

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Química

***Paper spray ionization: análise direta de licores do
processo de etanol 2G por espectrometria de massas.***

Thays Colletes de Carvalho

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

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz
Co- Orientadora: Dra. Patrícia Verardi Abdelnur

Goiânia,
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Carvalho, Thays Colletes

Paper spray ionization: análise direta de licores do processo de
etanol 2G por espectrometria de massas. [manuscrito] / Thays
Colletes Carvalho. - 2015.

XV, 82 f.

Orientador: Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz; co-orientadora Dra. Patrícia
Verardi Abdelnur.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ) , Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Espectrometria de massas. 2. Paper Spray Ionization. 3. Etanol
2G. 4. Açúcares. I. Vaz, Boniek Gontijo, orient. II. Abdelnur, Patrícia
Verardi, co-orient. III. Título.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’” (George Bernard Shaw)

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás em 06/03/15, pela discente Thays Colletes de Carvalho.

Comissão Julgadora:



Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz - orientador- UFG



Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur – co-orientadora- EMBRAPA



Prof. Dr. Wanderson Romão - IFES



Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro – UFG

Dedico aos meus pais, Paulo e Cristina, que estiveram sempre me apoiaram, ao meu irmão Thiago e minha cunhada Lorena que cuidaram de mim nos dias que estive em Brasília e ao meu namorado, Vinícius, por ser a pessoa mais chata do mundo.

Agradecimentos

No término desta fase da minha vida, tenho muito a agradecer pelo apoio, ajuda e correções.

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me iluminou durante esta caminhada.

Aos meus pais, que me apoiaram quando decidi fazer o curso de química, fazer meu mestrado e sei que apoiarão quando eu estiver no doutorado. Sempre que precisei me ouviram, me deram conselhos e me ajudaram a ficar firme até o final.

Ao meu irmão e minha cunhada, por terem me acolhido na casa deles e cuidado tão bem de mim durante minhas estadias em Brasília.

Ao meu namorado, que foi muito paciente comigo quando eu estava estressada, com muitas coisas a fazer e com todas as viagens para Brasília. Ele me fez relaxar e ser feliz em situações difíceis.

Aos meus amigos, Dhiogo e Brisa, por continuarem sempre do meu lado. E aos amigos que fiz durante o mestrado, principalmente a Franciele e a Julianna, por me ajudarem tanto com as provas e os trabalhos.

Ao meu orientador, Boniek, sem o qual não teria chegado aqui. Sei que muito aprendi com ele e ainda muito aprenderei. Por ter me corrigido, incentivado e sempre tentando tirar o melhor de mim.

A minha co-orientadora, Patrícia, primeiramente pela oportunidade de trabalhar em uma empresa de alto nível que é a EMBRAPA Agroenergia e por várias vezes que me ajudou e providenciou amostras para conseguir finalizar esse projeto.

Aos alunos do LACEM, que ouviram minha apresentação várias vezes e sempre fizeram críticas de como melhora-la.

A todos da EMBRAPA Agroenergia, especialmente o Zé e a Raquel, que sempre me ajudaram e me ensinaram quando precisei. À Monica e ao Emerson que ofereceram as amostras para analisar. E à Christiane por ser uma grande amiga e ter compartilhado horas de laboratório congelado comigo.

Por fim, ao professor Wendell e seus alunos do GME, principalmente o Paulo de Tarso, por sempre que eu precisei deles para carimbar a

parafina nos meus triângulos eles me receberam de braços abertos e com muita simpatia.

Sumário

Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de abreviaturas e símbolos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract	viii
1- Introdução.....	2
1.1- Espectrometria de massas	2
1.2- Espectrometria de massas ambiente	3
1.3- <i>Paper Spray Ionization (PS)</i>	4
1.4- Analisadores de massas	10
1.5- Produção de Etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica.....	12
2- Objetivos	20
2.1- Objetivo geral	20
2.2- Objetivos específicos.....	20
3- Metodologia	22
3.1- Reagentes e amostras	22
3.2- Espectrometria de massas	23
3.3- Fonte de ionização PS	24
3.3.1- Montagem da fonte de PS e avaliação de seu funcionamento.....	24
3.3.2- Detecção de padrões dos principais produtos do processo de produção de etanol 2G	25
3.4- Otimização do método de análise	25
3.4.1- Aplicação da amostra	25
3.4.2- Avaliação da influência do tipo de papel	26
3.4.3- Avaliação da influência do ângulo do triângulo	26
3.4.4- Avaliação da influência de modificações no papel	26
3.4.5- Avaliação da influência do volume de amostra aplicado ao papel	
28	
3.5- Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica.....	28
3.6- Aplicação do método na caracterização de licores do pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	29
3.7- Quantificação da glicose em licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	29
4- Resultados e Discussões	31
4.1- Montagem da fonte de ionização PS	31

4.2- Otimização do método.....	36
4.2.1- Aplicação da amostra.....	36
4.2.2- Avaliação da influência do tipo de papel	37
4.2.3- Avaliação da influência do ângulo do triângulo	40
4.2.4- Avaliação da influência de modificações no papel	41
4.2.5- Avaliação do volume de amostra aplicado no papel parafinado ..	45
4.3- Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica de PS-MS	47
4.4- Aplicação da metodologia na caracterização de licores do pré- tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.....	49
4.5- Aplicação da metodologia na caracterização de licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	56
4.6- Elucidação estrutural dos compostos obtidos na caracterização dos licores de pré-tratamento e de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.....	59
4.7- Quantificação de Glicose em licores de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.	62
4.7.1- Limite de detecção e Limite de Quantificação.....	68
5- Conclusões	72
6- Bibliografia.....	75

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema geral de um espectrômetro de massas.....	2
Figura 2: Esquema geral de um sistema de PS-MS (Paper Spray Ionization Mass Spectrometry) adaptado de Liu et al. (LIU, WANG, et al., 2010).....	5
Figura 3: Esquema do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific (THERMO SCIENTIFIC, 2006).	11
Figura 4: Ejeção dos íons pelo ion trap de acordo com a razão m/z do íon (THERMO SCIENTIFIC, 2006).	12
Figura 5: Esquema de conversão de biomassa em produtos de maior valor agregado (CORTEZ, LORA e GÓMEZ, 2008).	14
Figura 6: Estruturas químicas dos produtos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da conversão de biomassa em etanol 2G.	15
Figura 7: Fonte de PS homemade conectada ao Espectrômetro de Massas....	24
Figura 8: Fotos dos papéis modificados a) com pontas laterais arredondadas e b) com barreiras de parafina c) papel sem modificações.	26
Figura 9: Esquema de aplicação da barreira de parafina no papel triangular. ...	27
Figura 10: Espectros de massas de canetas esferográficas azul e vermelha obtidos por EASI (+)-MS (A,B) e PS(+)-MS (C,D).	32
Figura 11: Estruturas química do pigmento da tinta azul: Violeta 3 (A); e do pigmento da tinta vermelha: Rodamina (B).....	32
Figura 12: Gráfico de intensidades absolutas da glicose, m/z 203, em diferentes distâncias da ponta do papel ao MS Inlet.	33
Figura 13: Espectros de A) Padrões de açúcares por PSI(+)-MS; B) Padrões de açúcares por PS (-)-MS; C) Padrões de açúcares, derivados furanos, ácidos e alcóois por PS (+)-MS; D) Padrões de açúcares, derivados furanos, ácidos e alcóois por PS (-)-MS.	35
Figura 14: Espectros de PS (+)-MS dos padrões obtidos pelo método a) aplicação a seco e b) aplicação direta da amostra.....	36
Figura 15: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: xilose, glicose e celobiose obtidas a partir dos espectros de PS(+)-MS nos dois modos de aplicação da amostra.	37
Figura 16: Gráficos de intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: a) xilose, b) glicose (B) e c) celobiose obtidos a partir dos espectros de PS(+)-MS utilizando os tipos de papéis Whatman 3mm; Whatman Cromatográfico; CHR 1; Whatman Papel de Filtro 0,2mm; Whatman Grade 1.	39
Figura 17: Espectros de PS (+)-MS dos padrões de açúcares em diferentes tipos de papel: Whatman Cromatográfico CHR 1; Whatman 3mm; Whatman Papel de Filtro 0,2 mm Whatman Grade 1.....	39
Figura 18: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: xilose, glicose e celobiose obtidos a partir dos espectros de PS(+) nos diferentes ângulos da ponta afiada do triângulo	40
Figura 19: Espectros de PS (+) -MS para a avaliação da influência do ângulo do papel triangular.	41
Figura 20: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes ao a) ácido esteárico; b) ácido oxalacético, c) xilose; d) glicose; e) HMF; f) Licor de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, obtidos a partir dos espectros de PS(-)-MS e PS(+)-MS nas diferentes modificações de papel.....	43

Figura 21: Espectros de PS(+)-MS do padrão de hidroximetilfurfural nos papéis: a) triangular normal, b) com barreira de parafina e c) com pontas arredondadas.	44
Figura 22: Cromatogramas de íons total do papel com pontas arredondadas, o papel sem modificações e do papel com canal de parafina obtidos em análises com PS-MS.	45
Figura 23: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares xilose e glicose, obtidos a partir dos espectros de PS(+)-MS nos diferentes volumes de amostra.	46
Figura 24: Espectros de PS(+)-MS dos padrões de açúcares, xilose nos volumes de aplicação 1 µL, 5 µL e 10 µL.	46
Figura 25: Espectros de PS(+)-MS dos padrões de açúcares, xilose nos volumes de aplicação 1 µL, 5 µL e 10 µL.	47
Figura 26: Espectros de PS (+)-MS das amostras selecionadas dos licores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar nas condições PT1, PT2, PT10 e PT11.	51
Figura 27: Espectros de PS (-) das amostras selecionadas dos licores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar nas condições PT1, PT2, PT10 e PT11.	54
Figura 28: Esquema sugerido por Petterson et al. da hidrólise enzimática da biomassa.	57
Figura 29: Espectros de PS (+)-MS dos licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em 1, 2, 6 e 8 horas de hidrólise.	58
Figura 30: Espectro de PS(+) MS/MS do m/z 203 referente a “glicose sodiada”.	60
Figura 31: Espectro de PS(+) MS/MS do m/z 173 referente a “xilose sodiada”.	61
Figura 32: Espectro de PS (+) MS/MS do m/z 127 referente ao “HMF protonado”.	62
Figura 33: Curvas de calibração da razão da glicose pela glicose deuterada obtida por PS (+) -MS em diferentes concentrações e com papel com canal de parafina, com papel sem modificação e papel com pontas arredondadas.	63
Figura 34: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel com canal de parafina.	64
Figura 35: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel sem modificação	65
Figura 36: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel com pontas arredondadas.	65

Lista de Tabelas

Tabela 1: Concentrações em mg/mL dos açúcares livres e dos inibidores da fermentação das amostras de pré-tratamento quantificadas por CLAE.	23
Tabela 2: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas ion trap LTQ XL.	23
Tabela 3: Padrões de açúcares, ácidos, álcoois e derivados furanos usados durante a otimização do método com o PS-MS.	34
Tabela 4: Tamanho dos poros dos diferentes tipos de papéis e as intensidades absolutas provenientes dos espectros de PS(+)-MS do padrão com glicose, xilose e celobiose.	38
Tabela 5: Razão das intensidades absolutas dos picos de glicose/xilose na concentração de 5,55 mmol/L por dia analisado.	48
Tabela 6: Teste ANOVA das razões de glicose pela xilose na concentração de 1 mg/mL em diferentes dias.	49
Tabela 7: Condições operacionais do PS-MS.	50
Tabela 8: Planejamento do pré-tratamento e da hidrólise da cana-de-açúcar para produção de etanol 2G.	50
Tabela 9: <i>Compostos identificados por PS(+)-MS nas amostras de licores analisadas.</i>	53
Tabela 10: <i>Compostos identificados por PS(-) -MS nas amostras de licores analisadas</i>	55
Tabela 11: Compostos identificados por PS(+) –MS nas amostras de licores da hidrólise enzimático.	59
Tabela 12: Concentração encontrada de amostras reais de licores de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar por PS(+)-MS com diferentes papeis e a comparação com o encontrado por HPLC	67
Tabela 13: Valores da razão 203/204 das análises em branco por PS(+)-MS para cada, suas concentrações encontradas pelas equações da reta, os desvios padrões das concentrações, o desvio padrão da média das análises e os valores de LD e LQ para cada tipo de papel analisado.	69

Lista de abreviaturas e símbolos

[M+ H] ⁺	Íon protonado
[M+ Na] ⁺	Íon sodiado
[M+CL] ⁻	Íon clorado
[M-H] ⁻	Íon desprotonados
ANOVA	Análise de variância
ASAP	<i>Atmospheric pressure solid analysis probe</i>
C	Coeficiente linear da curva de calibração
CG	Cromatografia gasosa
CHR	Papel cromatográfico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CRM	<i>Charged residue model</i>
DAD	<i>Diode array detector</i>
CAPCI	<i>Desorption atmospheric pressure chemical ionization</i>
DAPPI	<i>Desorption atmospheric pressure photon ionization</i>
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DBS	<i>Dry Blood Spot</i> (mancha de sangue seco)
DESI	<i>Desorption electrospray ionization</i>
EASI	<i>Easy ambiente sonic-spray ionization</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
Etanol 1G	Etanol de primeira geração
Etanol 2G	Etanol de segunda geração
gli/gli-D	Razão glicose/ glicose- deuterada
HMF	Hidroximetilfurfural
ICR	<i>Ion cyclotron resonance</i>
IEM	<i>Ion evaporation mechanism</i>
IT	<i>Ion trap.</i>
LAESI	<i>Laser ablation-electrospray ionization</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LTP	<i>Low temperature plasma</i>
m/z	Razão massa/carga
MS	Mass spectrometry
MS ⁿ	Tandem mass spectrometry
PS(-)-MS	Análise por Paper Spray no modo negativo
PS(+)-MS	Análise por Paper Spray no modo positivo
PADI	<i>Dielectric barrier discharge ionization</i>
PS	<i>Paper Spray ionization</i>
PT	Pré-tratamento
PTFE	Politetrafluoretileno
s	Desvio padrão
S/N	Razão sinal/ruído
TOF	<i>Time-of-flight</i>
β	Beta

Resumo

A produção de etanol 2G é um processo laborioso, que pode resultar na formação de inibidores de leveduras fermentadoras de glicose, o que diminui os rendimentos do processo. A busca de novas metodologias rápidas e sensíveis são necessárias para evidenciar a condição com a formação de açúcares livres e ausência de inibidores da fermentação (Hidroxiacetilfurfural e furfural). Este trabalho apresenta a proposta de utilizar a fonte de ionização *Paper Spray Ionization (PS)* como método de detecção e quantificação de inibidores e açúcares gerados nos processos de obtenção de etanol 2G. O método foi otimizado e obteve-se curvas de calibração para a glicose obtida pelo processo de hidrólise enzimática. Essas condições foram usadas para análise de amostras reais de licores de bagaço de cana-de-açúcar. As melhores condições de análise por PS foram: Distância entre 1 e 5 mm, modo de aplicação por aplicação a seco, papel Whatman Grade 1, ângulo de 60°, papel modificado com barreira de parafina, volume de 10 µL e concentração de amostra de 0,1mg/mL. A detecção dos produtos esperados nos licores de pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada como esperado. O papel com canal de parafina mostrou-se ser mais eficaz para a quantificação da glicose com melhor linearidade (0,9952) e limites de detecção (2,77 mmol/L) e quantificação (9,27 mmol/L) em relação ao papel sem modificação e o papel arredondado. A aplicação do PS na determinação de açúcares e inibidores em licores de bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se eficiente e rápido abrindo a perspectiva de utilização deste método no acompanhamento de processos de produção de etanol 2G.

Abstract

2G Ethanol production is a laborious process that may result in formation of glucose -fermenting yeasts, which reduces the process yield. The search for new rapid and sensitive methods are required to show the condition with the formation of free sugars and absence of fermentation inhibitors (Hidroximetilfurfural and furfural). The present work proposes utilizing the Paper Spray (PS) Ionization source as a method of detecting and quantifying fermentation yeasts inhibitors and sugars generated in 2G ethanol-acquiring processes. The method was optimized and was obtained as calibration curves for the glucose obtained by enzymatic hydrolysis process. These conditions were used for analysis actual sample of sugarcane bagasse liquors. The best analysis conditions by PS were: distance between 1 and 5 mm, dry spot application mode, Whatman Grade 1 paper, 60° angle, modified paper with paraffin barrier, 10 μ L volume and sample application concentration of 0,1mg/mL. The detection of the expected product in the pretreatment and hydrolysis liquors of sugarcane bagasse was performed as expected. The paper with paraffin channel proved to be more effective for the quantification of glucose with improved linearity (0.9952) and limits of detection (2.77 mmol/L) and quantification (9.27 mmol/L) compared to without changing paper and paper cur ends. Applying the PS prototype in determining sugars and inhibitors in sugarcane bagasse liquors has proven to be efficient and quick, opening up a perspective of utilizing this method on monitoring Ethanol 2G production processes.

Introdução

1- Introdução

1.1- Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica com grande aplicação nas mais variadas áreas da ciência (ALBERICI, SIMAS, *et al.*, 2010), pois ela consegue detectar e quantificar os constituintes, que são ionizados, de uma matriz complexa com alta sensibilidade e seletividade (ALBERICI, SIMAS, *et al.*, 2010) (MCLAFFERTY, 1981). A análise de MS é realizada por um espectrômetro de massas, que de maneira geral, é representado conforme o ilustrado na Figura 1. O espectrômetro de massas é constituído por um sistema de introdução de amostra, normalmente constituído por uma bomba de infusão direta, ou por um sistema de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); uma fonte de ionização onde são gerados os íons, como por exemplo a fonte de ionização de *electrospray* (ESI); um analisador que discrimina os íons por sua razão de massa/carga (m/z) como exemplo o analisador por *Time-of-Flight* (TOF), *ion trap* (IT) e o analisador de ressonância ciclotrônica de íons (ICR); e um detector que possui a função de contabilizar o número de íons de cada m/z gerados, como por exemplo o detector MCP (*Microchannel plate*).

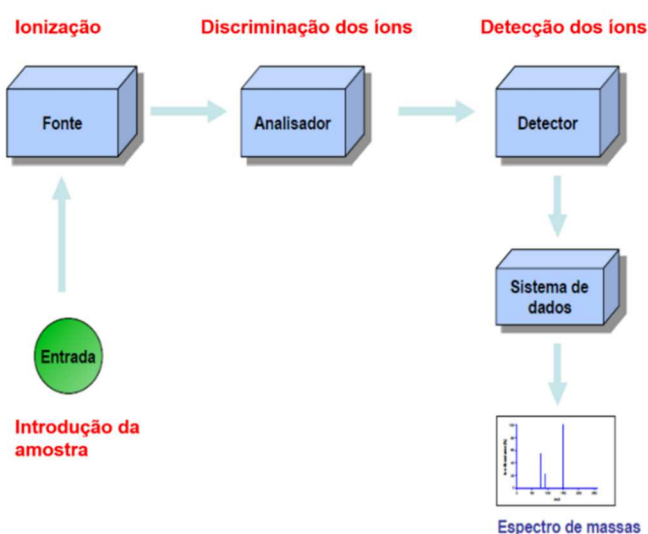


Figura 1: Esquema geral de um espectrômetro de massas.

Apesar de todo o desenvolvimento já realizado em MS, atualmente esta técnica analítica vem experimentando novas tendências. Esse novo rumo da MS tem como objetivo aumentar a variedade de aplicações da técnica e torná-la apta para os novos desafios analíticos: como a portabilidade do espectrômetro de massas (OUYANG e COOKS, 2009) e a simplicidade, expressa pelo desenvolvimento de fontes de ionização direta (HUANG, YUAN, *et al.*, 2010), o que proporciona análises rápidas, de baixo custo e eficiente.

A ionização da amostra é o coração da MS, uma vez que sem íons não é possível realizar uma análise de MS, pois o espectrômetro de massas, determina a razão massa/carga (m/z) de espécies iônicas (COVEY, THOMSON e SCHNEIDER). A fonte de ionização é responsável pela versatilidade da técnica, ou seja, variando-se os tipos de moléculas que podem ser ionizadas, aumenta-se a amplitude de aplicação da MS. Portanto, a obtenção de métodos brandos e simples de geração íons tornam a espectrometria de massas mais simples e acessível (COVEY, THOMSON e SCHNEIDER).

1.2- Espectrometria de massas ambiente

O primeiro passo para a simplicidade e portabilidade em espectrometria de massas ocorreu em 2004 com a revolução representada pela criação de uma nova família de técnicas de ionização que agora são conhecidas como técnicas de ionização ambiente (ALBERICI, SIMAS, *et al.*, 2010). Estas técnicas preconizam uma análise com mínimo ou nenhum preparo de amostra, em condições ambientes sendo que a ionização é realizada no ambiente natural do analito, ou seja, diretamente na amostra. As fontes de ionização pioneiras desta nova família são a *Direct Analysis in Real Time* (DART) e a *Desorption Electrospray Ionization* (DESI), que são as mais consolidadas e citadas atualmente (HUANG, YUAN, *et al.*, 2010). Depois que estas duas grandes técnicas foram introduzidas, um grande número de técnicas surgiu com o mesmo propósito. Estas técnicas incluem, como exemplos mais típicos,

desorption atmospheric pressure photon ionization (DAPPI), atmospheric pressure solid analysis probe (ASAP), desorption atmospheric pressure chemical ionization (DAPCI), dielectric barrier discharge ionization (PADI), low-temperature plasma ionization (LTP), laser ablation-electrospray ionization (LAESI), paper spray ionization (PS) e easy ambiente sonic-spray ionization (EASI) (HARRIS, GALHENA e FERNANDEZ, 2011).

As técnicas de ionização ambiente revolucionaram a espectrometria de massas introduzindo um novo conceito: a simplicidade (ALBERICI, SIMAS, *et al.*, 2010). A análise é realizada diretamente sobre a superfície da amostra e informações sobre sua composição podem ser obtidas em tempo real no espectrômetro de massas (HUANG, YUAN, *et al.*, 2010). Dentre as técnicas de ionização ambiente, a PS apresenta um grande potencial, devido a simplicidade e a possibilidade de acoplá-las com qualquer sistema de que opere com uma fonte de ionização atmosférica.

1.3- Paper Spray Ionization (PS)

A fonte de ionização PS foi criada em 2010 pelo grupo do Prof. Dr. R.G Cooks, sendo um fio soldado a uma garra jacaré fixada a um suporte por uma garra. E consiste na aplicação de uma alta voltagem em um papel de formato triangular (LIU, WANG, *et al.*, 2010) umedecido com uma solução do analito, que é depositada ao centro do papel que por capilaridade espalha-se pelo papel alcançando a extremidades. (YANG, WANG, *et al.*, 2012). O campo elétrico, oriundo da aplicação de uma alta voltagem (3-5 kV) no papel, induz a formação de um *spray* na forma de cone de Taylor (Figura 2) (YANG, WANG, *et al.*, 2012). PS é essencialmente um processo baseado no ESI: o forte campo elétrico na ponta afiada do papel resulta na formação de um cone de Taylor que invade uma pluma de gotículas carregadas, que após a dessolvatação geram íons na fase gasosa (WANG, LIU, *et al.*, 2010).

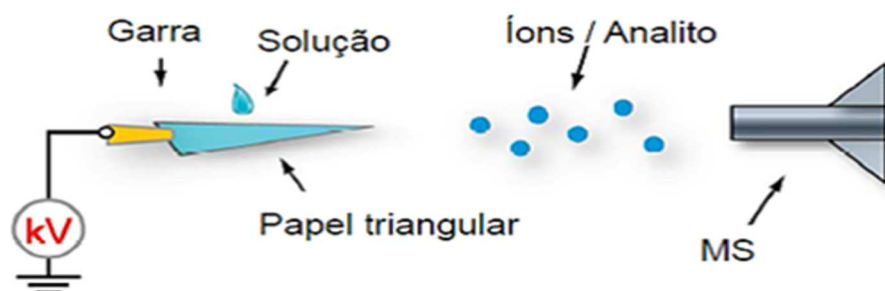


Figura 2: Esquema geral de um sistema de PS-MS (*Paper Spray Ionization Mass Spectrometry*) adaptado de Liu et al. (LIU, WANG, et al., 2010).

Há diversos estudos sobre o mecanismo do PS. A ação capilar na superfície porosa do papel é o principal processo responsável pelo movimento dos analitos que serão dessolvatados durante a formação do *spray* próximo à entrada do espectrômetro de massas (YANG, WANG, et al., 2012). Graças a este processo tem-se a dessorção do analito em sua forma iônica a partir do papel (YANG, WANG, et al., 2012). A geração de íons pelo PS tem os mesmos princípios que o ESI, onde uma solução de amostra em pH ácido ou básico é submetida a um *spray* eletrolítico sob pressão atmosférica (FENN, 2002). Um fino *spray* (aerossol) se forma (cone de Taylor) na presença de um alto campo elétrico de + 4000 V (ou – 4000 V) (FENN, 2002). O contra-íon é oxidado (ou reduzido) e formam-se gotas com excesso de carga positiva (ou negativa). O solvente evapora, reduzindo o volume das gotas até que elas se subdividam (FENN, 2002). Eventualmente, devido à alta repulsão entre os íons de mesma carga, formam-se gotas contendo apenas um íon (*charged residue model- CRM*) ou os íons evaporam das gotas para a fase gasosa (*ion evaporation mechanism- IEM*) (FENN, 2002). Entretanto, no PS esses princípios são realizados em uma escala nano (YANG, WANG, et al., 2012).

O PS apresenta as mesmas restrições que ESI em termos das classes de compostos a serem ionizados. Ou seja, esse método dificilmente ionizará substâncias apolares e substâncias altamente polares que, no caso do PS, apresentam fortes interações com o papel (WAGNER, TONOLI, et al., 2014). Entretanto, para aumentar a faixa de aplicações do

PS, foram testados solventes apolares, como hexano e tolueno, em analitos, como pequenos peptídeos, nucleotídeos, fosfolipídios e derivados do colesterol, e verificou-se a formação de íons por PS-MS. (LI, WANG, *et al.*, 2011; CHAIT, 1972). Com isso tem-se a diferença entre as duas técnicas, O PS-MS independe do solvente da solução contendo analito, contrariamente ao ESI-MS que para ter resposta de íons mais polares é preciso de uma mistura de solventes com diferentes polaridades.

O modo em que a amostra é aplicada também pode ter impacto no PS. Liu *et al* observaram um aumento de sensibilidade da técnica quando a análise é realizada após a secagem da solução com analito aplicada ao papel, ao contrário da análise feita imediatamente após a aplicação da solução, pois o analito move-se até a ponta do papel triangular por capilaridade enquanto a amostra está secando. (LIU, SNAPP e JI, 2011). Apesar de aparentar um aumento no tempo de produção por ter que esperar a secagem do papel, o número de análises possíveis de serem realizadas após esse tempo, suprime esse aumento de tempo.

A duração do *spray* é em torno de um minuto, pois neste intervalo o solvente evapora ou é pulverizado. Este tempo está relacionado com o volume de amostra aplicado (maior o volume, maior o tempo de *spray*). Alcança-se um *spray* mais duradouro ao recobrir o papel com algum material que iniba a evaporação do solvente, um filme de PTFE (Politetrafluoretileno), por exemplo, como escrito por Liu *et al.* (LIU, COOKS e OUYANG, 2013).

Outros fatores que podem influenciar a resposta obtida pelo PS são: ângulo da ponta do papel triangular; a voltagem aplicada ao papel; intensidade de corrente iônica total e o posicionamento do papel em relação ao *MS Inlet*. O aumento do ângulo da ponta do papel triangular faz com que diminua o diâmetro do cone de Taylor, o que diminui o número de íons que entra no espectrômetro de massas. A voltagem aplicada ao papel tem uma relação direta com o diâmetro do cone de Taylor produzido, ou seja, ao aumentar a voltagem tem-se um aumento do diâmetro do cone de Taylor. Já a intensidade de corrente iônica total é

influenciada pelo ângulo do papel, de 30° até 90° tem aumento e, acima desse ângulo diminui. Por fim, o posicionamento do papel em relação ao MS Inlet, diminui a intensidade, pois, aumenta a distância que os íons têm de percorrer até o espectrômetro de massas, podendo haver perdas por evaporação. Essas mudanças podem aumentar o limite de detecção e a sensibilidade da técnica (YANG, WANG, *et al.*, 2012).

O PS é um método rápido, preciso, exato e de baixo custo (WANG, REN, *et al.*, 2013), em torno de R\$ 25,00, somando os valores da garra jacaré, o fio, a solda, uma folha papel (com dimensão 20 cm x 20 cm) e seu corte, para obtenção 400 amostras. O método mostrou-se reprodutível em vários exemplos na literatura, sendo alguns deles a determinação de fármacos diretamente do sangue em 45 segundos (WANG, REN, *et al.*, 2013), tecidos biológicos (HU, LAI, *et al.*, 2012) e em *Dry blood spot* (DBS) (WANG, REN, *et al.*, 2013), a análise da qualidade de alimentos (TAVERNA, DI DONNA, *et al.*, 2013), proteínas (ZHANG, JU, *et al.*, 2014), inibidores de corrosão em oleodutos (JUNJU, LI, *et al.*, 2013), lipídios polares em algas (ORADU e COOKS, 2013) e acompanhamento de reações químicas inorgânicas (CODY e DANE, 2014).

Uma aplicação futura é ter um diagnóstico *point-of-care* com espectrômetro de massas portátil. Espy *et al.* descrevem o uso do PS-MS para análise de sangue em tempo real. Uma gota de sangue, obtida após perfuração do dedo, foi depositada em um papel com coagulante (alúmen de potássio) e padrão interno, para análise de drogas no sangue. Adicionou-se o coagulante pois ao analisar o sangue fresco, ao invés da DBS podem haver algumas substancias que são levadas a ponta do papel triangular, como é o caso de hemoglobinas oxigenadas, que entopem a ponta do papel não permitindo a formação do cone de Taylor com boa estabilidade. (ESPY, MANICKE, *et al.*, 2012).

Durante os últimos anos algumas modificações no PS foram realizadas para aumento na sensibilidade, melhoria na estabilidade do sinal, praticidade, aumento do tempo do *spray* diminuindo a evaporação, dentre outros.

Yang *et al.* desenvolveram um suporte com resina para diminuir a evaporação, aumentar o campo elétrico na ponta a frente do *MS Inlet* e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade da técnica do PS (YANG, WANG, *et al.*, 2012).

Em outra vertente, Lee *et al.* desenvolveram um suporte conectado a uma bomba de seringa para aplicação contínua de amostra, o que resultou em um aumento no tempo do *spray* (LEE, JHANG, *et al.*, 2012). Com o mesmo objetivo, Liu *et al.* desenvolveram um método de aplicação da amostra usando um capilar revestido com padrão interno. Este capilar é utilizado para amostrar pequenos volumes de sangue que serão depositados no papel. Durante o processo de amostragem o padrão interno é homogeneizado no sangue. Este método permitiu alcançar determinações quantitativas de fármacos no sangue, como o imatinib, com elevada precisão e exatidão. (LIU, COOKS e OUYANG, 2013). Na mesma vertente, Liu *et al.* desenvolveram um método de aplicação da amostra utilizando um conta gotas. Durante o processo a amostra é adicionada continuamente no papel por gravidade e atração eletrostática. Esse dispositivo foi usado para acompanhar a reação amino-aldeído de butilamina em benzaldeído (LIU, MAO, *et al.*, 2013). Na mesma vertente Salentijn *et al.* desenvolveram um suporte, o qual foi impresso por impressora 3D, para aplicação contínua de solvente durante a análise por PS (SALENTIJN, PERMENTIER e VERPOORTE, 2014). Já Zhang *et al.* desenvolveram um microchip para aplicação, por gravidade, da amostra no papel triangular. O dispositivo mostrou uma padronização no modo de aplicação de amostra, além de melhorar a performance em ensaios quantitativos (ZHANG, LI, *et al.*, 2014).

Cooks *et al.* desenvolveram um protótipo de fonte de *paper spray*, na qual o papel é colocado sempre na mesma posição possibilitando a obtenção excelentes índices de repetitividade e reprodutibilidade nas análises. Este protótipo confere um arranjo experimental mais adequado para experimentos onde se almeja realizar a quantificação de algum analito. (ESPY, MANICKE, *et al.*, 2014).

Pei *et al.* desenvolveram um protótipo de PS para o acompanhamento de reações químicas. O protótipo possui um suporte com aquecimento que possibilitou analisar intermediários de reações químicas orgânicas. Esse protótipo também pode ser usado para o estudo reações que ocorram em temperatura ambiente, oferecendo controle de temperatura durante a análise (PEI, KANG e HUANG, 2014).

Zhang *et al.* descreveram o uso de papel recoberto com sílica na análise de fármacos. A sílica bloqueia os microporos do substrato celulósico, proporcionando uma melhor eluição dos analitos. O uso deste papel conferiu uma melhoria de 5-50 vezes na sensibilidade na análise em comparação com papel cromatográfico Grade 4 e papel cromatográfico Grade ET31, utilizado nas placas de sangue para análise de fármacos em DBS (ZHANG, XU, *et al.*, 2012).

Su *et al.* realizaram um tratamento do papel com água, NaClO ou HNO₃ a fim de eliminar resíduos químicos provenientes da fabricação do papel, que possam interferir na análise de fármacos como o caso da oxicodona. O tratamento do papel com água não demonstrou melhoras significativas para diminuição da interferência. Com HNO₃, apresentou uma melhora significativa, mas ainda apresentou ruído. Porém, com NaClO, mostrou ser o melhor tratamento, por não apresentar nenhum traço de interferentes (SU, WANG, *et al.*, 2013).

Zhang *et al.* desenvolveram um método de análise direta do analito em sua matriz nativa, sem precisar transferi-lo para um substrato, no caso o papel. Esse método é o *Leaf Spray*, onde ao invés de aplicar a alta voltagem no papel triangular com amostras aplica-se na folha da planta (ZHANG, LI, *et al.*, 2012). Garret *et al.* baseando-se nos mesmos princípios utilizaram o grão de café no lugar do papel (GARRETT, REZENDE e IFA, 2013). Já Hu *et al.* utilizaram tecido biológico, de plantas e animais, cortando-os em geometria triangular, para análise das diferenças entre os dois tecidos. No caso eles conseguiram diferenciar, pois para o tecido da planta, encontraram os principais gliceróis lipídeos (monogalactosil-diacilglicerol e digalactosil-diacilglicerol), entre outros componentes. Em tecido animal, encontraram lipídeos, entre outros. (HU,

LAI, *et al.*, 2012). A ionização direta da própria amostra é uma forma de diminuição de tempo, custo e gastos de reagentes na análise.

Apesar das inúmeras aplicações do PS, não se encontrou na literatura a aplicação na caracterização de biocombustíveis e no acompanhamento do processo de conversão da biomassa para seus derivados energéticos.

1.4- Analisadores de massas

Após a formação dos íons eles são guiados para o analisador onde são discriminados em função de suas razões m/z . Este processo ocorre de maneira diferente para cada analisador. Para o Ion Trap, por exemplo, é em função do potencial de radiofrequência aplicado ao íon (HOFFMANN e STROOBANT, 2007); no TOF é em função do tempo que o íon gasta para percorrer uma determinada distância (WEICKHARDT, MORITZ e GROTEMEYER, 1996); no *ion cyclotron resonance* (ICR) é em função da frequência ciclotrônica do íon na presença de um campo magnético (NIKOLAEV, KOSTYUKEVICH e VLADIMIROV, 2014) e no *Orbitrap* é em função da frequência de oscilação do íon em um campo eletrostático (PERRY, COOKS e NOLL, 2008). Cada uma dessas variáveis está correlacionada com o valor de m/z do íon.

1.4.1- Espectrômetro de massas Ion trap LTQ XL

No espectrômetro de massas *ion trap* linear (LTQ) (Figura 3), os íons formados entram pelo *MS Inlet* e são conduzidos até o analisador de massas de acordo com o modo de leitura escolhido (positivo ou negativo) e de acordo com a faixa de massa definido. O analisador de massas é constituído por duas lentes, uma frontal e uma traseira, e uma câmara de trapeamento linear (DOUGLAS, FRANK e MAO, 2005). As lentes servem para controlar a quantidade dos íons na câmara de trapeamento aplicando-se uma voltagem contrária a carga dos íons analisados por um determinado tempo (BERGO, 2007). A câmara de trapeamento constitui-se de um quadrupolo, onde duas hastes apresentam voltagem com a

mesma carga do íon e as outras duas com carga contrárias, de modo que a repulsão e a atração dos íons, os confinam na câmara, com movimento ondulatório. (SCHWARTZ, SENKO e SYKA, 2002)

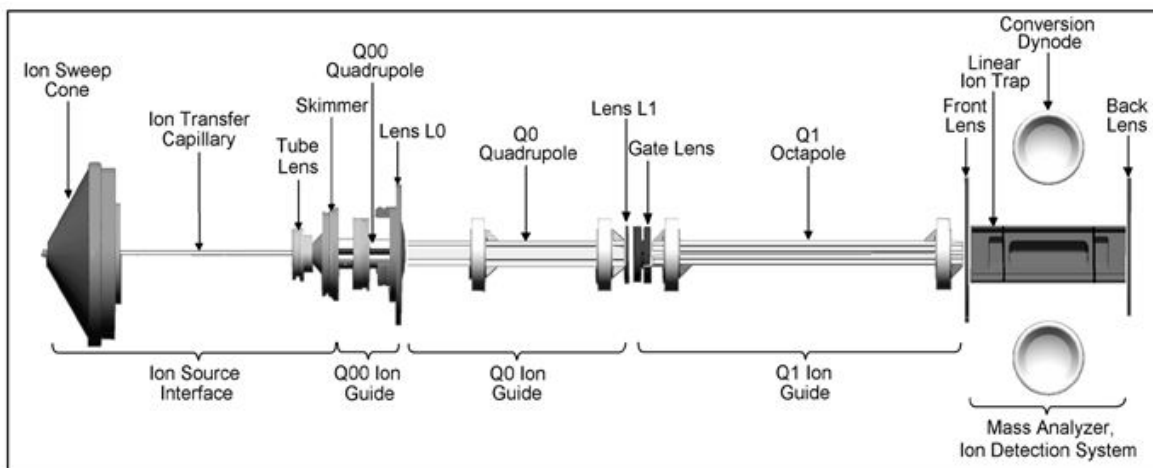


Figura 3: Esquema do espectrômetro de massas Ion trap LTQ-XL, Thermo Scientific (THERMO SCIENTIFIC, 2006).

Quando a quantidade de íons ou o tempo pré-definidos forem atingidos, os íons são esfriados por gás inerte diminuindo sua energia cinética, o que faz que os íons se movimentem no eixo Z com mesma energia e de forma estável (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Então, aumenta-se a amplitude da voltagem ressonante aplicada, desestabilizando cada m/z individualmente que por consequência leva a expulsão dos mesmos para fora do analisar em direção ao detector, onde é registrado seu valor de m/z (Figura 4) (SCHWARTZ, SENKO e SYKA, 2002). O valor desta variação de potencial de radiofrequência depende do valor de cada m/z e assim cada íon é discriminado (THERMO SCIENTIFIC, 2006).

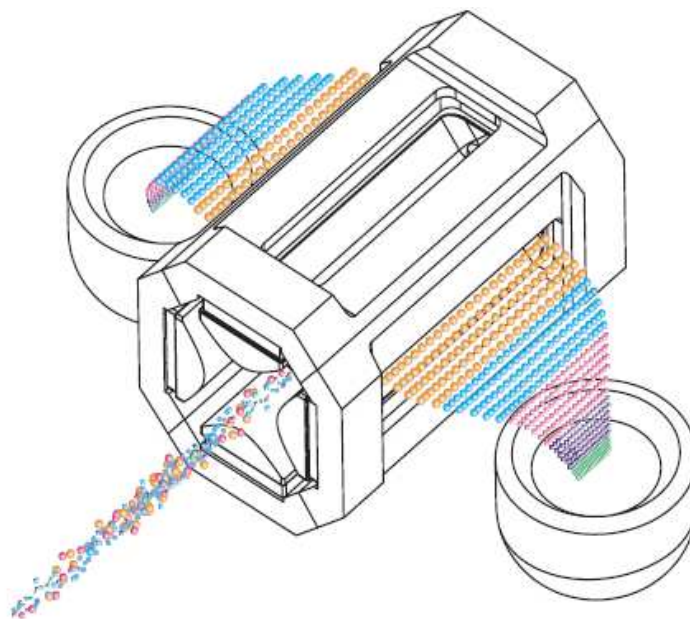


Figura 4: Ejeção dos íons pelo ion trap de acordo com a razão m/z do íon (THERMO SCIENTIFIC, 2006).

Uma das vantagens do uso desse espectrômetro de massas é a possibilidade de uma análise de espectrometria de massas tandem (MS^n), o qual é usado para elucidação de estruturas tanto do íon precursor como dos íons fragmentos. O modo de operação tandem mais utilizado é modo de operação íons produtos, onde um íon é selecionado após uma varredura de massas, é ativado e fragmentado por colisões com um gás inerte, hélio. (BERGO, 2007). Uma desvantagem é a resolução do equipamento ser unitária, o que dificulta a diferenciação de isóbaros.

1.5- Produção de Etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica

A conversão de biomassa em produtos energéticos tem atraído muito interesse tanto por parte da academia como do setor industrial e tem sido alvo de pesquisas por todo o mundo (CHRISTOFOLETTI, 2010). Como exemplo, tem-se a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), ou seja, o etanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica,

diferentemente, do etanol de primeira geração (etanol 1G) que provem do caldo da biomassa (CORTEZ, LORA e GÓMEZ, 2008).

O bagaço de cana-de-açúcar é uma alternativa atraente para a produção do etanol 2G devido sua grande disponibilidade, que é cerca de 4,75 milhões de toneladas de material lignocelulósico seco, podendo aumentar a produção de 30 a 40% (MACEDO e NOGUEIRA, 1985). Além disto, para a produção de etanol 2G não é preciso aumentar a área de plantio de cana-de-açúcar também não havendo custo com o transporte da biomassa se a produção for próxima as indústrias de etanol 1G. (OLIVÉRIO e HILST, 2005).

A produção de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica envolve várias etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação (RIBEIRO, 2012).

A etapa de pré-tratamento tem como principal objetivo a remoção da lignina e da hemicelulose, pois elas dificultam o acesso da enzima à celulose nas etapas posteriores (CORTEZ, LORA e GÓMEZ, 2008). O objetivo da hidrólise enzimática é de quebrar a celulose em hexoses. E, por fim, a fermentação é responsável pela conversão das hexoses em etanol. Atualmente, vem-se pesquisando o uso de outras enzimas para que também possa ser utilizada a xilose no processo de produção de etanol.

No entanto, esse processo apresenta alguns desafios, como a geração de resíduos poluentes, como ácido fórmico, ácido levulínico e compostos fenólicos; a produção de produtos inibidores da fermentação (SWAIN, DAS e NAIK, 2011); o alto custo das enzimas celulasas (ROSSEL, LAHR FILHO, *et al.*, 2005).

No pré-tratamento pode ocorrer decomposição não controlada dos três principais polímeros (lignina, hemicelulose e celulose) e a consequente degradação dos mesmos em compostos poluentes e inibidores do processo de fermentação, como por exemplo, compostos fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural (Figura 5). Estes compostos inibem os processos enzimáticos das etapas posteriores (CHRISTOFOLETTI, 2010). Vários processos de pré-tratamento estão sendo otimizados para minimizar a produção destes inibidores (CORTEZ, LORA e GÓMEZ,

2008). As estruturas químicas desses principais produtos do pré-tratamento e da posterior etapa, hidrólise enzimática, estão expostas na Figura 6.

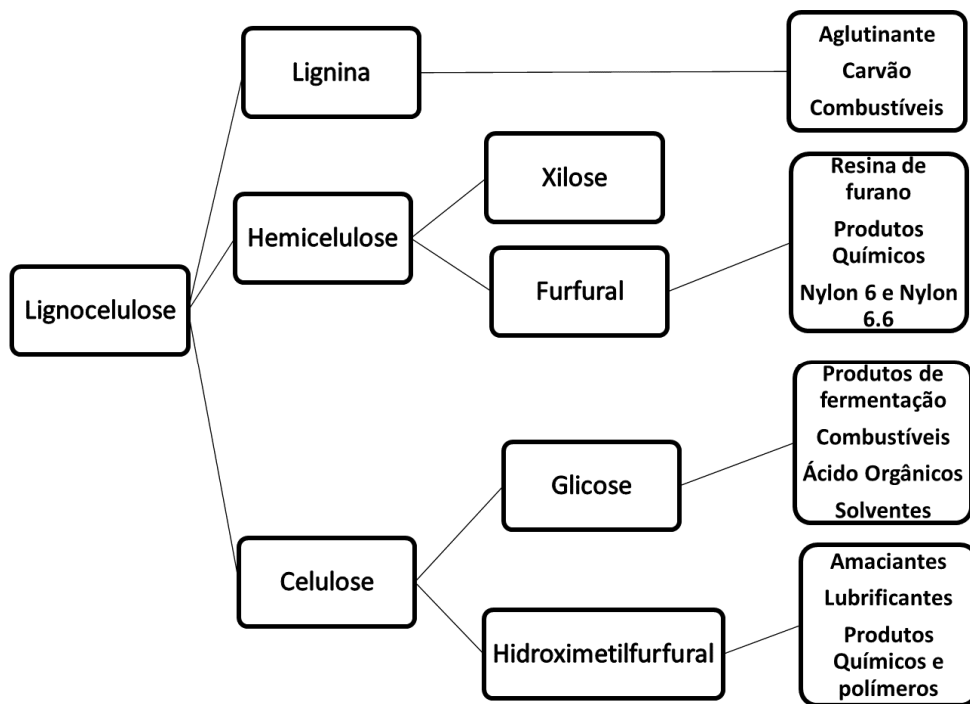


Figura 5: Esquema de conversão de biomassa em produtos de maior valor agregado (CORTEZ, LORA e GÓMEZ, 2008).

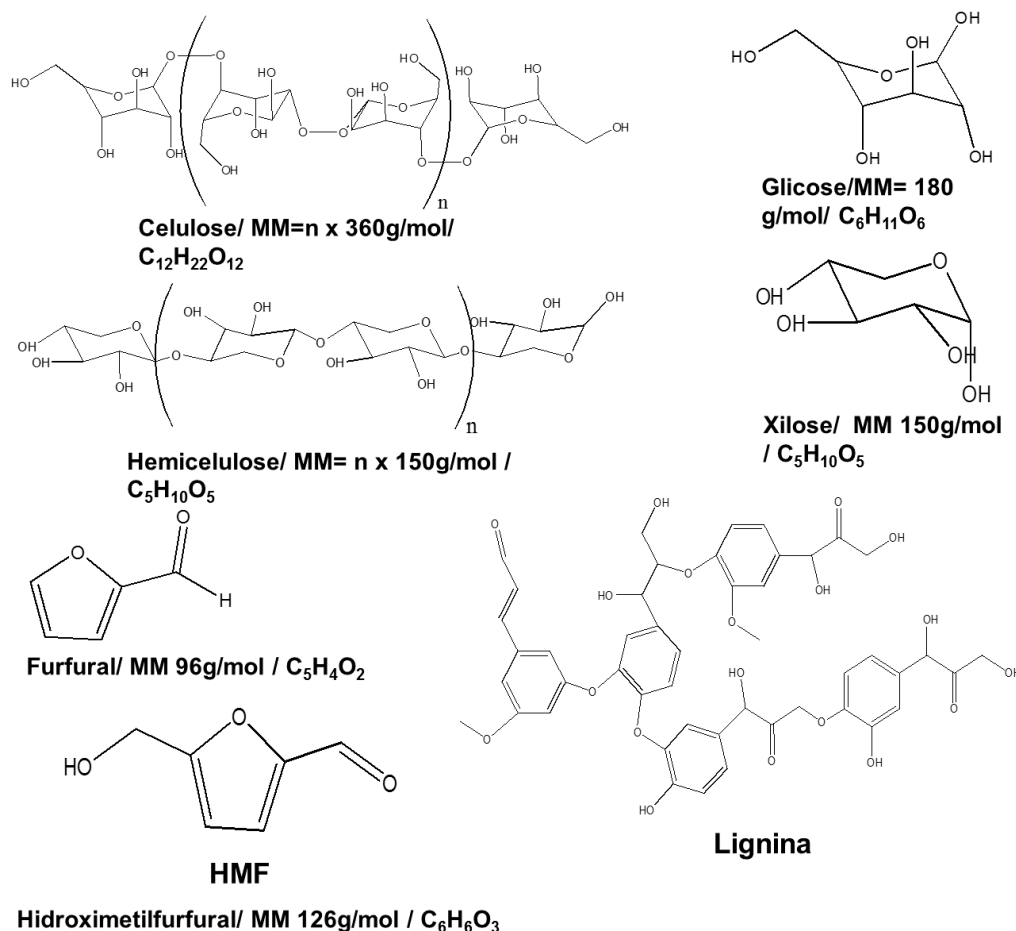


Figura 6: Estruturas químicas dos produtos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática da conversão de biomassa em etanol 2G.

Há vários tipos de pré-tratamento como: explosão ao vapor, hidrólise ácida, organossolve, dentre outros. Resumidamente, no processo de pré-tratamento por explosão ao vapor, a biomassa picada é submetida a um vapor saturado e a alta pressão, e então a pressão vai sendo diminuída até que haja uma descompressão explosiva (MCMILLAN, 1994). No caso, da hidrólise ácida, a biomassa é tratada com ácido diluído por um determinado tempo (SUN e CHENG, 2002); e no processo organossolve, uma mistura de solvente orgânico com catalisador ácido faz a quebra da estrutura lignocelulósica (SUN e CHENG, 2002). Neste trabalho serão analisados apenas licores provenientes do pré-tratamento com hidrólise ácida.

A hidrólise ácida é o tratamento da biomassa com soluções diluídas de ácidos, sendo o mais usado o ácido sulfúrico. Este procedimento pode ser

usado tanto na obtenção direta de hexoses quanto na quebra da hemicelulose que está cercando a celulose para disponibilizá-la a posterior hidrólise enzimática (KNAPPERT, GRETHLEIN e CONVERSE, 1980) (HORTON , RIVERS e EMERT, 1980).

Duas importantes variáveis nesta etapa são: a concentração do ácido e o tempo de reação com a biomassa, pois são essas condições que irão definir o rendimento da produção de etanol 2G. Dependendo das condições utilizadas, poderá haver uma melhor disponibilidade da celulose e de açúcares livres proveniente da hemicelulose, ou então a formação de inibidores da fermentação. Diversas pesquisas estão sendo conduzidas ultimamente com o objetivo de otimizar os processos de pré-tratamento evitando a produção de subprodutos que possam atuar como inibidores dos processos de conversão enzimática e fermentação (CHRISTOFOLETTI, 2010).

As principais desvantagens da hidrólise ácida são: necessidade de remoção da lignina antes do processo, um procedimento severo e laborioso; formação de hidroximetilfurfural e furfural, inibidores do processo de fermentação; redução do rendimento de produção por causa do ataque do ácido aos açúcares livres (OLIVÉRIO e HILST, 2005); desconhecimento das melhores condições de reação, pois além da condição errada levar a uma inibição total ou parcial da fermentação, o processo de otimização dessas condições é demorado, com alto custo e desperdícios.

A etapa seguinte é a hidrólise enzimática, onde ocorre a quebra da celulose em seus monômeros, hexoses, pela enzima celulase (GAN, ALLEN e TAYLOR, 2003). Há três tipos dessas enzimas no processo: endoglicanases, que quebram a celulose nas regiões de baixa cristalinidade; exoglicanases, que quebram a celulose em celobiose; β -glicosidases, que convertemos a celobiose em glicose (MANI, TABIL e OPUKU, 2002). No final desta etapa, os produtos principais gerados são a celobiose e a glicose.

Como desvantagem da hidrólise enzimática pode-se citar a inibição das enzimas celulasas pela celobiose e pela glicose. Então é importante que

durante essa etapa, a conversão da celobiose em glicose seja feita de forma rápida e eficiente para que o processo tenha um ótimo rendimento (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

A fermentação alcoólica com maior rendimento é aquela com melhor condição experimental do pré-tratamento e da hidrólise enzimática. Para obter essa condição é necessário, primeiramente, a realização de um planejamento experimental, sendo ele de qualquer tipo (planejamento fatorial 2^n , planejamento tipo estrela, entre outros) (LIMA e GOUVEIA, 2012). Nesse planejamento é preciso definir quais as variáveis (por exemplo, tempo de ação do ácido sulfúrico, concentração do ácido sulfúrico, entre outros) que podem interferir no experimento e os níveis de cada variável (por exemplo, 20 e 40 minutos, 0,5 mg/mL e 1,5 mg/mL, entre outros). Então faz-se os experimentos com todas as combinações dos fatores. Também pode-se fazer experimentos com valores intermediários (como exemplo, 30 minutos, 1 mg/mL entre outros). Dentro desses valores encontra-se uma condição com o maior rendimento, então faz-se outro planejamento com valores próximos a esses, até encontrar a melhor condição de todas (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2012).

Portanto, para saber se o experimento vai ter a produção de açúcares e não de inibidores e, posterior, produção do etanol e o melhor rendimento é preciso fazer análises dos licores obtidos em cada etapa da conversão.

Os métodos mais usados para analisar os produtos formados nestes processos são o CLAE e o CG (Cromatografia gasosa), como principais detectores se tem o UV/Vis, o índice de refração, o DAD (usado para detectar os inibidores furfural e hidroximetilfurfural em comprimento de onda 280nm) (WOLF, 2011) e, atualmente, o espectrômetro de massas, tanto para análises quali e quanto para análise quantitativa (HORST, 2013). Porém, essas técnicas têm algumas desvantagens que são: alto uso de reagentes e tempo de análise (próximo a uma hora por amostra).

A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais usada na fabricação de etanol. Portanto tem-se como desvantagem a fermentação exclusiva de hexoses. Atualmente, diversas pesquisas estão sendo realizadas, a fim de

encontrar um meio de aproveitar também as pentoses formadas durante o processo de fermentação alcoólica e aumentando, assim, o rendimento.

Como os processos de pré-tratamento e hidrólise ainda não estão otimizados, é necessário testar diferentes condições do processo, como concentração dos reagentes, tempo de reação, temperatura, entre outros, o que resulta em um grande número de amostras.

Portanto, é necessário um método analítico rápido, eficaz e sensível, capaz de identificar açúcares e inibidores em amostras provenientes de processos de pré-tratamento e hidrólise, a fim de identificar o melhor processo.

A proposta apresentada neste trabalho é utilizar o PS-MS como método de detecção de açúcares e inibidores formados nos processos de produção de etanol 2G.

Objetivos

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi construir um protótipo de PS e aplicá-lo como ferramenta analítica para a análise direta de inibidores das leveduras usadas no processo de fermentação (HMF e furfural) e de açúcares em licores provenientes das etapas de pré-tratamento e hidrólise ácida na produção do etanol de segunda geração.

2.2- Objetivos específicos

Como objetivos específicos têm-se:

- 1) Construção de um protótipo de PS;
- 2) Otimização:
 - a) Avaliação da distância entre a ponta do papel e o *MS Inlet*
 - b) Avaliação da influência do tipo de amostragem (*dry spot* ou aplicação direta) em PS;
 - c) Avaliação da influência de diferentes tipos de papéis na ionização de padrões de açúcares e aldeídos;
 - d) Avaliação do ângulo do triângulo usado;
 - e) Avaliação de modificações no papel, como barreira de parafina e arredondamento das pontas;
 - f) Avaliação do volume de aplicação da amostra no papel;
- 3) Aplicação:
 - a) Aplicação da metodologia em licores de pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar;
 - b) Aplicação da metodologia em licores de hidrólise enzimático do bagaço de cana-de-açúcar.

Metodologia

3- Metodologia

3.1- Reagentes e amostras

Os reagentes usados nas análises foram o metanol grau HPLC (J.T.Baker), ácido fórmico 99% RPE ACS PA (Carlo Erba reagentes), hidróxido de amônio (Sigma- Aldrich) e água milli-Q. Também foram utilizados padrões de açúcares (glicose, xilose, celobiose), ácidos (ácido acético, ácido láctico e ácido succínico), álcoois (glicerol e xilitol) e derivados furanos (HMF e furfural) (Sigma- Aldrich).

Os papéis utilizados foram: Whatman 3 MM, Whatman cromatográfico CHR 1, Whatman papel de filtro e Whatman Grade 1 (Whatman, GE Healthcare, USA).

As amostras de licores de pré-tratamento e de hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar foram fornecidas por pesquisadores da EMBRAPA Agroenergia. As concentrações das amostras de pré-tratamento estão listadas na Tabela 1, enquanto que as concentrações de glicose das amostras de hidrólise enzimática estão listadas na Tabela 2. Ambas amostras foram quantificadas por CLAE no laboratório de Processos Químicos e Bioquímicos da Embrapa Agroenergia.

Tabela 1: Concentrações em mg/mL dos açúcares livres e dos inibidores da fermentação das amostras de pré-tratamento quantificadas por CLAE.

Amostra	Celobiose	Glicose	Xilose	HMF	Furfural
PT1	0,00	0,16	2,16	0,00	0,00
PT2	0,24	1,12	32,98	0,00	0,00
PT3	0,00	0,61	21,30	0,00	0,00
PT4	2,62	5,44	52,70	0,00	0,64
PT5	0,65	1,63	41,35	0,00	0,19
PT6	0,45	1,69	47,70	0,00	0,20
PT7	2,05	3,01	49,39	0,01	0,29
PT8	0,10	0,10	0,68	0,00	0,00
PT9	2,44	3,56	52,64	0,04	0,42
PT10	0,00	0,43	16,01	0,00	0,00
PT11	2,81	4,98	57,08	0,06	0,49

3.2- Espectrometria de massas

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas LTQ XL (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com a fonte de PS acoplada em ambos os modos de ionização: positivo e negativo. Para as análises em modo positivo, utilizou-se uma solução de metanol contendo 0,1 % de ácido fórmico, e para as análises em modo negativo, utilizou-se metanol contendo 0,1 % de hidróxido de amônio. As condições operacionais utilizadas estão reportadas na Tabela 3.

Tabela 2: Condições operacionais do Espectrômetro de Massas ion trap LTQ XL.

Condições operacionais		
Parâmetros	Modo Positivo	Modo Negativo
Tensão do Spray	3-4 kV	3-4 kV
<i>Tube Lens</i>	90 V	-110 V
Tensão do capilar	35 V	-43V
Temperatura do capilar	275°C	275°C

3.3- Fonte de ionização PS

3.3.1- Montagem da fonte de PS e avaliação de seu funcionamento

A fonte de PS foi montada prendendo-se um pedaço de papel, cortado com geometria triangular (base e altura de 1 cm), a uma garra, do tipo jacaré, conectada a um fio de 0,5 mm ligado ao espectrômetro de massas (LIU, WANG, *et al.*, 2010).

A Figura 7 ilustra o protótipo da fonte de PS construído neste trabalho. A montagem do protótipo da fonte de PS foi realizada seguindo a descrição de Yang *et al.* (YANG, WANG, *et al.*, 2012). A vantagem de montar o PS no espectrômetro de massas LTQ XL é não precisar utilizar uma fonte de alta voltagem, pois o fio é conectado diretamente na sonda de alta voltagem do ESI.

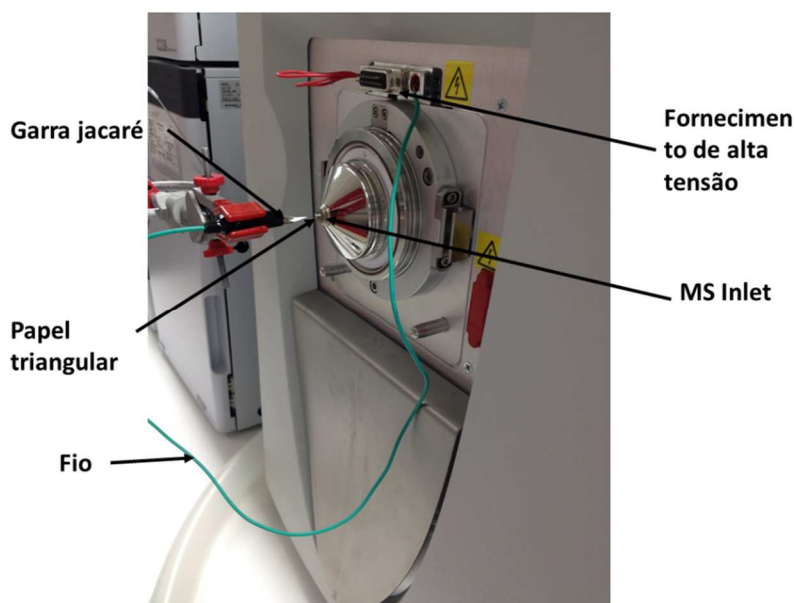


Figura 7: Fonte de PS *homemade* conectada ao Espectrômetro de Massas.

Realizou-se a análise por PS aplicando uma pequena quantidade de solução do analito em metanol levemente ácido, para o modo positivo, ou levemente alcalino, para o modo negativo, sobre o papel. Em seguida aplicou-se a voltagem (3-4 kV) (YANG, WANG, *et al.*, 2012) observando-se a formação de um *spray*.

Para avaliar o funcionamento do PS foi adaptado o procedimento descrito por Lalli *et al.* analisando o perfil de compostos químicos presentes em tintas de caneta esferográfica (LALLI, SANVIDO, *et al.*, 2010). Escolheu-se a tinta de caneta, pois além de não usar padrões de alto custo e ser facilmente ionizado, a tinta de caneta não precisa secar para analisar.

Porém, o uso da caneta tem-se a desvantagem da degradação da tinta por causa da luz, o que gera outros produtos identificados.

3.3.2- Detecção de padrões dos principais produtos do processo de produção de etanol 2G

As análises foram realizadas utilizando dois padrões, um contendo uma mistura de açúcares (glicose, xilose e celobiose) e o outro contendo uma mistura de açúcares e inibidores formados (glicose, xilose, celobiose, HMF, furufural, ácido acético, ácido láctico, ácido succínico, glicerol e xilitol) nas etapas de pré-tratamento e hidrólise do processo de produção do etanol 2G.

3.4- Otimização do método de análise

3.4.1- Aplicação da amostra

As amostras foram aplicadas utilizando os métodos aplicação à seco e aplicação direta. O método de aplicação a seco consistiu na aplicação de um volume de 10 µL da solução de padrões de xilose, glicose e celobiose em água, na concentração de 0,1 mg/mL, no papel deixando-o secar por um dia (WANG, REN, *et al.*, 2013). Fixou-se o papel à fonte de ionização PS, adicionou-se 10 µL de ácido fórmico em metanol 0,1% e adquiriu-se os dados. Já no método por aplicação direta, o papel foi fixado na fonte de ionização PS, iniciando-se a aquisição da análise e aplicando 10 µL de uma mistura da solução contendo padrões de açúcares e metanol levemente ácido (1:19, v/v).

3.4.2- Avaliação da influência do tipo de papel

A influência do tipo de papel foi avaliada realizando-se a análise de uma solução de xilose e glicose em quatro tipos de papel: Whatman 3MM; Whatman Cromatográfico; CHR 1; Whatman Papel de Filtro 12,5mm; Whatman Grade 1 utilizado em PS.

3.4.3- Avaliação da influência do ângulo do triângulo

A resposta da fonte de ionização PS em relação ao ângulo do papel triangular foi avaliada analisando-se soluções aquosas dos padrões de açúcares xilose e glicose, com triângulos cortados nos ângulos de 30°, 45°, 60°, 90°, 120° e 150° e comparando-se as intensidades absolutas dos sinais dos espectros.

3.4.4- Avaliação da influência de modificações no papel

Foram realizadas duas modificações no papel: o arredondamento das pontas laterais do triângulo (Figura 8a) e a aplicação de uma barreira de parafina (Figura 8b). Essas modificações foram comparadas com o resultado do papel sem modificação (Figura 8c).

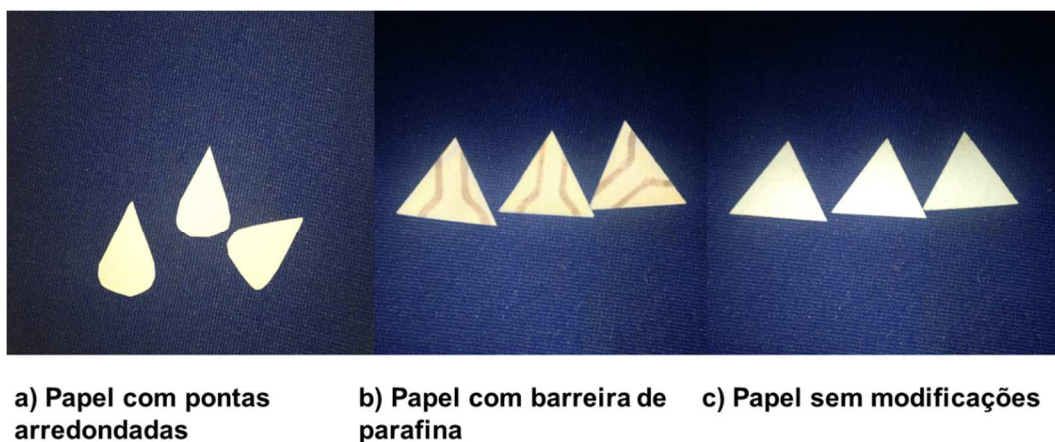


Figura 8: Fotos dos papéis modificados a) com pontas laterais arredondadas e b) com barreiras de parafina c) papel sem modificações.

O papel com pontas arredondadas foi preparado cortando-se as pontas laterais do triângulo de papel.

A aplicação da barreira de parafina no papel foi realizada segundo procedimento reportado por Garcia *et al.* (GARCIA, CARDOSO, *et al.*, 2014). Primeiramente, uma folha de papel de filtro foi inserida na parafina líquida a 90°C, durante 1 minuto, e em seguida, mantida a temperatura ambiente para completa secagem. O papel de formato triangular foi colocado sobre uma folha de papel sulfite, e então um papel de filtro parafinado foi colocado por cima. Um carimbo de metal, fabricado em aço inoxidável (MS Máquinas, Goiânia, Brasil), foi pré-aquecido a 180 ° C em uma estufa por 2 minutos e pressionado no papel parafinado para carimbar a barreira de parafina (Figura 9).

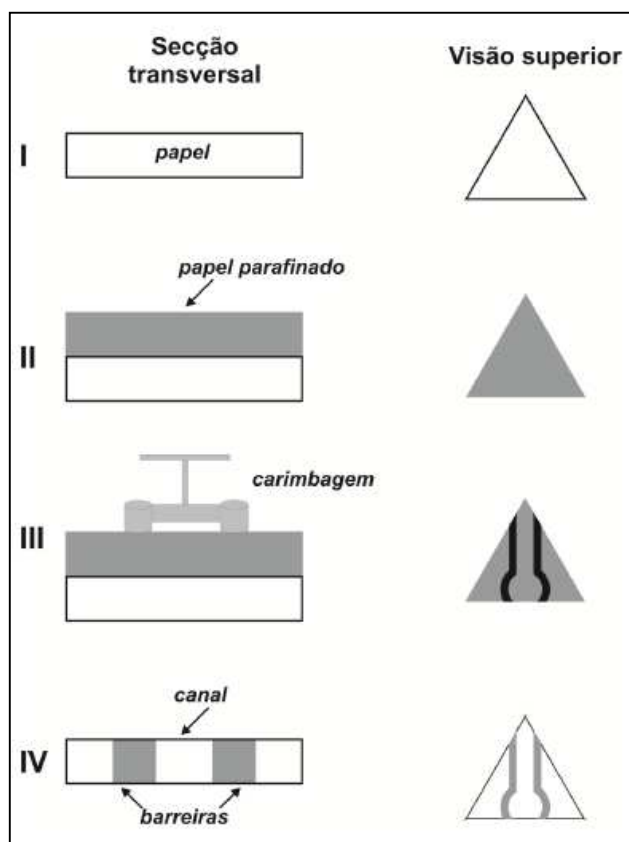


Figura 9: Esquema de aplicação da barreira de parafina no papel triangular.

Com o papel modificado, após a construção de um canal de parafina ou o corte das pontas laterais, efetuou-se a análise de açúcares como a xilose e a glicose, de derivados furanos como o hidroximetilfurfural, e do licor do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar proveniente do pré-tratamento, no modo positivo, e também a análise de padrões de ácidos como o ácido esteárico e ácido oxalacético.

3.4.5- Avaliação da influência do volume de amostra aplicado ao papel

Para avaliar a influência do volume de amostra nas respostas da fonte de PS, uma solução contendo os padrões de xilose e glicose foi aplicada no interior do canal de parafina em volumes de 1, 5 e 10 μL . As intensidades dos íons sodiados da xilose e da glicose, respectivamente, foram comparadas de acordo com o volume.

3.5- Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica

A repetibilidade da técnica foi avaliada após a análise da solução aquosa dos padrões de xilose e glicose e celobiose (0,1 mg/mL), em nove diferentes horários do dia. Para tanto, foram aplicados 10 μL da solução de padrões de açúcares no papel, e após secagem (4 horas), foram realizadas as análises por PS-MS. As análises foram feitas em triplicatas. A diferença de tempo entre uma aplicação e outra foi de 30 minutos.

A reprodutibilidade foi realizada repetindo-se o estudo de repetibilidade por 6 dias.

Os dados obtidos foram avaliados com o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2012) com confiança de 95%.

3.6- Aplicação do método na caracterização de licores do pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Um volume de 10 μL das amostras provenientes dos processos de pré-tratamento e hidrólise foram aplicadas separadamente em um papel triangular e mantidas em temperatura ambiente até completa secagem. Os parâmetros encontrados na otimização foram usados para a análise nos modos de ionização positivo e negativo, para a caracterização do licor de pré-tratamento, e apenas no modo positivo para a caracterização do licor de hidrólise. Experimentos de MS/MS foram realizados para identificação dos analitos detectados por MS.

3.7- Quantificação da glicose em licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

A quantificação da glicose em licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada utilizando soluções aquosas de padrão de glicose com concentração de 1, 5, 10, 50, 150, 250, 500 mmol/L, nas quais foram adicionadas 50 mmol/L de padrão de glicose deuterada (1:1 v/v).

Aplicou-se 10 μL das soluções de padrões no papel triangular e deixou-se secar por 4 horas. Analisou-se os padrões por PS(+)-MS e em cada concentração obteve-se a razão glicose/glicose deuterada. As análises foram realizadas em triplicatas.

Resultados e discussão

4- Resultados e Discussões

4.1- Montagem da fonte de ionização PS

Um pedaço de papel triangular foi fixado a garra do tipo jacaré conectada à um fio de 30 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, ligado ao espectrômetro de massas. Note-se que a montagem da fonte é bem simples e de baixo custo. A demais, com uma folha de papel (20 cm x 20 cm) podem ser realizadas em torno de 400, o que torna a técnica acessível a qualquer laboratório de espectrometria de massas.

Todo protótipo de fonte de ionização construído requer o uso de um padrão, cuja ionização seja fácil e eficiente para avaliar o seu desempenho. Para o protótipo construído, utilizou-se tinta de caneta esferográfica como padrão de ionização. Este padrão é utilizado rotineiramente para avaliar o desempenho da fonte de ionização *Easy Ambient Sonic spray Ionization* (EASI) (LALLI, SANVIDO, *et al.*, 2010). O principal corante encontrado em canetas esferográficas de tinta azul é Violeta 3 (m/z 372) e já os principais da vermelha são Rodamina B ou Rodamina 6G (m/z 443) (LALLI, SANVIDO, *et al.*, 2010).

A Figura 10 ilustra os espectros de massas da caneta azul e vermelha analisados por EASI(+)-MS (A e B) (LALLI, SANVIDO, *et al.*, 2010) e por PS(+)-MS (C e D). Observa-se que houve a identificação do corante violeta 3, $[M+H]^+$ m/z 372, como também a identificação das formas demetiladas do corante, $[M-CH_3]^+$ m/z 358 e $[M-2CH_3]$, após a decomposição da tinta (Figura 10c). Na Figura 10d, tem-se o espectro de PS(+)-MS da caneta vermelha, a identificação do íon de m/z 443 referente ao corante Rodamina ou Rodamina 6G, que são corantes característicos do que a caneta vermelha possui. Também foi detectado a presença do íon referente a substituição do acetado por hidrogênio devido a decomposição da tinta, o íon de m/z 359. A Figura 11 apresente as formulas químicas do corantes citados.

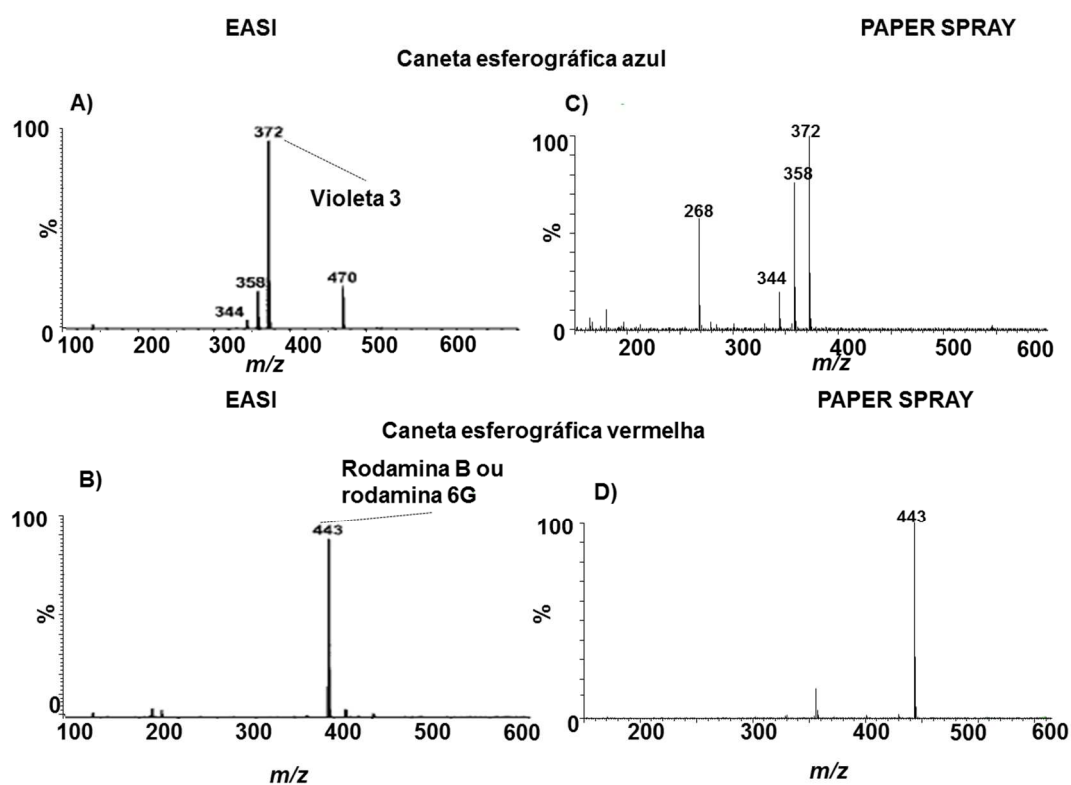


Figura 10: Espectros de massas de canetas esferográficas azul e vermelha obtidos por EASI (+)-MS (A,B) e PS(+)-MS (C,D).

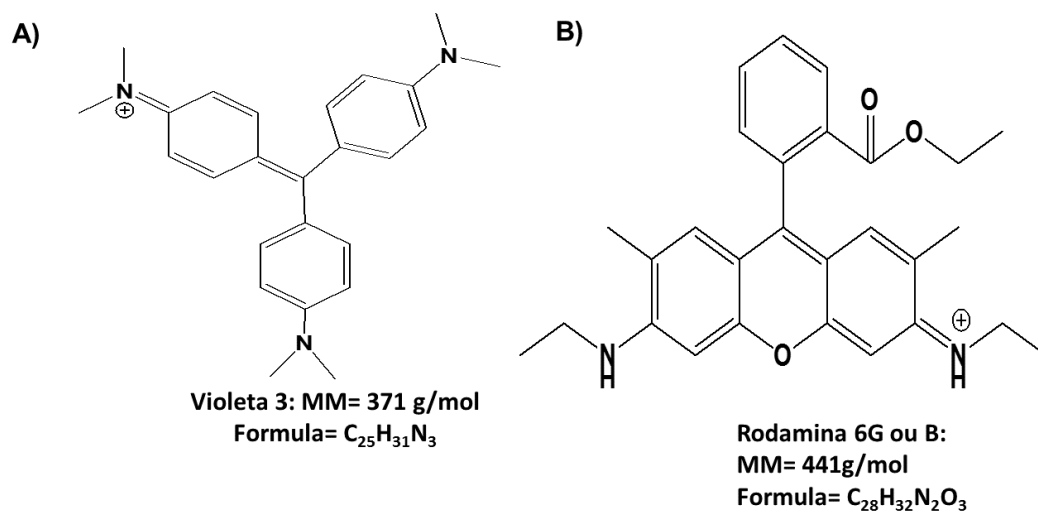


Figura 11: Estruturas química do pigmento da tinta azul: Violeta 3 (A); e do pigmento da tinta vermelha: Rodamina (B)

A distância da fonte de ionização PS para o analisador de massas também foi avaliada. Foi observado que a intensidade do sinal decai rapidamente em distâncias superiores a 3 mm da ponta triangular do papel ao MS *inlet* (cone de entrada do espectrômetro de massas). Em distâncias curtas, menores que 1 mm, observa-se a formação de descargas elétricas devido a fechamento de circuitos. No entanto em distâncias entre 1-3 mm, a intensidades dos padrões não sofreram grandes variações. Estes dados corroboram com os resultados de Liu *et al.* (Figura 12) (LIU, WANG, *et al.*, 2010).

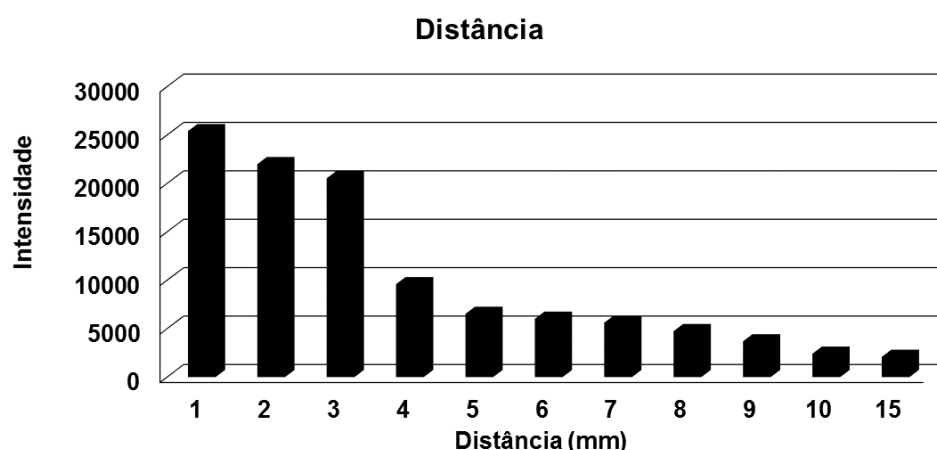


Figura 12: Gráfico de intensidades absolutas da glicose, m/z 203, em diferentes distâncias da ponta do papel ao MS *Inlet*.

Após a montagem da fonte de PS-MS, verificou-se sua eficiência para a análise de padrões de açúcares e aldeídos, analitos que serão determinados nos licores. Para alcançar este propósito, dois padrões foram analisados, um contendo apenas açúcares (D1) e o outro contendo açúcares e inibidores formados (H6) nas etapas de pré-tratamento e hidrólise do processo de produção do etanol 2G. A Tabela 3 ilustra a fórmula molecular e os possíveis íons gerados para os constituintes de cada padrão.

Tabela 3: Padrões de açúcares, ácidos, álcoois e derivados furanos usados durante a otimização do método com o PS-MS.

Formula molecular	Composto	Modo positivo		Modo negativo		Substância em solução 1	Substância em solução 2
		[M+Na] ⁺	[M+ H] ⁺	[M-H] ⁻	[M+Cl] ⁻		
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Celobiose	365	343	341	377	X	X
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose Manose Galactose	203	181	179	215	X	X
C ₅ H ₁₀ O ₅	Xilose Arabinose	173	151	149	185	X	X
C ₂ H ₄ O ₂	Ácido acético	83	61	59	95	X	X
C ₃ H ₆ O ₃	Ácido láctico	113	91	89	125		X
C ₄ H ₆ O ₄	Ácido succínico	141	119	117	153		X
C ₃ H ₈ O ₃	Glicerol	115	93	91	127		X
C ₅ H ₁₂ O ₅	Xilitol	174	153	151	187		X
C ₂ H ₆ O	Etanol	69	47	45	81		X
C ₅ H ₄ O ₂	Furfural	119	97	95	131		X
C ₆ H ₆ O ₃	Hidroximetilfurfural	149	127	125	161		X

A Figura 13 ilustra os espectros de massas obtidos para os padrões em modo positivo e negativo. Nota-se a detecção de açúcares como o glicerol, $[M + Na]^+$ de m/z 115, o xilitol, $[M + H]^+$ de m/z 175, xilose, $[M + Na]^+$ de m/z 173, glicose, $[M + Na]^+$ de m/z 203 e celobiose, $[M + Na]^+$ de m/z 365, derivados furânicos como o furfural, $[M + Na]^+$ de m/z 119 e ácidos como o ácido succínico, $[M + Na]^+$ de m/z 141. Uma vez detectados os analitos de interesse, pode-se afirmar que o método de ionização utilizado é apropriado para análise dos possíveis produtos da conversão de biomassa.

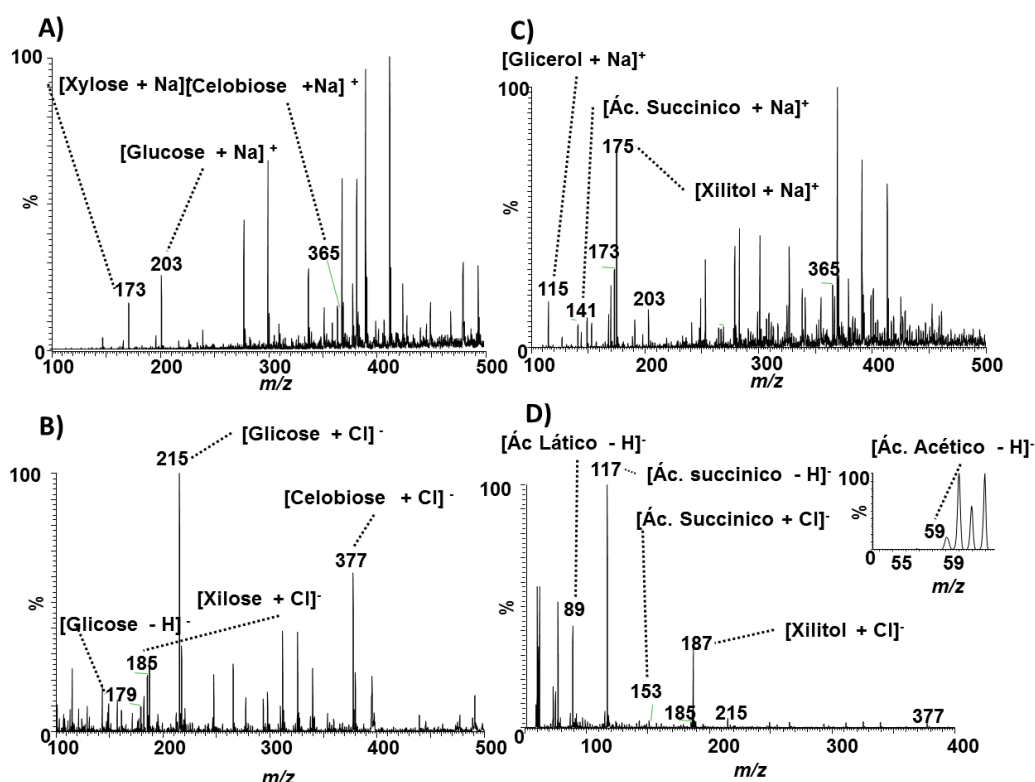


Figura 13: Espectros de A) Padrões de açúcares por PSI(+)-MS; B) Padrões de açúcares por PS (-)-MS; C) Padrões de açúcares, derivados furanos, ácidos e alcóois por PS (+)-MS; D) Padrões de açúcares, derivados furanos, ácidos e alcóois por PS (-)-MS.

4.2- Otimização do método

4.2.1- Aplicação da amostra.

A aplicação da amostra foi avaliada por dois modos: aplicação à seco, o qual consiste em umedecer o papel com 10 μL de amostra e deixando-o secar em condições ambientes (WANG, REN, *et al.*, 2013); e a aplicação direta que consiste na aplicação da solução contendo o analito e logo em seguida a aplicação de alta voltagem do processo de ionização (LIU, WANG, *et al.*, 2010).

Os melhores resultados foram obtidos com a forma aplicação a seco, como ilustrado na Figura 14. O modo de aplicação direta além de fornecer menor intensidade absoluta para os íons de interesse apresenta alguns inconvenientes (Figura 15), como a formação de um filme espesso da solução sobre o papel. Com a aplicação de alta voltagem, tem-se por desequilíbrio do sistema a formação de gotas que são atraídas para dentro do espectrômetro de massas. Estas gotas contêm grande proporção de analitos que acabam contaminando o espectrômetro de massas.

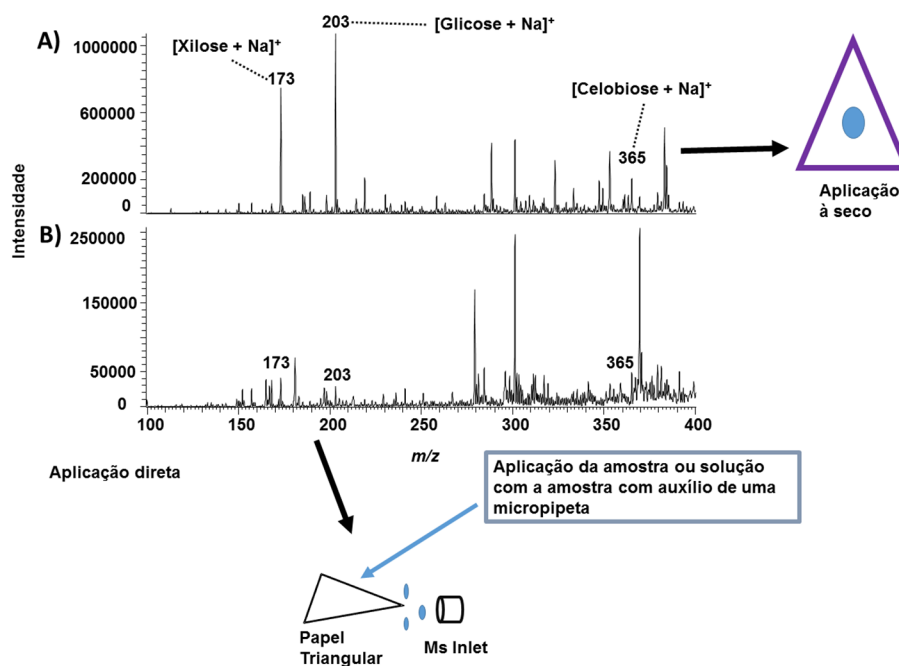


Figura 14: Espectros de PS (+)-MS dos padrões obtidos pelo método a) aplicação a seco e b) aplicação direta da amostra

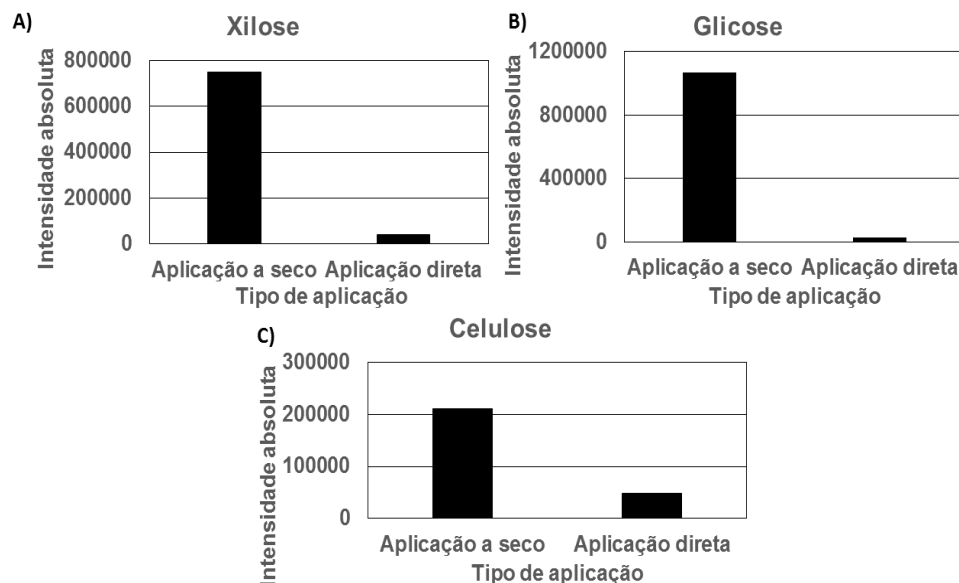


Figura 15: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: xilose, glicose e celobiose obtidas a partir dos espectros de PS(+)-MS nos dois modos de aplicação da amostra.

4.2.2- Avaliação da influência do tipo de papel

O papel é um material hidrofílico composto majoritariamente por fibras de celulose. No papel, as cadeias celulósicas consistem em aproximadamente 1000 monômeros de glicose. Estas cadeias poliméricas se aproximam umas próximas às outras e são ligadas por ligações de hidrogênio. Este arranjo de conexão de cadeias celulósicas forma microcanais que permitem o transporte de solventes e analitos por capilaridade. (STEPHENS, SHRESTHA, *et al.*, 2010)

As principais razões para estudar o tipo de papel para experimentos de PSI-MS são: i) os açúcares podem interagir fortemente com o papel; ii) a porosidade do papel pode influenciar na quantidade de íons formados, iii) as impurezas oriundas do processo de fabricação do papel podem interferir na análise. (SU, WANG, *et al.*, 2013). Portanto, é importante avaliar o impacto do tipo de papel na ionização de açúcares.

A Tabela 4 ilustra as dimensões de poro de cada papel avaliado. Comparando o papel cromatográfico 3 MM, o papel de filtro e o grade 1

observa-se que quanto menor o tamanho dos poros do papel melhor é o resultado da análise. Esse resultado corrobora com os resultados observados por Liu *et al.* que também demonstrou que o tipo de papel que fornece os melhores resultados é o Whatman Grade 1 com porosidade de 0,18 mm (LIU, WANG, *et al.*, 2010). Entretanto, o papel cromatográfico, que apresenta as mesmas dimensões de poro do Whatman Grade 1, forneceu espectros com as menores intensidades de sinais. Uma possível explicação, é a maior adsorção dos açúcares neste papel o que prejudica a dessorção e consequente impacta negativamente na intensidade iônica dos espectros.

Tabela 4: Tamanho dos poros dos diferentes tipos de papéis e as intensidades absolutas provenientes dos espectros de PS(+)-MS do padrão com glicose, xilose e celobiose.

Tipo de papel	Tamanho dos poros	Intensidade absoluta da Glicose	Intensidade absoluta da Xilose	Intensidade absoluta da Celobiose
Cromatográfico CHR 1	0,18 mm	35663	22573	20694
3mm	0,34 mm	26158	48734	16397
Papel de filtro	0,20 mm	103124	58822	32368
Whatman grade 1	0,18 mm	963149	441583	113238

A Figura 16 descreve a variação da intensidade absoluta de xilose (m/z 173), glicose (m/z 203) e celobiose (m/z 365), todos detectados como adutos de sódio, $[M + Na]^+$, em função do tipo de papel. Note que o papel que apresentou os melhores resultados foi o Grade 1. A Figura 17 ilustra os espectros de massas do padrão de açúcares analisados com os diferentes tipos de papéis. O papel Grade 1 apresentou os melhores resultados, uma vez que o espectro de massas detectou os íons referentes aos açúcares com maior intensidade e menor razão sinal/ruído.

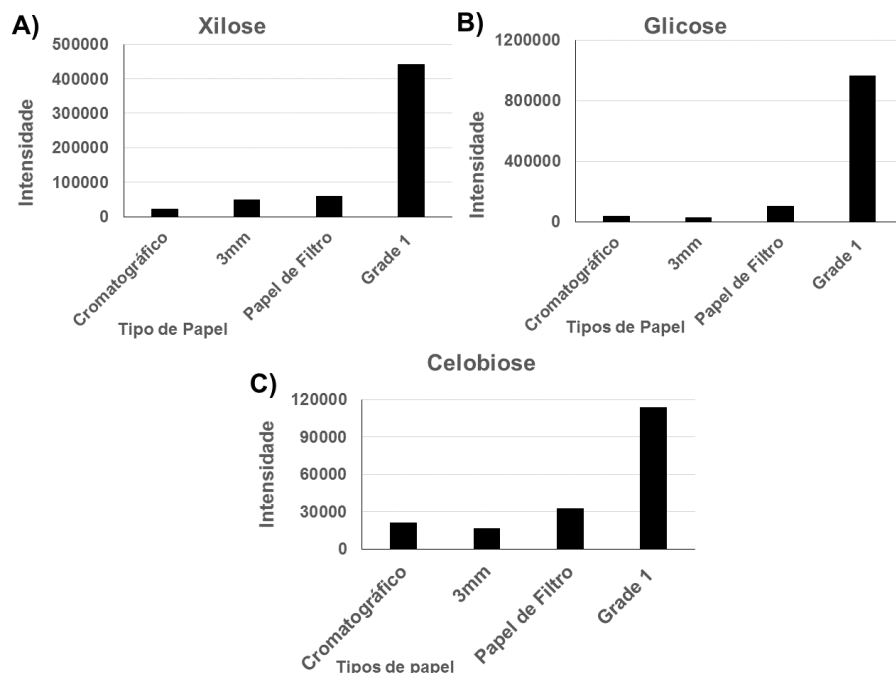


Figura 16: Gráficos de intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: a) xilose, b) glicose (B) e c) celobiose obtidos a partir dos espectros de PS(+)-MS utilizando os tipos de papéis Whatman 3mm; Whatman Cromatográfico; CHR 1; Whatman Papel de Filtro 0,2mm; Whatman Grade 1.

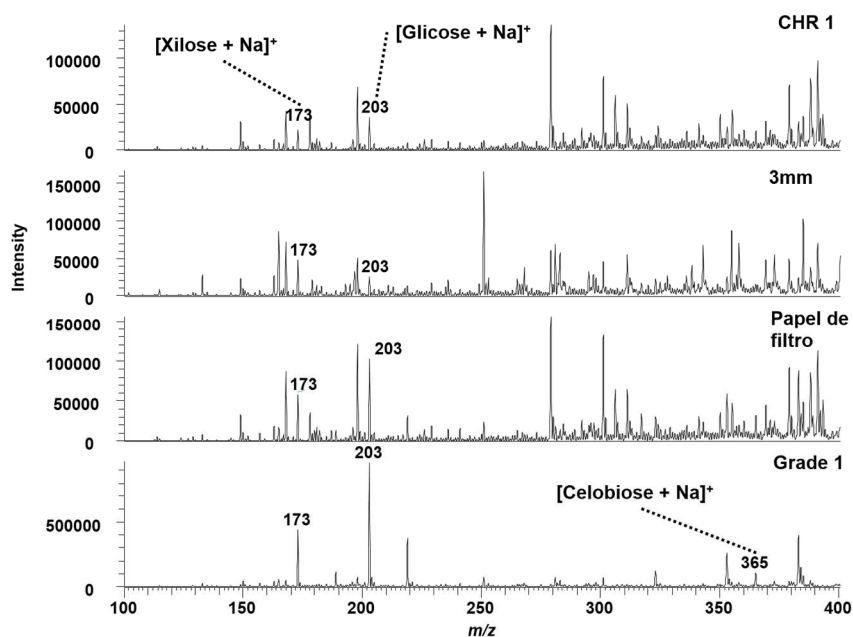


Figura 17: Espectros de PS (+)-MS dos padrões de açúcares em diferentes tipos de papel: Whatman Cromatográfico CHR 1; Whatman 3mm; Whatman Papel de Filtro 0,2 mm Whatman Grade 1

4.2.3- Avaliação da influência do ângulo do triângulo

O estudo da resposta do ângulo da ponta do papel triangular foi realizado avaliando as intensidades absolutas do padrão de xilose e de glicose nos ângulos de 30°, 45°, 60°, 90° 120° e 150°.

Os gráficos de intensidade no papel em diferentes ângulos estão descritos na Figura 18. Note que os melhores ângulos foram de 30° ao 60°, sendo que o sinal com maior intensidade foi detectado utilizando-se o ângulo de 60°. Para ângulos maiores que 90°, note um decaimento na intensidade do sinal, chegando a zero (sem detecção do sinal) para o ângulo de 150°. Esta observação também pode ser confirmada pelos espectros de massas (Figura 19). Estes resultados corroboram com os resultados encontrados estudos publicados por Yang e seus colaboradores (YANG, WANG, *et al.*, 2012).

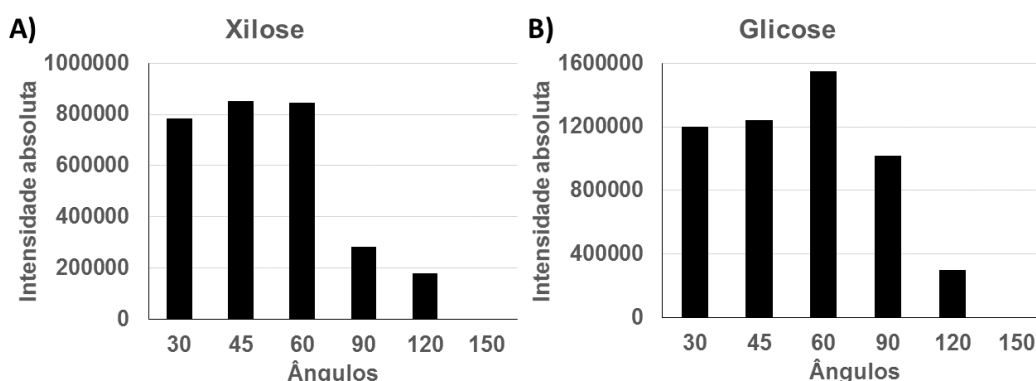


Figura 18: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares: xilose, glicose e celobiose obtidos a partir dos espectros de PS(+) nos diferentes ângulos da ponta afiada do triângulo

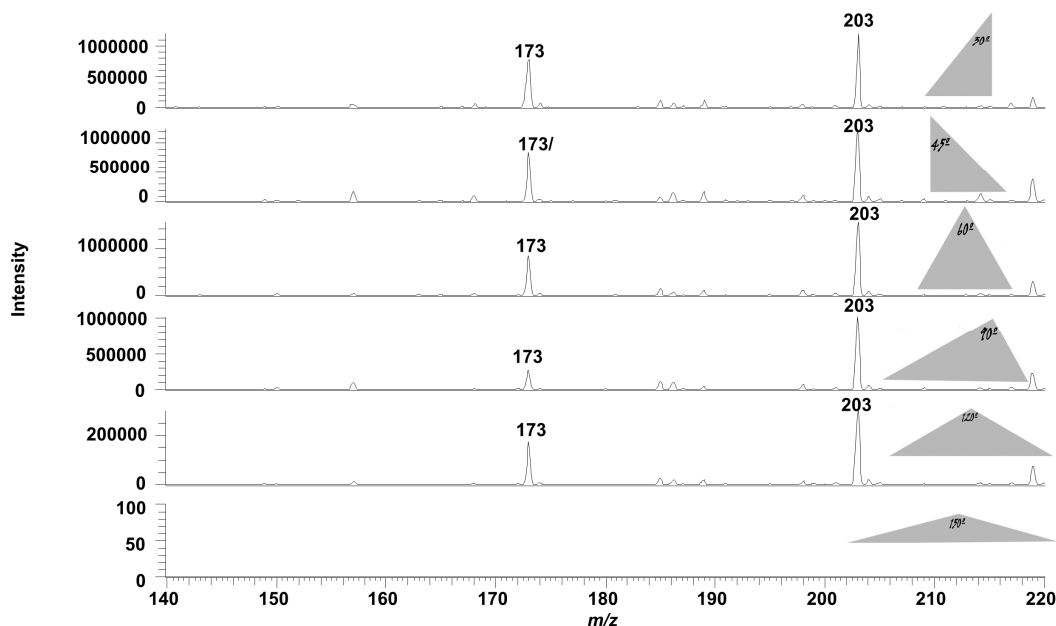


Figura 19: Espectros de PS (+) -MS para a avaliação da influência do ângulo do papel triangular.

4.2.4- Avaliação da influência de modificações no papel

A diferença de voltagem entre o papel e o *MS Inlet* gera um campo elétrico, com máximo na ponta do triângulo que fica situado a frente do espectrômetro de massas (YANG, WANG, *et al.*, 2012). Este campo elétrico é o responsável pela dessorção/dessolvatação dos íons do analito. Porém sua magnitude também é apreciável nas outras pontas do triângulo e, assim, a dessorção também ocorre por elas (YANG, WANG, *et al.*, 2012). Esse fenômeno ocasiona na perda de analitos, diminuindo a sensibilidade do método e comprometendo o desenvolvimento de ensaios quantitativos.

Para aumentar a intensidade iônica e obter uma análise que forneça uma composição mais real da amostra, foram feitas modificações no papel tais como: arredondamento das pontas laterais do triângulo e construção de canal de parafina (GARCIA, CARDOSO, *et al.*, 2014). Em especial, a construção de um canal evita a dispersão do analito sobre toda superfície do papel minimizando a perda por adsorção no papel.

O canal, como ilustrado pela Figura 9, foi construído criando uma barreira hidrofóbica de parafina para delimitar a região onde o fluido, solução em metanol, flui. Após os principais parâmetros para análise com os novos protótipos de substrato para o PS serem otimizados, analisou-se algumas amostras: ácido esteárico, ácido oxalacético, xilose, glicose, hidroximetilfurfural (padrão) e no licor de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar. Estas análises tem o objetivo de comparar a eficiência de ionização deste protótipo com a de outros protótipos descritos na literatura como: papel triangular tipicamente utilizado nas análises de PS e o papel triangular com duas pontas arredondadas.

A figura 20 representa os gráficos das intensidades dos sinais provenientes dos espectros de PS-MS para cada uma das amostras analisadas por tipo de modificação no papel. Note que o papel com o canal de parafina, o parafinado, apresentou o melhor desempenho por fornecer intensidades iônicas para cada um dos íons monitorados em maior abundância. Esse aumento foi de 1,2 até 3,5 vezes a mais em relação ao papel arredondado e de 2,8 até 11,3 em relação ao papel normal.

Também foi observado que além do aumento da intensidade de sinal, houve uma perceptível diminuição da relação sinal/ruído, como visto no espectro de PS-MS do HMF (Figura 21). Além de melhorar significativamente a intensidade de sinal, a canal de parafina surge como uma boa estratégia também para o acoplamento da espectrometria de massas com a microfluídica (GARCIA, CARDOSO, *et al.*, 2014).

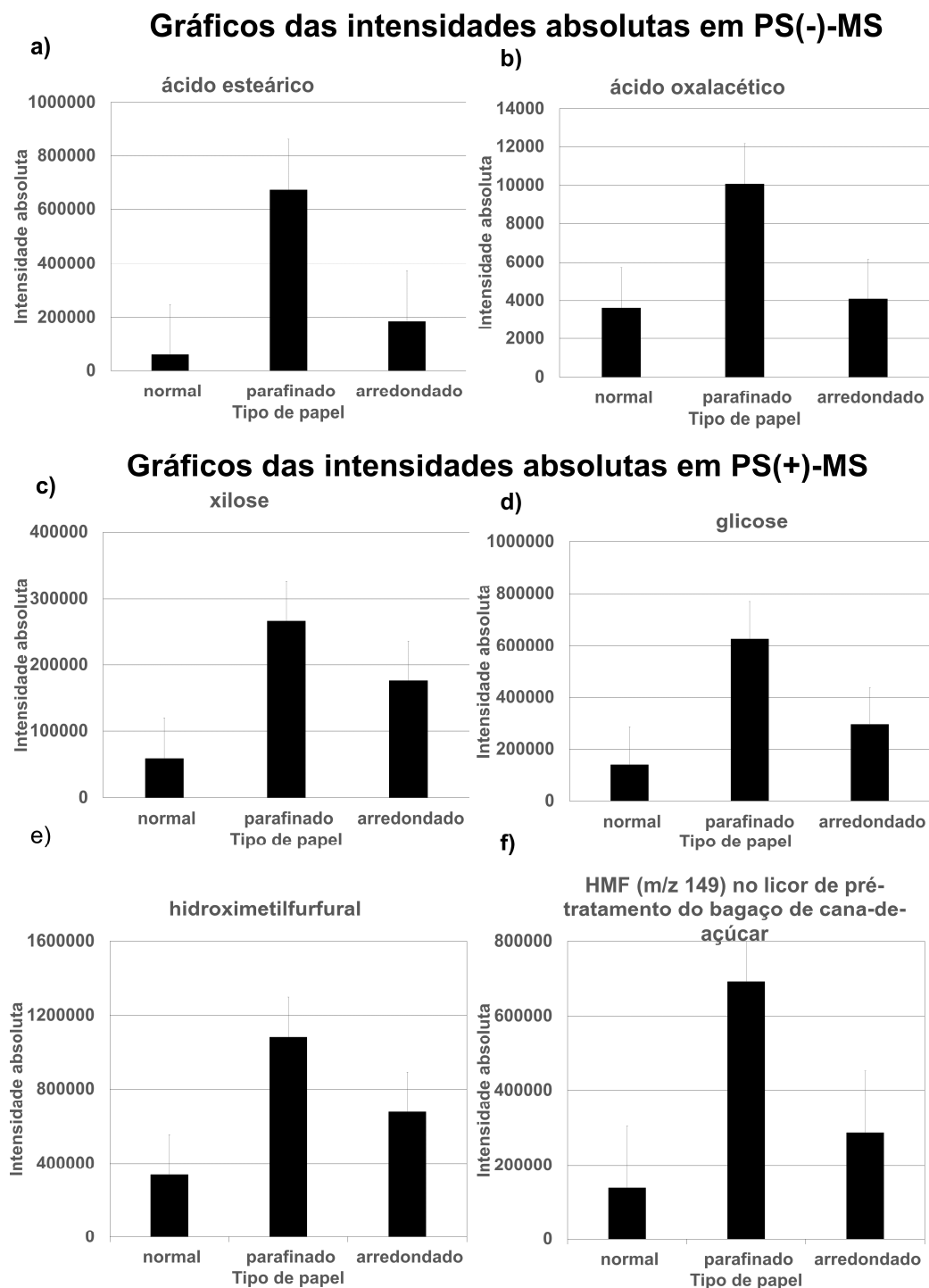


Figura 20: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes ao a) ácido esteárico; b) ácido oxalacético, c) xilose; d) glicose; e) HMF; f) Licor de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, obtidos a partir dos espectros de PS(-)-MS e PS(+)-MS nas diferentes modificações de papel.

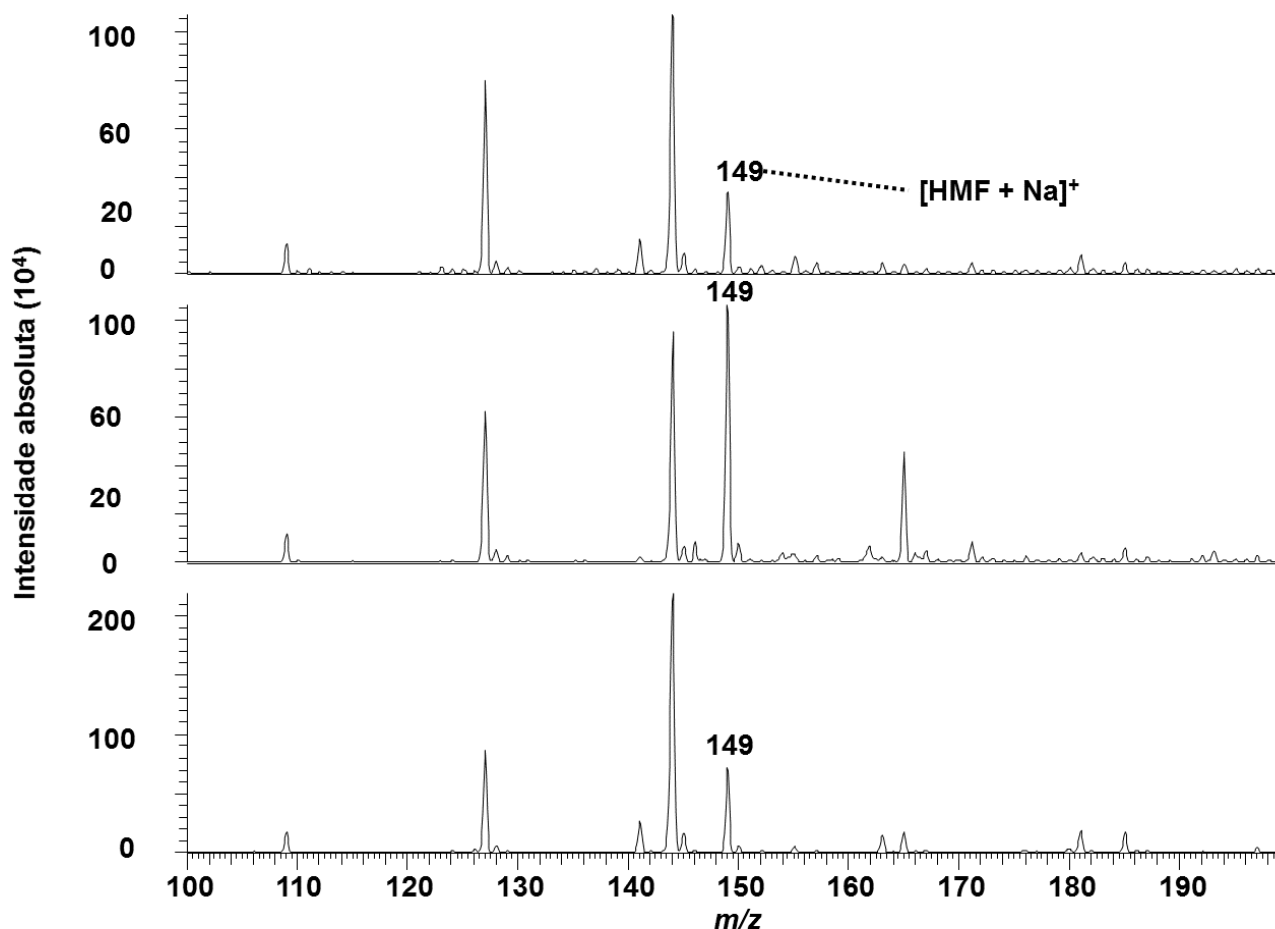


Figura 21: Espectros de PS(+)-MS do padrão de hidroximetilfurfural nos papéis: a) triangular normal, b) com barreira de parafina e c) com pontas arredondadas.

Também foi avaliado se as modificações no papel têm alguma influência no tempo de duração do *spray*. A figura 22 mostra os cromatogramas de íon total de análises com os três tipos de papel. Observa-se que o tempo de duração do papel com as pontas arredondadas é de 1,0 minuto, o tempo do papel normal é de 1,2 minutos e do papel com canal de parafina é de 2,5 minutos. Sendo assim, o canal de parafina faz com que dobre o tempo do *spray*. A explicação provável é que a parafina retém por mais tempo a solução aplicada ao papel, e assim a sua eluição até a ponta em frente ao espectrômetro de massas é mais lenta.

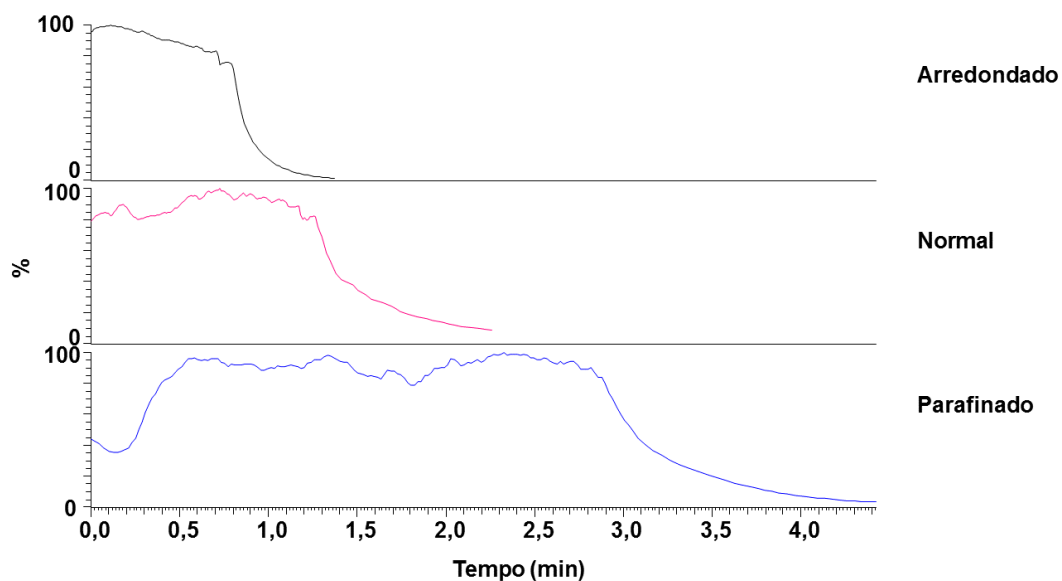


Figura 22: Cromatogramas de íons total do papel com pontas arredondadas, o papel sem modificações e do papel com canal de parafina obtidos em análises com PS-MS.

4.2.5- Avaliação do volume de amostra aplicado no papel parafinado

O volume de amostra aplicado para análise por PS-MS utilizando o papel parafinado é um importante parâmetro que deve ser avaliado. Aplicação de grandes volumes pode acarretar em um transbordamento do canal papel comprometendo o objetivo da construção do protótipo, o de evitar o espalhamento da solução por todo papel. Do mesmo modo, aplicação de um volume pequeno de amostra pode levar a uma rápida evaporação do solvente o que também comprometerá a análise (YANG, WANG, *et al.*, 2012).

Com o objetivo de avaliar este parâmetro, monitorou-se as intensidades absolutas dois padrões: xilose e glicose em função do volume de solução aplicado (1, 5 e 10 μL). A adição de volumes superiores de 10 μL ocasionam o transbordamento da solução do canal. Este é o motivo por ter avaliado apenas os três volumes citado anteriormente. A Figura 23 ilustra os gráficos de intensidades provenientes dos espectros de PS(+)-MS da xilose e glicose obtidos após a aplicação dos volumes especificados. Observe que a intensidade

absoluta aumenta em função do volume aplicado. As intensidades dos sinais aumentam em função do volume. Os espectros de massas por PS (+)-MS dos padrões de xilose e glicose confirmam esse resultado fornecendo uma melhor razão sinal/ruído (Figura 24 e 25).

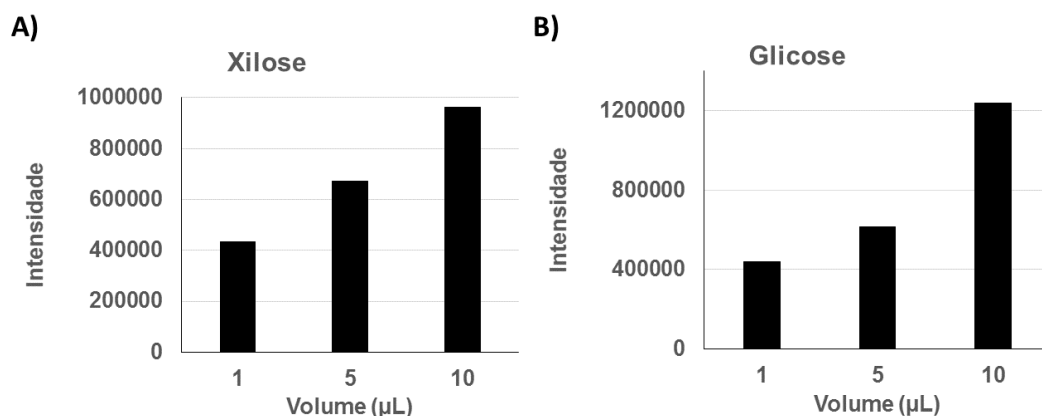


Figura 23: Gráficos das intensidades absolutas dos íons referentes aos açúcares xilose e glicose, obtidos a partir dos espectros de PS(+)-MS nos diferentes volumes de amostra.

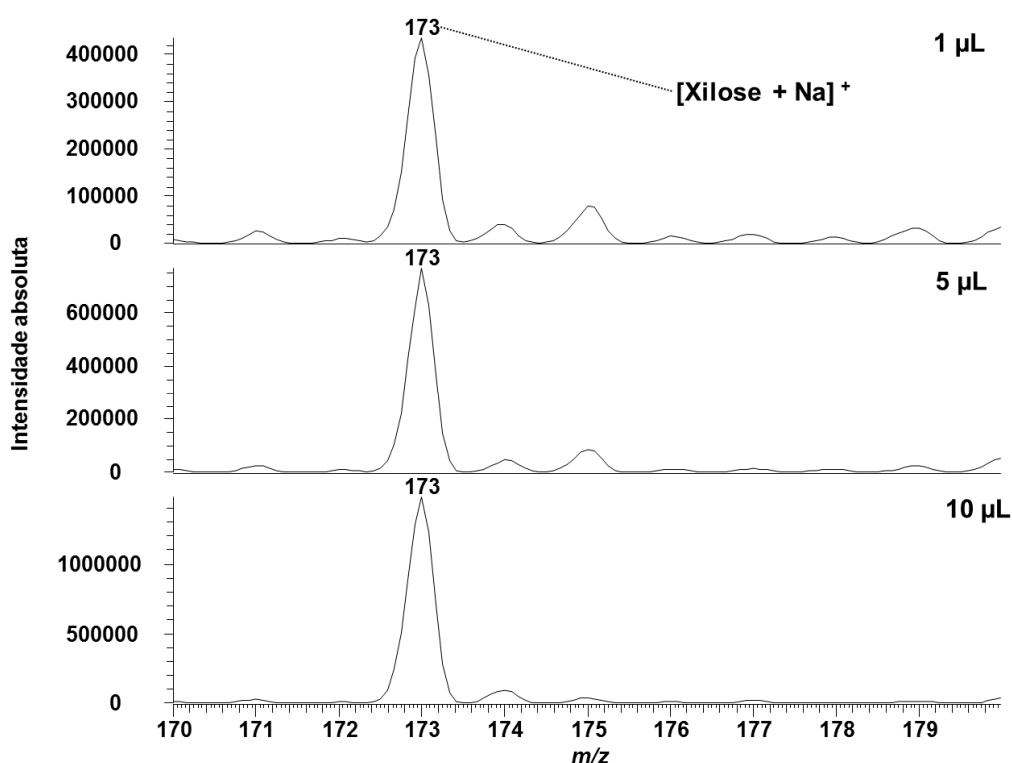


Figura 24: Espectros de PS(+)-MS dos padrões de açúcares, xilose nos volumes de aplicação 1 µL, 5 µL e 10 µL

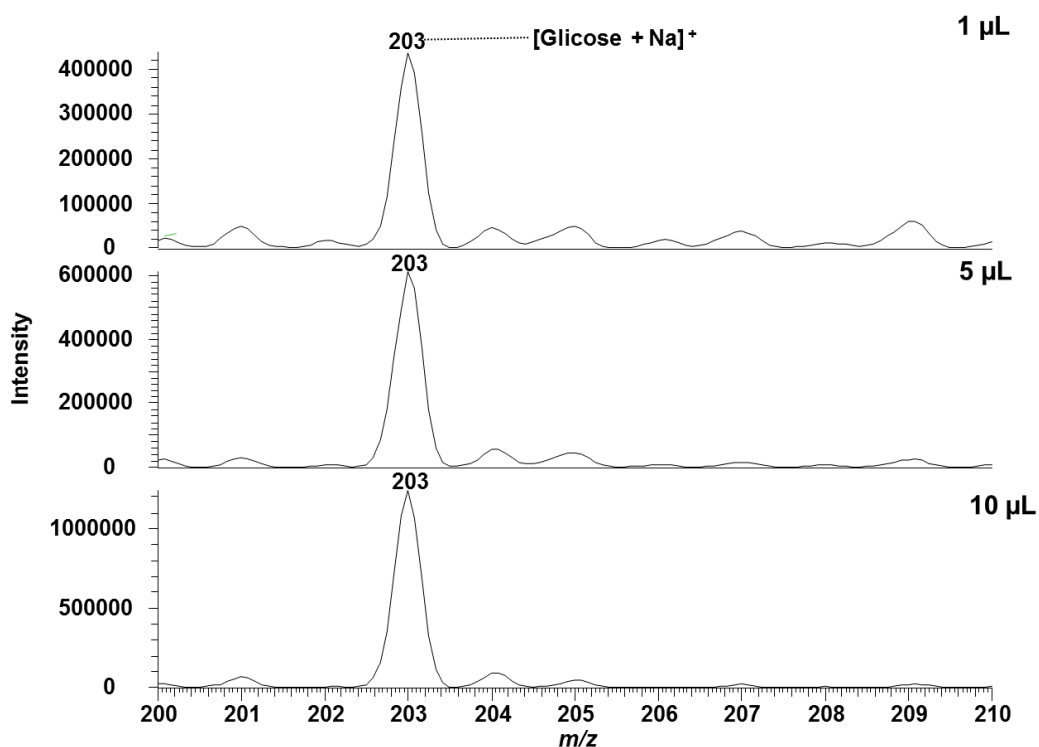


Figura 25: Espectros de PS(+)-MS dos padrões de açúcares, xilose nos volumes de aplicação 1 µL, 5 µL e 10 µL

4.3- Repetibilidade e reprodutibilidade da técnica de PS-MS

A repetibilidade é a avaliação da precisão da técnica, ou seja, a mesma resposta analítica deve ser obtida para análises no mesmo dia. A reprodutibilidade é a avaliação da exatidão da técnica, ou seja, a mesma resposta analítica deve ser obtida para análises em diferentes dias.

Na literatura, estudos quantitativos, são realizados monitorando a razão de dois sinais do espectro. Ao monitorar apenas um sinal, flutuações inerentes do processo de ionização são compensadas (SU, WANG, *et al.*, 2013). Com base nisto, estabeleceu-se a razão glicose/xilose (m/z 203/173) para avaliar a repetitividade e reprodutibilidade do método.

Para realizar esse estudo foi feito a análise de variância, ou ANOVA. Neste teste se avalia se a alteração de um fator controlado leva a

diferença significativa entre os valores médios obtidos, neste caso o tempo, em dia (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2012).

A Tabela 5 mostra os valores das razões da glicose/xilose na solução de 5,55 mmol/L de cada padrão de açúcar por cada dia de análise. Na Tabela 6, estão descritos os testes de ANOVA realizado por Excel. Nota-se que as variâncias dos resultados nos seis dias são bem pequenas, o que demonstra uma insignificante variação do resultado entre amostras realizadas no mesmo dia. Portanto, a técnica tem repetibilidade.

Para a reprodutibilidade, é usado a parte ANOVA da Tabela 6, nesta análise verifica-se a variância entre os dias de análise (Entre os grupos) e a variância entre os dados de cada dia de análise (Dentro de grupos), depois compara-se estas duas variâncias. Quanto maior for a variância “entre os grupos” em relação à variância “dentro os grupos”, maior é a dispersão ocasionando uma análise com menor significância. Isto é observado na tabela comparando os valores de F-calculado (5,38) com F-crítico (0,241). Observe que o valor F-calculado é maior do que o valor de F-crítico, portanto os resultados dessa análise são significativos, indicando uma boa reprodutibilidade.

Devido seu valor- P pode-se dizer que esses resultados obtidos de reprodutibilidade e repetibilidade tem 95% de confiança. Ou seja, tem-se 95% de chance de um valor encontrado em qualquer análise realizada por esse método e nessa concentração esteja entre os valores tabelados.

Tabela 5: Razão das intensidades absolutas dos picos de glicose/xilose na concentração de 5,55 mmol/L por dia analisado.

Dia Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
17	0,91	1,00	1,09	0,92	1,08	1,17	1,06	1,88	1,49
18	1,37	1,50	1,92	1,49	1,71	1,31	1,92	1,08	1,27
21	0,73	1,41	1,00	0,95	1,66	1,23	1,07	1,22	1,51
24	1,37	1,15	1,79	1,31	1,38	1,49	1,51	1,52	1,35
25	1,00	1,00	1,02	1,22	1,11	1,08	0,81	0,69	1,03
29	1,18	1,22	1,06	1,55	1,27	1,03	0,86	0,84	1,14

Tabela 6: Teste ANOVA das razões de glicose pela xilose na concentração de 1 mg/mL em diferentes dias.

Anova: fator único						
RESUMO						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
17	9	10,61	1,18	0,10		
18	9	13,56	1,51	0,08		
21	9	10,79	1,20	0,09		
24	9	12,87	1,43	0,03		
25	9	8,96	1,00	0,02		
29	9	10,15	1,13	0,05		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F-calculado	valor-P	F-crítico
Entre grupos	1,66	5,00	0,33	5,38	0,0005	2,41
Dentro dos grupos	2,97	48,00	0,06			
Total	4,63	53,00				

4.4- Aplicação da metodologia na caracterização de licores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Após, toda a otimização dos parâmetros de PS, as melhores condições encontradas neste trabalho para análise de açúcares e inibidores do processo de produção de etanol 2G por PS estão ilustradas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições operacionais do PS-MS.

Condições operacionais otimizados	
Distância do papel	1-5 mm
Aplicação	Aplicação a seco
Papel	Grade 1
Ângulo	60°
Modificação do papel	Parafinado
Volume	10 µL

Estas condições foram utilizadas para a análise de em amostras de licores de bagaço de cana-de-açúcar obtidos de acordo com o planejamento realizado por pesquisadores da Embrapa Agroenergia (Tabela 8). O pré-tratamento e hidrólise podem gerar produtos de degradação (furfural e hidroximetilfurfural), que são inibidores da fermentação. A melhor condição é aquela em que não se forma inibidores (CHRISTOFOLETTI, 2010) e tem a liberação da celulose para etapas posteriores.

Tabela 8: Planejamento do pré-tratamento e da hidrólise da cana-de-açúcar para produção de etanol 2G.

Experimento	[H₂SO₄]		Tempo de Hidrólise	
	(%)	Nível	(min)	Nível
1	0,5	-1	20	-1
2	2,5	+1	20	-1
3	0,5	-1	50	+1
4	2,5	+1	50	+1
5	1,5	0	35	0
6	1,5	0	35	0
7	1,5	0	35	0
8	0,1	-α	35	0
9	2,9	+α	35	0
10	1,5	0	14	-a
11	1,5	0	56	+a

Os espectros de PS-MS dos licores analisados demonstraram um perfil químico similar. A Figura 26 ilustra quatro dos onze espectros de massas obtidos nas análises por PS(+)-MS. Foram identificados açúcares como glicerol, $[M+H]^+$ de m/z 115, xilose, $[M+Na]^+$ de m/z 173, glicose, $[M+Na]^+$ de m/z 203, e produtos de degradação como o furfural, $[M+H]^+$ de m/z 97, e o HMF, $[M+H]^+$ de m/z 127 e $[M+Na]^+$ de m/z 149.

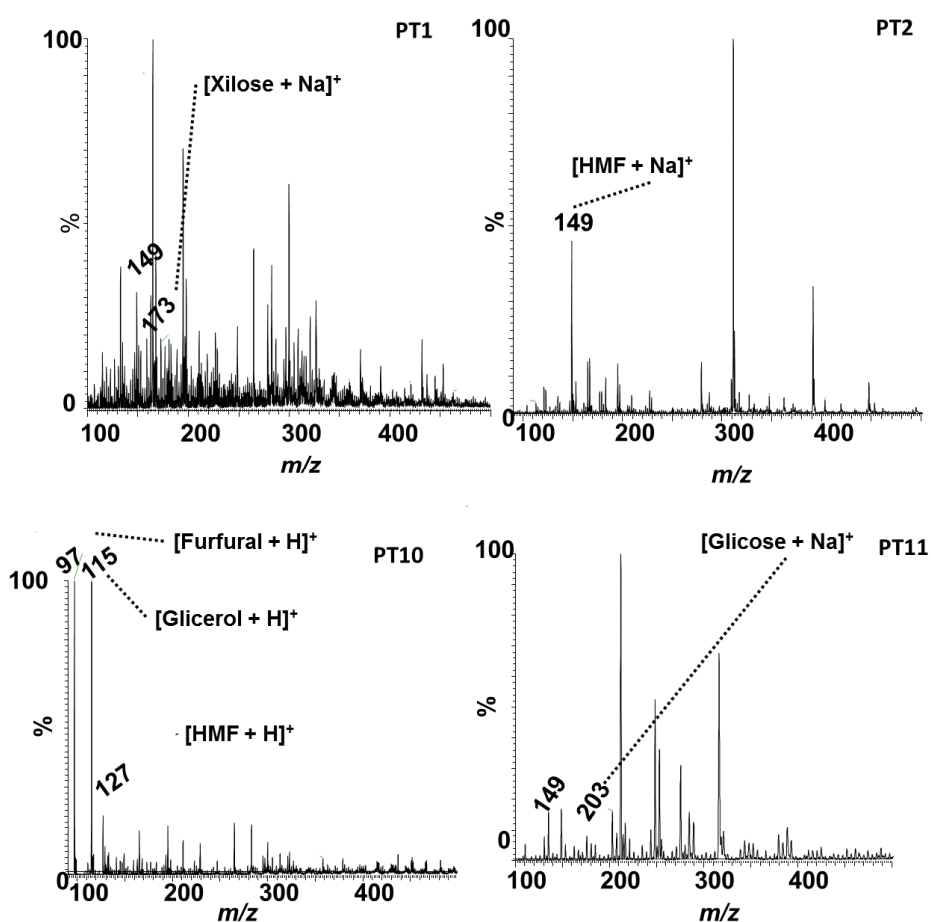


Figura 26: Espectros de PS (+)-MS das amostras selecionadas dos licores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar nas condições PT1, PT2, PT10 e PT11

A Tabela 9 representa os compostos identificados em todas as amostras de licores analisadas por PS(+)-MS. A partir destes dados, notou-se a detecção do inibidor HMF em todas as amostras e a detecção de glicerol na maioria das amostras analisadas (exceto PT3). Também observou-se que para as condições em que se empregaram concentrações elevadas de ácido sulfúrico e um tempo maior de hidrólise, PT2, PT4, PT5, PT6, PT7, PT9, PT10 E PT11, a formação dos dois inibidores: furfural e HMF. Já nas demais, identificou-se apenas o HMF. Portanto, essas condições mostraram-se mais drásticas proporcionando uma degradação mais acentuada.

Tabela 9: Compostos identificados por PS(+)-MS nas amostras de licores analisadas.												
Formula molecular	Composto	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	PT8	PT9	PT10	PT11
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose Manose Galactose	X		X	X	X	X		X			X
C ₅ H ₁₀ O ₅	Xilose Arabinose	X				X			X			
C ₃ H ₈ O ₃	Glicerol	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
C ₅ H ₁₂ O ₅	Xilitol					X	X	X				X
C ₅ H ₄ O ₂	Furfural		X		X	X	X	X		X	X	X
C ₆ H ₆ O ₃	Hidroximetilfurfural	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

A Figura 27 ilustra os espectros de massas por PS (-)-MS de quatro amostras de licores. Uma elevada intensidade no sinal dos íons referentes a *cluster* de sulfatos é observada. A detecção destes *clusters* deve-se ao fato do pré-tratamento fazer uso de ácido sulfúrico. A formação de *clusters* de sulfato é um inconveniente para a análise dos açúcares e inibidores, pois suprime a ionização destes compostos. No entanto, foi possível a detecção de glicose, $[M-H]^-$ m/z 179. A Tabela 10 representa todos os compostos identificados por PS(-)-MS para todos os licores analisados. Observa nessa tabela, que além da glicose, também foi identificado a xilose, $[M-H]^-$ m/z 149, e o inibidor da fermentação, HMF, $[M-H]^-$ m/z 125.

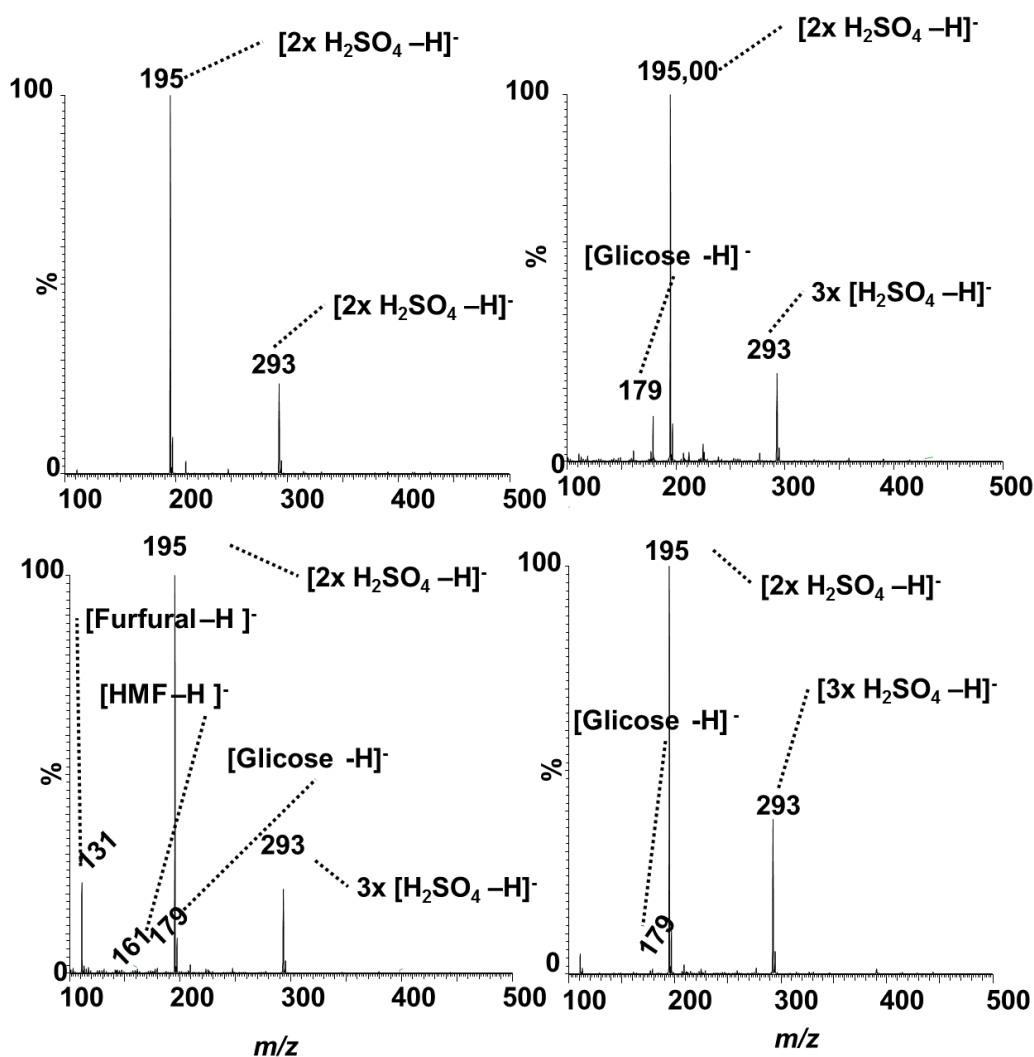


Figura 27: Espectros de PS (-) das amostras selecionadas dos licores do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar nas condições PT1, PT2, PT10 e PT11

Tabela 10: Compostos identificados por PS(-) -MS nas amostras de licores analisadas												
Formula molecular	Composto	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	PT8	PT9	PT10	PT11
$C_6H_{12}O_6$	Glicose Manose Galactose	X	X	X				X	X	X		
$C_5H_{10}O_5$	Xilose Arabinose	X	X					X	X		X	X
$C_5H_4O_2$	Furfural											
$C_6H_6O_3$	Hidroximetilfurfural	X			X	X	X		X			
$[2x H_2SO_4 -H]^-$	Dímero de ácido sulfúrico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
$[3x H_2SO_4 -H]^-$	Trímero de ácido sulfúrico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Com base nestes resultados foi possível concluir que o modo de ionização positivo demonstrou ser o melhor para o acompanhamento do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, por não apresentar supressão de sinais devido a formação dos *clusters* de sulfato.

Os sinais referentes as hexoses foram detectados em baixas intensidades, e em alguns casos inclusive ausentes, nos licores analisados, uma vez que no processo de pré-tratamento em geral não há quebra da celulose. A maior parte das hexoses que foram detectados nos licores de pré-tratamento serão provenientes da quebra de hemicelulose e da camada superficial da celulose.

Entretanto, todas as condições de pré-tratamento analisadas mostraram-se ineficientes, uma vez que os açúcares livres foram formados em baixa quantidade, principalmente as pentoses provenientes da hemicelulose, e houve a formação de inibidores do processo.

4.5- Aplicação da metodologia na caracterização de licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Assim como na caracterização de licores do pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar as melhores condições da otimização do método (Tabela 8) foram aplicadas na caracterização de licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

A hidrólise enzimática é a etapa que tem a quebra da celulose em glicose. Nesta etapa como na anterior também pode haver a formação de inibidores da *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, a melhor condição dessa etapa é aquela que fornece maior quantidade de açúcares livres, principalmente a glicose e a celobiose provenientes da quebra da celulose, e não há a formação de inibidores da fermentação como o hidroximetilfurfural e o furfural. O mecanismo dessa etapa está descrito a seguir (Figura 28) (PETTERSON, GHOSE e GHOSH, 1978).

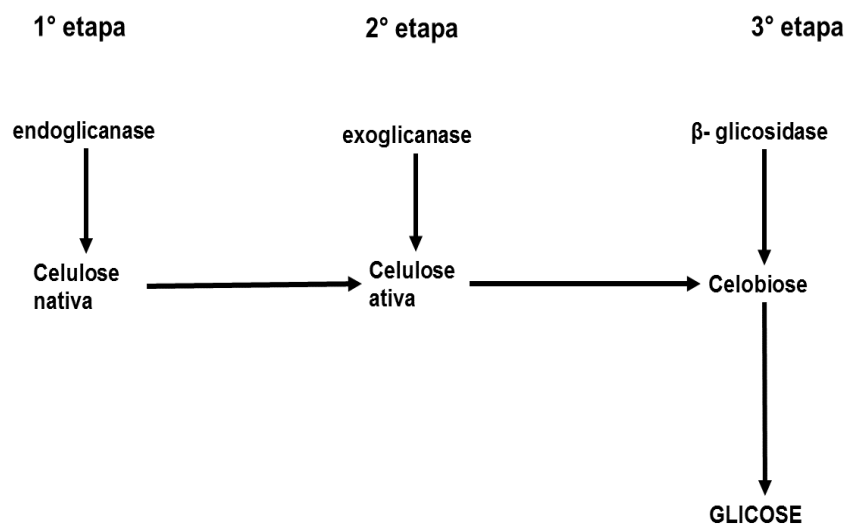


Figura 28: Esquema sugerido por Petterson *et al.* da hidrólise enzimática da biomassa.

Foram analisados licores obtidos, primeiramente, com o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando ácido sulfúrico 1,5% (v/v) em 56 minutos. Então, realizou-se a hidrólise enzimática em diferentes tempos de ação do complexo enzimático na biomassa (1, 2, 6 e 8 horas).

A figura 29 mostra os espectros de PS(+) -MS dos licores provenientes da hidrólise enzimática em 1, 2 6 e 8 horas. Neles foram identificados açúcares como xilose, $[M+Na]^+$ de m/z 173, glicose, $[M+Na]^+$ de m/z 203, e, o inibidor da fermentação, HMF, $[M+Na]^+$ de m/z 149.

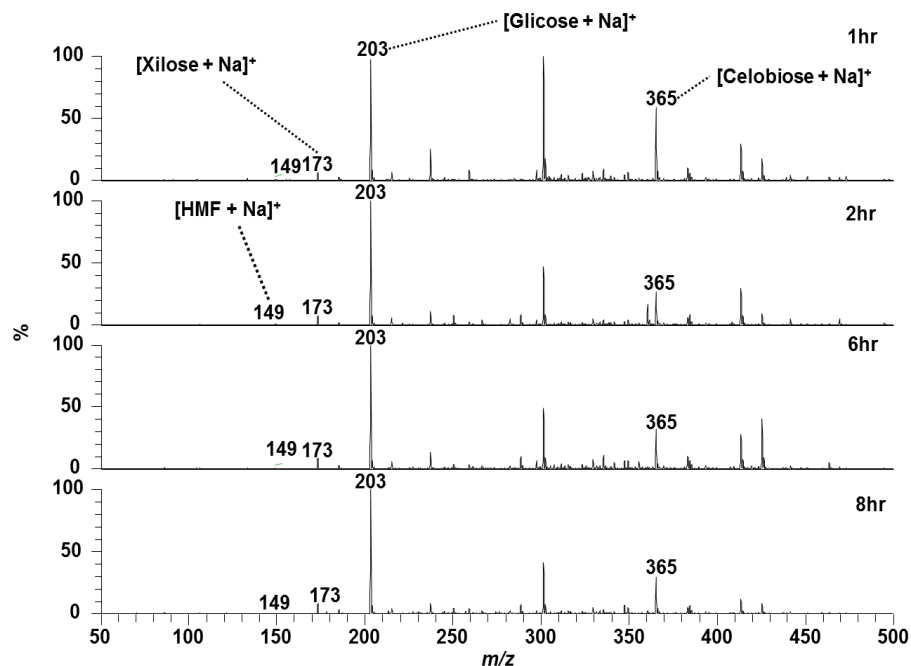


Figura 29: Espectros de PS (+)-MS dos licores da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em 1, 2, 6 e 8 horas de hidrólise.

A Tabela 11 mostra todos os compostos identificados para todas as amostras de licores. Nota-se a detecção dos açúcares, glicose, xilose e celobiose, em todas as condições, assim como, o inibidor HMF. Embora, como se observa na Figura 29, a presença do inibidor é de baixa intensidade relativa.

Tabela 11: Compostos identificados por PS(+) –MS nas amostras de licores da hidrólise enzimático.

Fórmula molecular	Composto	1hr	2hr	6hr	8hr
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Celobiose	X	X	X	X
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glicose Manose Galactose	X	X	X	X
C ₅ H ₁₀ O ₅	Xilose Arabinose	X	X	X	X
C ₆ H ₆ O ₃	HMF	X	X	X	X

Em todas as condições, a glicose foi detectada em elevada intensidade. É a glicose que posteriormente será usada para a produção do etanol. Porém, qualitativamente, todas as condições usadas são propícias para a produção do etanol 2G. No entanto, para auxiliar na otimização do processo é necessário obter informação quantitativa.

4.6- Elucidação estrutural dos compostos obtidos na caracterização dos licores de pré-tratamento e de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Para confirmar a detecção dos compostos citados nas Tabelas 10, 11 e 12 dos licores de pré-tratamento e de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado o experimento de espectrometria de massas tandem. Esta análise permite o estudo dos fragmentos de um composto após a sua colisão com átomos de um gás presente na cela de colisão do espectrômetro de massas, neste caso, o hélio.

A Figura 30 ilustra o espectro de PS(+)-MS/MS do íon de *m/z* 203, referente ao aduto de sódio da glicose. Segundo March e Stadey a

fragmentação da glicose ocorre por dois caminhos, um pela fragmentação da forma cíclica e outro pela fragmentação da forma alifática. A primeira tem a perda consecutiva de duas moléculas de água, gerando os fragmentos de íons de m/z 185 e 167. Pela forma alifática, tem-se a fragmentação devido a perda de uma molécula CH_2O , gerando o íon de m/z 173. Já a perda de 2 moléculas de CH_2O leva ao o íon de m/z 143 ,perda de 3 moléculas de CH_2O obtém-se o íon de m/z 113, a perda de uma molécula CO e uma água forma o íon de m/z 157 (MARCH e STADEY, 2005). Note que o espectro de PS(+)-MS/MS do íon m/z 203 possui todos os fragmentos citados por March e Stadey, o que nos possibilita afirmar que o íon de m/z 203 é referente ao aduto de sódio da glicose.

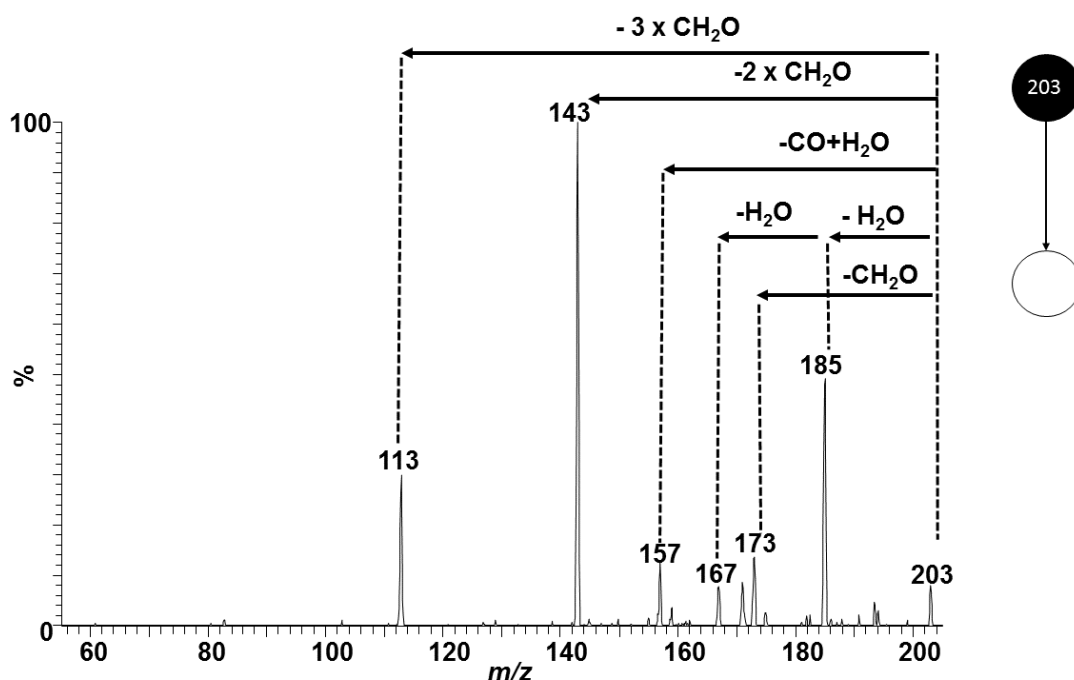


Figura 30: Espectro de PS(+) MS/MS do m/z 203 referente a “glicose sodiada”.

A Figura 31 ilustra o espectro de PS(+)-MS/MS do íon de m/z 173, referente ao aduto de sódio da xilose. Segundo March e Stadey a fragmentação da xilose também ocorre por dois caminhos, um pela fragmentação da forma cíclica e outro pela fragmentação da forma alifática. A primeira tem a perda consecutiva de duas moléculas de água,

gerando os fragmentos de íons de m/z 155 e 137. Pela forma alifática, tem-se a fragmentação devido a perda de uma molécula CH_2O , gerando o íon de m/z 143. Já a perda de 2 moléculas de CH_2O leva ao o íon de m/z 113 e a perda de 3 moléculas de CH_2O obtém-se o íon de m/z 83 (MARCH e STADEY, 2005). Note que o espectro de PS(+)-MS/MS do íon m/z 173 possui todos os fragmentos citados por March e Stadey, o que nos possibilita afirmar que o íon de m/z 173 é o íon da xilose sodiada.

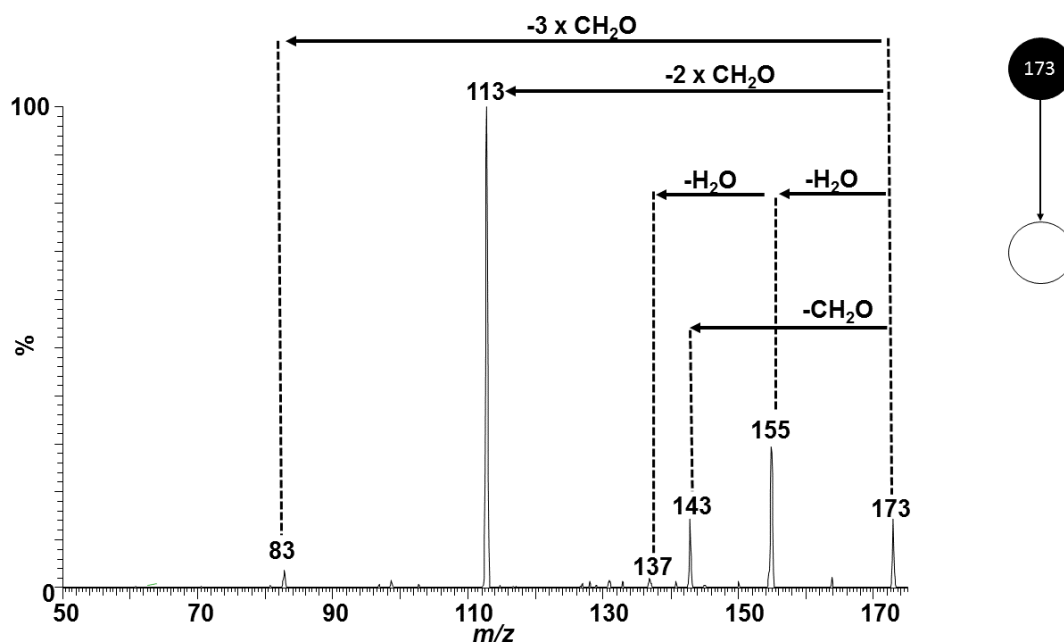


Figura 31: Espectro de PS(+) MS/MS do m/z 173 referente a “xilose sodiada”.

A Figura 32 ilustra o espectro de PS(+)-MS/MS do íon de m/z 127, referente ao íon protonado do hidroximetilfurfural. Segundo Lee *et al.* e Bignardi *et al.* a fragmentação do HMF ocorre pela perda de uma molécula de água, gerando o íon m/z 109. Note que o espectro de PS(+)-MS/MS do íon m/z 127 tem estes fragmentos citados por Lee *et al.* e Bignardi *et al.* o que nos possibilita afirmar que o íon de m/z 127 é o íon do hidroximetilfurfural protonado (LEE, SAKAI, *et al.*, 2014) (BIGNARDI, CAVAZZA e CORRADINI, 2014).

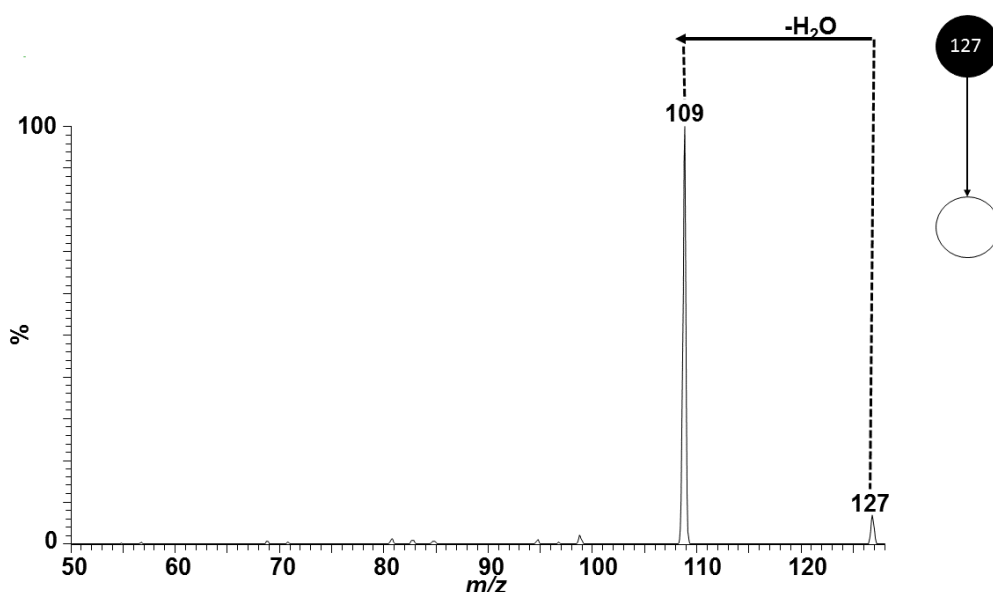


Figura 32: Espectro de PS (+) MS/MS do m/z 127 referente ao “HMF protonado”.

4.7- Quantificação de Glicose em licores de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Após o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na melhor condição (ácido sulfúrico 1,5% (v/v) e tempo de hidrólise ácida de 56 minutos), é necessário realizar um planejamento experimental com as diferentes variáveis da hidrólise enzimática. Uma delas é o tempo que o complexo enzimático irá reagir no licor obtido pelo pré-tratamento. Como visto no subcapítulo anterior, uma análise qualitativa de licores com diferentes tempos de hidrólise pode não ser a forma mais viável de obter os melhores parâmetros experimentais que se deve usar para prover o melhor licor que será usado na fermentação. Portanto, para essa análise é preciso realizar a quantificação dos açúcares, principalmente a glicose pois é ela que será convertida em etanol pela levedura, e dos inibidores da fermentação, porque uma pequena quantidade pode inibir muito a levedura.

Neste trabalho foi realizado apenas a quantificação da glicose, pois é necessário o uso do padrão deuterado com objetivo de ter a razão padrão/padrão-D necessária para obtenção da curva de calibração e,

dentre os principais produtos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática, apenas a glicose possui um padrão deuterado comercial. Para isso foi feito uma curva de calibração nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, e 500 mmol/L de glicose com adição de 50 mmol/L de glicose deuterada. Essas concentrações foram escolhidas, pois em uma análise dos mesmos licores por CLAE foram encontradas concentrações entre 86 e 160 mmol/L. A Figura 33 mostra as curvas de calibração da glicose com o papel parafinado, o papel sem modificação e o papel arredondado, as respectivas equações das retas que serão usadas para calcular as concentrações da glicose nos licores, e os coeficientes de correlação das retas.

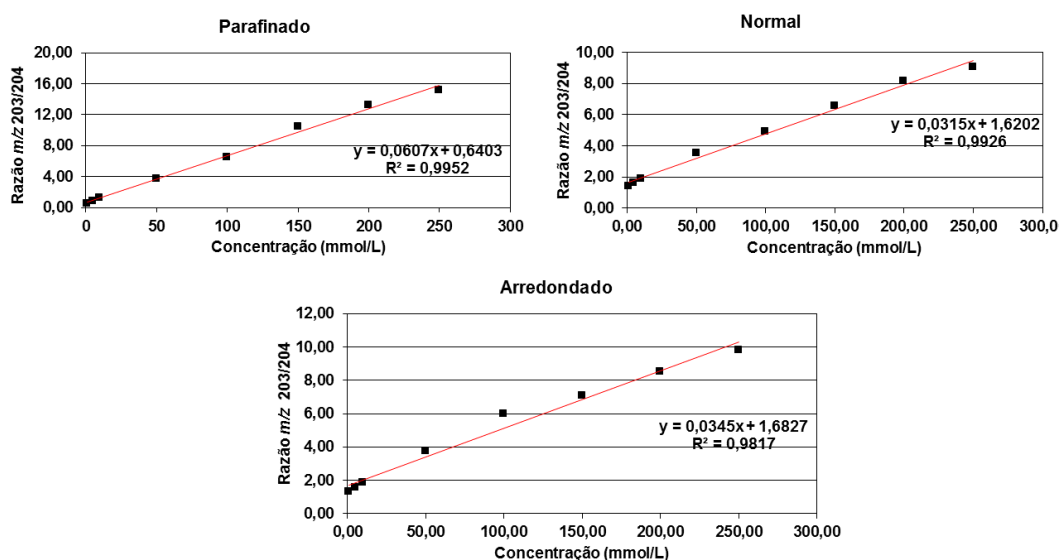


Figura 33: Curvas de calibração da razão da glicose pela glicose deuterada obtida por PS (+) -MS em diferentes concentrações e com papel com canal de parafina, com papel sem modificação e papel com pontas arredondadas.

As curvas mostraram-se com ótima linearidade, o que torna mais confiável a obtenção das concentrações de glicose. Quando se compara os três tipos de papel tem-se o papel parafinado com melhor linearidade ($R^2 = 0,9952$), seguido pelo papel sem modificações ($R^2 = 0,9926$) e o com pontas arredondadas ($R^2 = 0,9817$). Esse comparativo propõe que o papel com canal de parafina é o melhor para uma análise quantitativa. Esse

modelo de papel também foi o melhor para determinar a sensibilidade da técnica, porque quanto maior o valor do coeficiente angular maior é a sensibilidade e foram obtidos os valores de coeficiente angular de 0,0607 para o papel com barreira de parafina, 0,0315 para o papel sem modificações e 0,0345 para o papel com pontas arredondadas. Confirmando este tipo de papel como o melhor.

As Figura 34, 35 e 36 ilustram os espectros de PS(+)-MS das diferentes concentrações de glicose usadas para a obtenção da curva de calibração. Observa-se que o valor da intensidade absoluta do pico da glicose (m/z 203) vai aumentando enquanto da glicose deuterada (m/z 204) diminui, contudo, ao se calcular a razão glicose por glicose deuterada (gli/gli-D1) ela vai aumentando linearmente com o aumento da concentração.

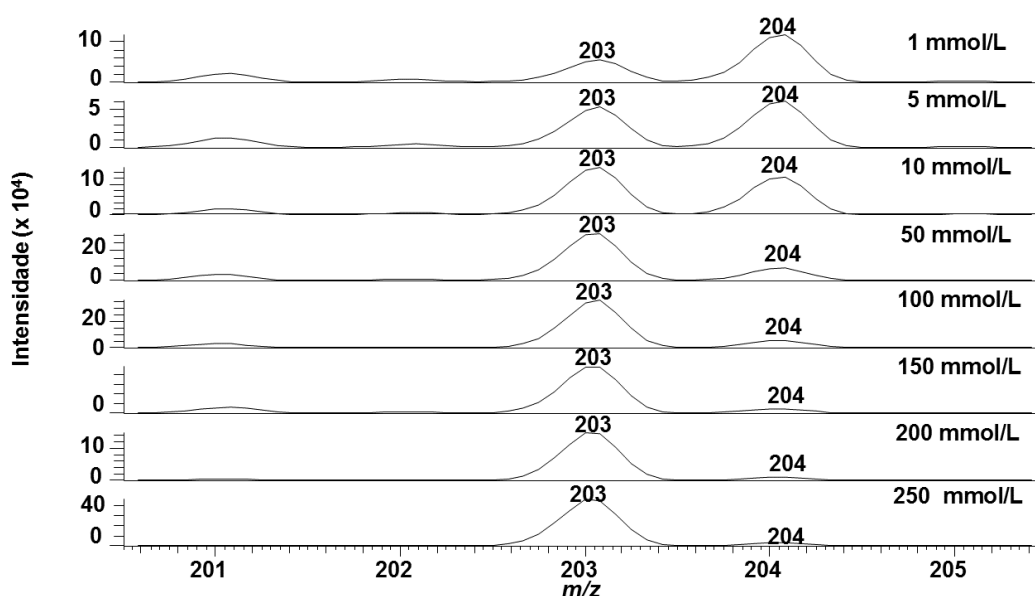


Figura 34: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel com canal de parafina.

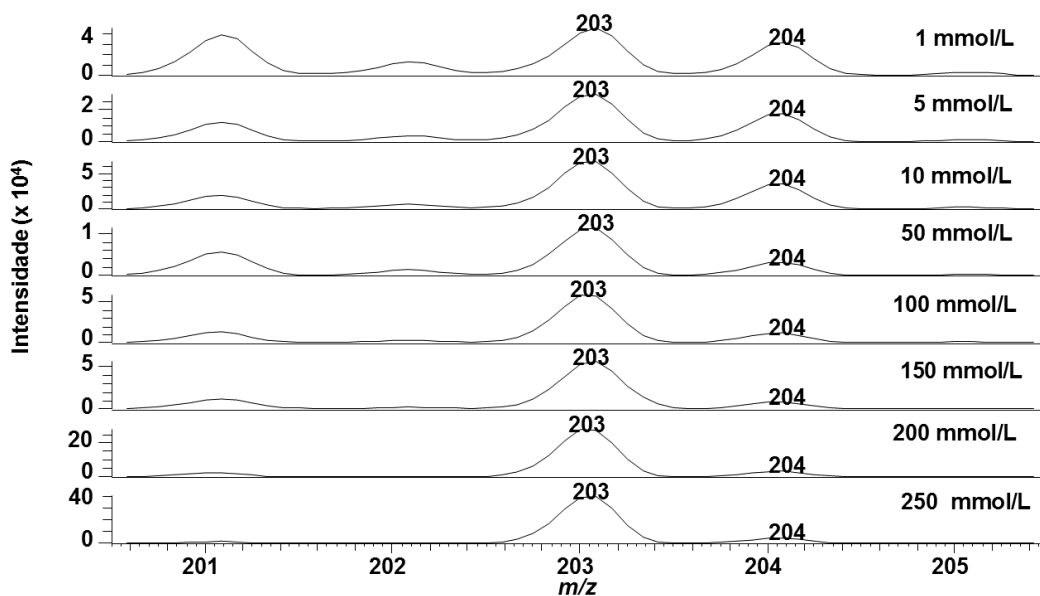


Figura 35: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel sem modificação

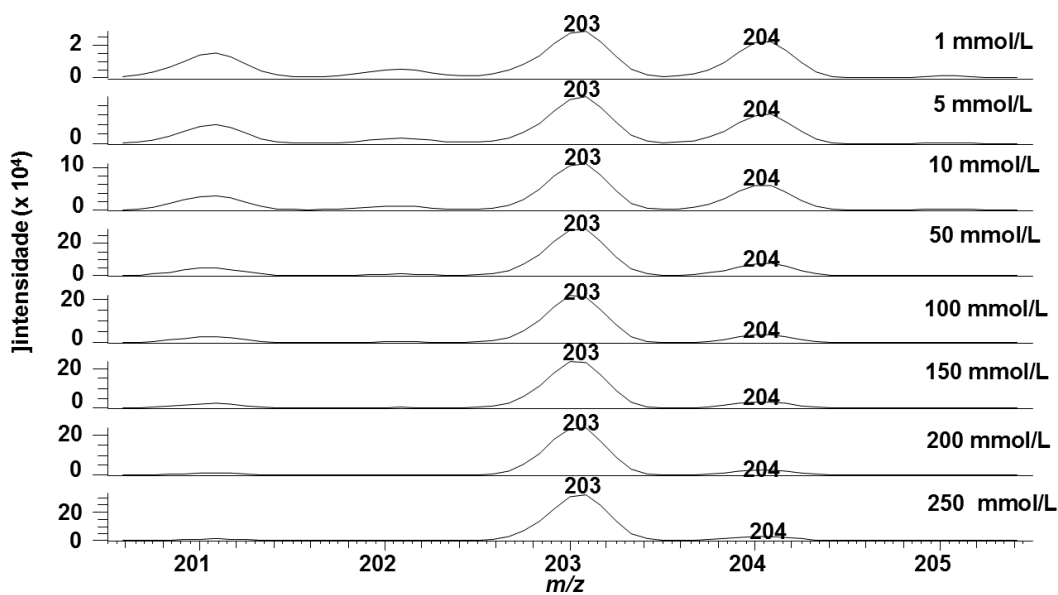


Figura 36: Espectros de PS (+)-MS provenientes de soluções de padrões de diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mmol/L) e glicose deuterada com 50 mmol/L usando o papel com pontas arredondadas.

Na Tabela 12 tem-se as razões gli/gli-D1 de cada triplicata realizada por amostra e por tipo de papel usado, suas concentrações e a concentração média de cada tempo de hidrólise. Também é apresentado o valor de concentração obtido por HPLC para cada amostra e por tipo de papel usado na análise e o desvio padrão entre as duas técnicas por tipo de papel. Observa-se que o aumento do tempo de hidrólise aumenta a concentração de glicose. Portanto, a melhor condição analisada foi a da ação do complexo enzimático por 8 horas, tornando a concentração de glicose seja a maior proporcionando um melhor rendimento

Outro ponto estudado na Tabela 12 é a diferença de resposta obtido da quantificação pelo tipo de papel usado (parafinado, sem modificação e com pontas arredondadas). Os resultados obtidos afirmam que o melhor papel a ser usado para o estudo quantitativo é o com canal de parafina, pois é o que apresenta valores mais próximos dos encontrados por HPLC. Isso é observado pelos valores de diferença entre os resultados obtidos pelo papel e os obtidos por CLAE serem menores no papel com canal de parafina do que nos demais. Uma possível explicação deste fato é o estudo feito anteriormente sobre a estabilidade do sinal em relação aos três tipos de papéis.

Tabela 12: Concentração encontrada de amostras reais de licores de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar por PS(+)-MS com diferentes papeis e a comparação com o encontrado por HPLC .

Tempo de hidrólise enzimática (hora)	Média das concentrações no papel parafinado (mmol/L)	Média das concentrações o papel sem modificação (mmol/L)	Média das concentrações no papel com pontas arredondadas (mmol/L)	Concentração obtida por CLAE (mmol/L)	Diferença entre Parafinado e CLAE	Diferença entre Sem modificação e CLAE	Diferença entre Arredondado e CLAE
1	86,16	135,54	90,18	86,08	0,08	49,26	4,10
2	97,76	153,98	132,24	97,80	0,04	56,18	34,41
6	136,50	194,18	147,60	136,51	0,01	57,67	11,09
8	160,17	201,64	159,75	160,00	0,17	41,64	0,29

Os resultados de PS-MS indicam que pode-se realizar novos experimentos, com tempos maiores de hidrólise para verificar a ocorrência de aumento da concentração da glicose no licor de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, de forma a alcançar rendimentos ainda maiores.

4.7.1- Limite de detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) de um método é a concentração mínima que o analito de interesse pode ser detectado, porém, esse limite pode não ser quantificado. E o limite de quantificação (LQ) de um método é a concentração mínima que o analito de interesse pode ser quantificado, com exatidão e precisão (LONG e WINEFORDNE, 1983).

Pode-se determinar o valor do LD e LQ utilizando a equação a baixo:

$$LD \text{ ou } LQ = \frac{k \times s_B}{C} \quad (1)$$

Onde k é número fatorial escolhido de acordo com o grau de confiança desejável (geralmente aceita-se 3 para LD e 10 para LQ), C é o valor do coeficiente angular da equação encontrada na curva de calibração (Para o parafinado 0,0607, para o papel sem modificação 0,0315, e para o papel com pontas arredondadas 0,0345) e s_B é o desvio padrão da média de análises do branco. O desvio padrão foi calculado de acordo com a Eq.2 (LONG e WINEFORDNE, 1983):

$$s_B = \frac{s_b}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

Para a realização dos cálculos do LD e do LQ, foram feitas 10 análises do branco (papel e ácido fórmico em metanol 0,1% (v/v)) com cada tipo de papel (com canal de parafina, com pontas arredondadas e sem modificações). Os valores da razão 203/204 provenientes do espectro de PS(+)-MS do branco para os diferentes tipos de papeis foram tabelados abaixo. Na mesma tabela, encontram-se os valores das concentrações obtidas com as equações das retas de cada tipo de papel, desvio padrão dos resultados obtidos, o desvio padrão da média das análises e os valores de LD e LQ calculados.

Tabela 13: Valores da razão 203/204 das análises em branco por PS(+)-MS para cada, suas concentrações encontradas pelas equações da reta, os desvios padrões das concentrações, o desvio padrão da média das análises e os valores de LD e LQ para cara tipo de papel analisado.

Medidas	Parafinado		Sem modificação		Pontas arredondadas	
	0,91	4,44	1,06	2,14	1,96	8,04
1	0,91	4,44	1,10	3,41	1,96	8,04
2	0,91	4,44	1,04	1,50	1,97	8,33
3	0,91	4,44	1,03	1,19	1,99	8,91
4	0,94	4,94	1,08	2,77	1,98	8,62
5	0,93	4,77	1,06	2,14	1,96	8,04
6	0,91	4,44	1,04	1,5	2,00	9,20
7	0,91	4,44	1,05	1,82	1,99	8,91
8	0,91	4,44	1,06	2,14	1,96	8,04
9	0,92	4,61	1,08	2,77	1,98	8,62
10	0,91	4,44	1,06	2,14	1,96	8,04
	Desvio padrão	0,18	Desvio padrão	0,69	Desvio padrão	0,44
	SB	0,06	SB	0,22	SB	0,14
	LQ	9,27 mmol/L	LQ	68,85 mmol/L	LQ	40,10 mmol/L
	LD	2,77 mmol/L	LD	20,65 mmol/L	LD	12,03 mmol/L

Observando os valores de LD dos três tipos de papel, tem-se que o papel parafinado tem o valor de 2,77 mmol/L, o sem modificação 20,65 mmol/L e o com pontas arredondadas 12,03 mmol/L. Com esses valores conclui-se que o papel parafinado é o que apresenta mais sensibilidade ao método, uma vez que, com seu uso, é possível a detecção de concentrações mais baixas do analito. Isso é confirmado com os valores de quantificação para cada tipo de papel. O LQ é mais rigoroso por só quantificar valores que são, no mínimo, 10 vezes maiores do que o ruído. O fato do papel parafinado conseguir quantificar concentrações até 10 vezes mais baixas do que os outros papeis, mostra que o método utilizando esse papel é mais sensível.

Conclusões

5- Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho contribuíram para a obtenção de um novo método de análise direta de açúcares e inibidores (furfural e hidrometilfurfural) em licores provenientes dos processos de pré-tratamento químico e hidrólise enzimática de bagaço-de-cana de açúcar.

Os parâmetros analíticos da fonte PS foram otimizados e estão descritos a seguir. A distância entre o papel e o *MS Inlet* deve estar entre 1 e 5mm. O papel Whatman Grade 1 apresentou os melhores resultados por ter melhores intensidades e melhor relação sinal/ruído e, portanto, a melhor opção para estas análises. O método de aplicação que originou os melhores resultados foi o *dry spot*. O melhor ângulo da ponta afiada foi o de 60°, por apresentar as melhores intensidades do sinal. Com a aplicação de uma barreira de parafina, os espectros foram obtidos com maiores intensidades absolutas e menor razão sinal/ruído. A aplicação de 10 µL de amostra no papel parafinado é ideal para as análises, sendo que em quantidades maiores, a amostra ultrapassa a zona delimitada pela barreira de parafina; e em quantidades menores há uma redução na intensidade absoluta dos sinais.

A aplicação do protótipo do PS na determinação de açúcares e inibidores em licores de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados e hidrolisados mostrou-se eficiente e rápida, o que abre a perspectiva de utilizar este método no acompanhamento de processos de produção de etanol 2G. As vantagens do PS-MS em relação aos métodos tradicionais utilizados, como CLAE, são o tempo de análise (cerca de 40 segundos), o baixo consumo de solvente (cerca de 30 µL por amostra em análise *full scan* e *MSⁿ*), e o baixo custo da fonte de ionização (cerca de R\$ 5,00).

Em todas as condições de pré-tratamento químico avaliadas por PS-MS, foram detectados inibidores de processo de fermentação. Portanto, é necessário realizar um novo planejamento experimental considerando as melhores condições testadas até o momento, ou seja, aquelas que apresentaram a formação de apenas um dos inibidores (PT1, PT3 e PT8).

Já as análises realizadas para as amostras resultantes das condições de hidrólise enzimática demonstraram a formação de açúcares, os quais podem então serem fermentáveis a etanol. E, qualitativamente a amostra com 8h do complexo enzimático agindo na biomassa, se mostrou a mais vantajosa por ter maior formação de glicose.

Para o estudo quantitativo, foram obtidas as curvas de calibração para os papéis parafinados, sem modificação e o arredondado, a fim de provar qual dos tipos seria melhor para tal análise. O papel com barreira de parafina mostrou-se ser melhor do que o sem modificação e o com pontas arredondadas uma vez que obteve maior linearidade e sensibilidade (parafinado: 0,9952 e 0,0607; sem modificação: 0,9526 e 0,0315; arredondado: 0,9817 e 0,0345).

Também foi realizado o estudo do limite de detecção e de quantificação para os três tipos de papel, tendo como resultado o papel parafinado como o de melhor desempenho para análises quantitativas e qualitativas. Isso foi explicado por seus valores de LD e LQ (2,77 mmol/L e 9,27 mmol/L, respectivamente) serem menores do que os do papel sem modificação (20,6 mmol/L e 68,85 mmol/L) e com pontas arredondadas (12,03 mmol/L e 40,10 mmol/L).

O estudo mostrou que o uso do PS-MS para o acompanhamento da produção de Etanol 2G é um processo rápido, eficiente e confiável tanto para uma análise qualitativa quanto para uma análise quantitativa, podendo, então, afirmar que o uso da técnica pode diminuir o tempo de otimização e produção do álcool.

Referências bibliográficas

6- Bibliografia

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R.C.; SANVIDO, G.B.; ROMÃO,W.; LALII, P.M.; BENASSI, M.; CUNHA, I.B.S.; EBERLIN, M.N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 398: 265-294, 2010.

BERGO, P. L. D. S. Desenvolvimento de um método de screening para anfetaminas em urina empregando ESI-MS com confirmação por GC-MS. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 120, 2007.

BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C. Selected product ion monitoring for quantification of 5-hydroxymethylfurfural in food products by capillary zone electrophoresis-tandem ion trap mass spectrometry. *Food Control*, 46: 41-48, 2014.

CHAIT, E. M. Ionization Sources in Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 44: 77A- 80A, 1972.

CHRISTOFOLETTI, G. B. Estudo dos efeitos de etapas de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Universidade de São Paulo. São Carlos, 143, 2010.

CODY, R. B.; DANE, A. J. Paper spray ionization for ambient inorganic analysis. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 28: 893–898, 2014.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. Biomassa para energia. Campinas: Editora da Unicamp, 2008. 464-472 .

COVEY, T. R.; THOMSON, B. A.; SCHNEIDER, B. B. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews*, 28: 870– 897, 2009.

DOUGLAS, D. J.; FRANK, A. J.; MAO, D. Linear Ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 24: 1–29, 2005.

ESPY, R. D.; MANICKE, N.E.; OUYANG, Z., COOKS, R.G. Rapid analysis of whole blood by paper spray mass spectrometry for point-of-care therapeutic drug monitoring. *Analyst*, 137: 2344–2349, 2012.

ESPY, R.D.; MANICKE, N.E.; WANG, H.; COOKS, R.G. Purdue University- Discovery Park, 2014. Disponível em: <<http://www.purdue.edu/discoverypark/caid/gallery/view.php?id=116>>.

Acesso em: 12 dez. 2014.

FENN, J. B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. *Journal of Biomolecular Techniques*, 13: 101-118, 2002.

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, 38: 1003-1018, 2003.

GARCIA, P. T.; CARDOSO, T.M.G.; GARCIA, C.D.; CARRILHO, E.; COLTRO, W.K.T. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. *RSC Advances*, 4: 37637–37644, 2014.

GARRETT, R.; REZENDE, C. M.; IFA, D. R. Coffee origin discrimination by paper spray mass spectrometry and direct coffee spray analysis. *Analytical Methods*, 5: 5944–5948, 2013.

HARRIS, G. A.; GALHENA, A. S.; FERNANDEZ, F. M. Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends. *Analytical Chemistry*, 83: 4508–4538, 2011.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

HORST, D. J. Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas. Universidade tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 160, 2013.

HORTON, G. L.; RIVERS, D. B.; EMERT, G. H. Preparation of cellulose for enzymatic conversion, 19: 422- 429, 1980.

HU, B.; LAI, Y-H.; SO, P-K.; CHEN, H.; YAO, Z-P. Direct ionization of biological tissue for mass spectrometric analysis, 137: 3613–3619, 2012.

HUANG, M. Z.; YUAN, C.H.;CHENG, S.C.; CHO, Y.T.; SHIEA, J. Ambient Ionization Mass Spectrometry. Annual Review of Analytical Chemistry, 3: 43–65, 2010.

JUNJU, F. P. M.; LI, A.; BADU-TAWIAH, A.; WEI, P.; LI, L.; OUYANG, Z.; ROQAN, I.S.; COOK, R.G. In situ analysis of corrosion inhibitors using a portable mass spectrometer with paper spray ionization. Analyst, 138: 3740- 3748, 2013.

KNAPPERT, D.; GRETHLEIN, H.; CONVERSE, A. Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering, 22: 1449- 1463, 1980.

LALLI, P. M.; SANVIDO, G.B.; GARCIA, J.S.; HADDAD, R.; COSSO, R.G.; MAIA, D.R.J.; ZACCA, J.J.; MALDANER, A.O.; EBERLIN, M.N. Fingerprinting and aging of ink by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. Analyst, 135: 745–750, 2010.

LEE, H.; CHANG, C-S.; LIU, J-T.; LIN, C-H. Rapid screening and determination of designer drugs in saliva by a nib-assisted paper spray-mass spectrometry and separation technique. Journal of Separation Science, 35: 2822–2825, 2012.

LEE, T. P.; SAKAI, R.; MANAF, N.A.; RODHI, A.M.; SADI, B. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. Food Control, 38: 142-149, 2014.

LI, A.; WANG, H.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. Paper spray ionization of polar analytes using non-polar solvents. Chemical Communications, 47: 2811–2813, 2011.

LIMA, D. A.; GOUVEIA, E. R. APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^4 NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, 14: 275-280, 2012.

LIU, G.; SNAPP, H. M.; JI, Q. C. Internal standard tracked dilution to overcome challenges in dried blood spots and robotic sample preparation for liquid chromatography/tandem mass spectrometry assays. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 1250–1256, 2011.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N.E.; LIN, J-M.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. *Analytical Chemistry*, 82: 2463–2471, 2010.

LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Enabling Quantitative Analysis in Ambient Ionization Mass Spectrometry: Internal Standard Coated Capillary Samplers. *Analytical Chemistry*, 85: 5632–5636, 2013.

LIU, W.; MAO, S.; WU, J.; LIN, J-M. Development and applications of paper-based electrospray ionization-mass spectrometry for monitoring of sequentially generated droplets. *Analyst*, 138: 2163–2170, 2013.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. Balanço de energia na produção de açúcar e álcool nas usinas cooperadas. *Copersucar Technical Bulletin*, 31: 22- 27, 1985.

MANI, S.; TABIL, L. G.; OPUKU, A. Ethanol from agricultural crop residues- An overview. *Asae/ Csa North Central Intersectional Meeting*. Canadá: [s.n.]. 2002.

MARCH, R. E.; STADEY, C. J. A tandem mass spectrometric study of saccharides at high mass resolution. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 805–812, 2005.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem Mass Spectrometry. *Science*, 214: 280-286, 1981.

MCMILLAN, J. D. Pre treatment of lignocellulosic biomass. *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. Washington: American Chemistry Society, p. 292-324.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto alegre: Bookman, 2012.

NIKOLAEV, E. N.; KOSTYUKEVICH, Y. I.; VLADIMIROV, G. N. Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) mass spectrometry: Theory and simulations. Mass Spectrometry Reviews, 1098-2787, 2014.

OLIVÉRIO, J. L.; HILST, A. G. P. DHR- Dedini Hidrólise Rápida- Revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse. XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress. Guatemala: [s.n.]. 2005.

ORADU, S. A.; COOKS, R. G. Multistep Mass Spectrometry Methodology for Direct Characterization of Polar Lipids in Green Microalgae using Paper Spray Ionization. Analytical Chemistry, 84: 10576-10585, 2013.

OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Miniature Mass Spectrometersy. Annual Review of Analytical Chemistry, 2: 187-214, 2009.

PEI, J.; KANG, Y.; HUANG, G. Reactive intermediate detection in real time via paper assisted thermal ionization mass spectrometry. Analyst, 139 : 5354–5357, 2014.

PERRY, R. H.; COOKS, R. G.; NOLL, R. J. Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion And Applications. Mass Spectrometry Reviews, 27: 661– 699, 2008.

PETTERSON, L. G.; GHOSE, T. K.; GHOSH, P. Bioconversion of cellulosic substance. Journal of Applied Chemical Biotechnology, 28: 309-320, 1978.

RIBEIRO, M. A. Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. Radiation Physics and Chemistry, 84:115–118, 2012.

ROSSEL, C. E. V.; HILST, A.G.P.; LEAL, N.R.L.V. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the orgnosolv process.

XXV International Society of Sugar Cane Technology. Guatemala: [s.n.]. 2005.

SALENTIJN, G. I.; PERMENTIER, H. P.; VERPOORTE, E. 3D-Printed Paper Spray Ionization Cartridge with Fast Wetting and Continuous Solvent Supply Features. *Analytical Chemistry*, 86: 11657–11665, 2014.

SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A Two-Dimensional Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer. *Journal of the American Society Mass Spectrometry*, 13: 659–669, 2002.

STEPHENS, C. H.; SARESTHA, B.; MORRIS, H.R.; BIER, M.E.; WHITMORE, P.M.; VERTER, A. Minimally invasive monitoring of cellulose degradation by desorption electrospray ionization and laser ablation electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 135: 2434–2444, 2010.

SU, Y.; WANG, H.; LIU, J.; WEI, P.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Quantitative paper spray mass spectrometry analysis of drugs of abuse. *Analyst*, 138: 4443–4447, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource*, 83: 1-11, 2002.

SWAIN, P. K.; DAS, L. M.; NAIK, S. N. Biomass to liquid: A prospective challenge to research and development in 21st century. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15: 4917–4933, 2011.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 10: 347–375, 1996.

TAVERNA, D.; DI DONNA, L.; MAZZOTTI, F.; POLICICCHIO, B.; SIDONA, G. High-throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 48: 544–547, 2013.

THERMO SCIENTIFIC. LTQ XL hardware manual. [S.l.]: [s.n.], 2006. 180p p.

WAGNER, M.; TONOLI, D.; VARELIO, E.; HOPFGARTNER, G. The use of Mass spectrometry to analyse dried blood spot. *Mass Spectrometry Reviews*, 1–78, 2014.

WANG, H.; TONOLI, D.; VARELIO, E.; HOPFGARTNER, G.; Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie*, 122: 889 –892, 2010.

WANG, H.; REN, Y.; MCLUKEY, M.N.; MANICKE, N.E.; PARK, J.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Direct Quantitative Analysis of Nicotine Alkaloids from Biofluid Samples using Paper Spray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85: 11540-11544, 2013.

WEICKHARDT, C.; MORITZ, F.; GROTEMEYER, J. TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY: STATE-OF-THE-ART IN CHEMICAL ANALYSIS AND MOLECULAR SCIENCE. *Mass Spectrometry Reviews*, 15: 139- 162, 1996.

WOLF, L. D. Pré-tratamento de organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 147. 2011.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J.D.; CHAPPELL, W.J.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 312: 201– 207, 2012.

ZHANG, J. I.; LI, X.; OUYANG, Z.; COOKS, R.G. Direct analysis of steviol glycosides from Stevia leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. *Analyst*, 137: 3091–3098, 2012.

ZHANG, Y.; JU, Y.; HUANG, C.; WYSOCKI, V.H. Paper Spray Ionization of Noncovalent Protein Complexes. *Analytical Chemistry*, 86: 1342-1346, 2014.

ZHANG, Y.; LI, H.; MA, Y.; LIN, J-M. Paper spray mass spectrometry-based method for analysis of droplets in a gravity-driven microfluidic chip. *Analyst*, 139: 1023–1029, 2014.

ZHANG, Z.; XU, W.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Silica Coated Paper Substrate for Paper-Spray Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. *Analytical Chemistry*, 84: 931–938, 2012.