S.; SALEM, M. Y.; ABD EL FATTAH, L. E. Validated green high-eficiência liquid chromatographic methods for the determination of coformulated pharmaceuticals: A comparison with reported conventional methods. *Journal of separation science*, v. 38, n. 5, p. 757-763, 2015.

FASCIANO, J. M.; MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Ion-Exclusion High-Eficiência Liquid Chromatography of Aliphatic Organic Acids Using a Surfactant-Modified C18 Column. *Journal of chromatographic science*, v. 54, n. 6, p. 958-970, 2016.

FEKETE, S.; SCHAPPLER, J.; VEUTHEY, J. L.; GUILLARME, D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 63, p. 2-13, 2014.

FONTES, P. R.; RIBEIRO, J. A. D. A.; COSTA, P. P.; DAMASO, M. C.; GONZALEZ, W. D. A.; DOS SANTOS, C. M. C.; ABDELNUR P.V; RODRIGUES, C. M. Development and validation of a HILIC-UHPLC-ELSD method based on optimized chromatographic and detection parameters for the quantification of polyols from bioconversion processes. *Analytical Methods*, v. 8, n. 9, p. 2048-2057, 2016 a.

FONTES P. R., COSTA P. P. K. G., TELES K. A., POLETTO C. M., DAMASO M. C. T., C. M. RODRIGUES. Development and optimization of a HILIC-UHPLC-ELSD method for simultaneous determination of eleven polyols from glycerin bioconversion processes. In. III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia, 3, 2016 b, Brasília. Anais...Brasília: Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1055848/1/AnaisIIIEnPI2016.pdf>>

GATEA, F.; TEODOR, E. D.; PAUN, G.; MATEI, A. O.; RADU, G. L. Capillary electrophoresis method validation for organic acids assessment in probiotics. *Food Analytical Methods*, v. 8, n. 5, p. 1335-1340, 2015.

GREMBECKA, M. Sugar alcohols-their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, v. 241, n. 1, p. 1-14, 2015.

GROSS, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Science & Business Media, 2006.

GUIDELINE, ICH Harmonized Tripartite. *Validation of analytical procedures: text and methodology*. Q2 (R1), v. 1, 2005.

GUMUSTAS, M. KURBANOGU, S.; USLU, B.; OZKAN, S. A. UHPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, v.76, p.1365-1427, 2013.

GUO, Y.; GAIKI, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1074, n. 1-2, p. 71-80, 2005.

GUPTA, V.; JAIN, A. D. K.; GILL, N. S.; GUPTA, K. Development and validation of HPLC method - a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, v. 2, n. 4, p. 17-25, 2012.

HEJNA, A.; KOSMELA, P.; FORMELA, K.; PISZCZYK, Ł.; HAPONIUK. Potential applications of crude glycerol in polymer technology–Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, p. 449-475, 2016.

HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresource technology*, v. 169, p. 742-749, 2014.

HO, C. S., LAM, C. W. K., CHAN, M. H. M., CHEUNG, R. C. K., LAW, L. K., LIT, L. C. W., TAI, H. L. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, v. 24, n. 1, p. 3, 2003.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V.; *Mass spectrometry: principles and applications*. 3a ed, Wiley, 2007.

KAMZOLOVA, S. V.; MORGUNOV, I. r G. Metabolic peculiarities of the citric acid overproduction from glucose in yeasts *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource technology*, v. 243, p. 433-440, 2017.

KEMMEI, T.; KODAMA, S.; YAMAMOTO, A.; INOUE, Y.; HAYAKAWA, K. Reversed phase ion-pair chromatographic separation of sugar alcohols by complexation with molybdate ion. *Journal of Chromatography A*, v. 1547, p. 71-76, 2018.

KHAN, A; BHIDE, A; GADRE, R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. *Bioresource technology*, v. 100, n. 20, p. 4911-4913, 2009.

KHANNA, S; GOYAL, A; MOHOLKAR, V. S. Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects. *Critical reviews in biotechnology*, v. 32, n. 3, p. 235-262, 2012.

LANÇAS, F. M. Estratégias para a diminuição do tempo de análise em Cromatografia Líquida Moderna. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 4, p. 39-47, 2009.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). *Scientia Chromatographica*, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; DE OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*, v. 45, p. 138-145, 2012.

MAKOŚ, P.; FERNANDES, A.; PRZYJAZNY, A.; BOCZKAJ, G. Sample preparation procedure using extraction and derivatization of carboxylic acids from aqueous samples by means of deep eutectic solvents for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 1555, p. 10-19, 2018.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. The state of art of ultra eficiência liquid chromatography. *Química nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MATTAM A. J.; CLOMBURG J. M.; GONZALEZ R.; YAZDANI S. S. Fermentation of glycerol and production of valuable chemical and biofuel molecules. *Biotechnology letters*, v. 35, n. 6, p. 831-842, 2013.

MECHRI, B.; EKAYA, M.; CHEHEB, H.; HAMMAMI, M. Determination of mannitol sorbitol and myo-inositol in olive tree roots and rhizospheric soil by gas chromatography and effect of severe drought conditions on their profiles. *Journal of chromatographic science*, v. 53, n. 10, p. 1631-1638, 2015.

MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. Twenty years of evaporative light scattering detection. *Critical reviews in analytical chemistry*, v. 35, n. 4, p. 301-316, 2005.

NOLLET, L. M.L.; TOLDRÁ, F. Food analysis by HPLC. CRC Press, 2012.

OZDAL, M.; KURBANOGU, E. B. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* from Agro-Industrial By-Products: Molasses and Chicken Feather Peptone. *Waste and Biomass Valorization*, p. 1-10, 2018.

PADILHA, A. C. M.; SAIONARA, M. N. D. S. S. Estudos na Cadeia Produtiva do Biodiesel. unipampa, 2012.

PETUCCI, C.; ZELENIN, A.; CULVER, J. A.; GABRIEL, M.; KIRKBRIDE, K.; CHRISTISON, T. T.; GARDELL, S. J. Use of ion chromatography/mass spectrometry for targeted metabolite profiling of polar organic acids. *Analytical chemistry*, v. 88, n. 23, p. 11799-11803, 2016.

PUBCHEM COMPOUND DATABASE, 2018. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 23 de julho de 2018.

PUTRI, S. P.; FUKUSAKI, E. Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide. CRC Press, 2014.

QUISPE, C. A.; CORONADO, C. J.; CARVALHO JR, J. A. Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 27, p. 475-493, 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RYMOWICZ W.; RYWIŃSKA A.; ŻAROWSKA B.; JUSZCZYK P. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. Chemical Papers, v. 60, n. 5, p. 391-394, 2006.

RZETCHONEK D. A.; DOBROWOLSKI A.; RYMOWICZ W.; MIROŃCZUK A. M. Recent advances in biological production of erythritol. Critical reviews in biotechnology, v. 38, n. 4, p. 620-633, 2018.

SANDÍN-ESPAÑA, P., MATEO-MIRANDA, M., LÓPEZ-GOTI, C., DE CAL, A., ALONSO-PRADOS, J. L. Development of a rapid and direct method for the determination of organic acids in peach fruit using LC-ESI-MS. Food chemistry, v.192, p. 268-273, 2016.

SAUER M., PORRO D., MATTANOVICH D., BRANDUARDI P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends Biotechnol, v.26, n.2, p.100-108, 2008.

SCHULTZ, E. L.; DE SOUZA, D. T.; DAMASO, M. C. T. The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, v. 1, n. 1, p. 7, 2014.

SHOJAEIMEHR, T.; RAHIMPOUR, F.; SCHWARZE, M.; REPKE, J. U.; GODINI, H. R.; WOZNY, G. Use of RSM for the multivariate, simultaneous multiobjective optimization of the operating conditions of aliphatic carboxylic acids ion-exclusion chromatography column: Quantitative study of hydrodynamic, isotherm, and thermodynamic behavior. Journal of Chromatography B, v. 1083, p. 146-159, 2018.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-eficiência liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v. 977, n. 1, p. 89-96, 2002.

SIVASANKARAN C.; RAVICHANDRAN V.; MANI J. Comprehensive report on production of citric acid from crude glycerol. *International Journal of Applied Engineering Research*, v. 10, n. 13, p. 11777-11783, 2015.

SOCOL C. R., VANDENBERGHE L. P., RODRIGUES C., PANDEY A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 2, 2006.

SOUTO, A. L.; DE ARAÚJO, K. P.; DA SILVA, R. M. C.; PEREIRA, C. B.; POLETTO, C. M.; RIBEIRO, J. A. A.; DAMASO, M. C. T.; RODRIGUES, C. M.; ABDELNUR, P. V. Aplicação da análise multivariada de dados de espectrometria de massas em amostras de glicerol biotransformadas por fungos filamentosos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 55, Goiania, 2015. *Anais do 55º Congresso Brasileiro de Química*. Goiania, 2015.

TOIVARI, M. H.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M. G. Microbial D-xylonate production. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2012.

TYAGI G.; JANGIR, D. K.; SINGH P.; MEHROTRA R.; GANESAN R.; GOPAL E. S. R. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *Journal of food science and technology*, v. 51, n. 3, p. 476-484, 2014

VIANNA R. B.; DE LIMA K. S.; POLETTO C. M.; MENDES T. D.; SOUTO A. L., RIBEIRO, J. A. A. R.; COSTA, P. P. K. G. C., VIEIRA F. S.; DE LIMA J. R. C.; ABDELNUR P. V.; RODRIGUES C. M.; DAMASO, M. C. T. Avaliação de fungos filamentosos isolados a partir de solo contendo glicerina para produção de compostos químicos por bioconversão. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 3., 2016, Brasília, DF. *Anais do III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia*. Brasília, Embrapa, 2016.

VIANNA R. B.; VIEIRA F. S.; SOUTO A. L.; MENDES T. D.; COSTA, P. P. K. G. C.; ABDELNUR P. V.; RODRIGUES C. M.; DAMASO, M. C. T. Seleção de cepa produtora de ácido kójico a partir de glicerina bruta de soja. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4., 2017, Brasília, DF. *Anais do IV Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia*. Brasília, Embrapa, 2017.

XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v.32, p.1-14, 2012.

WANT, E. J.; CRAVATT, B.N. F.; SIUZDAK, G. The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *Chembiochem*, v. 6, n. 11, p. 1941-1951, 2005.

Waters Corporation, Atlantis T3 and acquity UPLC HSS T3 column, Product Guide (2007). Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001887en.pdf>>. Acesso em: 12 de setembro de 2017.

WEST T. P. Citric acid production by *Candida* species grown on a soy-based crude glycerol. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 43, n. 6, p. 601-611, 2013.

WISHART D. S.; FEUNANG Y. D.; MARCU A.; GUO A. C.; LIANG K.; VÁZQUEZ-FRESNO R.; SAYEEDA Z. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic acids research*, 2018. Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/>>. Acesso em: 23 de julho de 2018.

ZADA B.; CHEN M.; CHEN C.; YAN L.; XU Q.; LI W.; FU Y. Recent advances in catalytic production of sugar alcohols and their applications. *Science China Chemistry*, v. 60, n. 7, p. 853-869, 2017.

ZONG, Y.; LIN, J.; XU, H.; JIA, Z.; YANG, X.; CHOI, M. M. Optimization and validation of an HPLC-photodiode array detector method for determination of organic acids in vinegar. *Journal of AOAC International*, v. 98, n. 2, p. 422-430, 2015.