

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA POR CROMATAGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO PARA A ANÁLISE DE CARBOIDRATOS PRESENTES NO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A. A. FERREIRA¹, E. S. P. BON¹, M. M. T. CARVALHO¹, D. S. PEREIRA¹

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Laboratório Bioetanol

E-mail para contato: aluan@ufrj.br; danielfarmacia@gmail.com

RESUMO – Os biocombustíveis apareceram como uma alternativa ao combustível derivado de reservas fósseis em resposta à preocupação crescente com as questões climáticas resultantes, em grande parte, do uso do petróleo. A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de matéria-prima para produção de etanol de segunda geração. Adicionalmente, em comparação com o uso do petróleo, os biocombustíveis tem a vantagem de serem renováveis e o seu uso tem menor impacto ambiental. A metodologia utilizada nos procedimentos analíticos para a determinação da composição química dos materiais lignocelulósicos é de extrema importância em estudos para o seu uso industrial. A técnica por CLAE usando a detecção por IR é a mais utilizada uma vez que é capaz de realizar medições rápidas, sensíveis, precisas e exatas. Para garantir a confiabilidade dessa técnica é importante que o método de análise seja validado, a fim de comprovar a garantia de qualidade e consistência dos resultados analíticos. Alguns dos parâmetros validados nesse trabalho foram a linearidade e a precisão, e ambos se mostraram satisfatórios para que a utilização do método.

1. INTRODUÇÃO

A incerteza associada ao fornecimento de petróleo e a necessidade de minimizar o impacto no meio ambiente têm aumentado o interesse em pesquisas em combustíveis alternativos como os biocombustíveis (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Os biocombustíveis surgiram como uma alternativa atraente ao combustível derivado de reservas fósseis. A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de matéria-prima para produção de biocombustíveis de segunda geração, além disso, em comparação com os combustíveis fósseis, é renovável e não agride tanto o meio ambiente (Zhang, 2008).

Geralmente, a biomassa lignocelulósica é composta por celulose (35-50%), hemicelulose (30-35%) e lignina (10-25%) (Sarkar *et al.*, 2009). O bagaço de cana-de-açúcar, na maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados para a bioconversão em etanol, já que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo custo

de colheita, transporte e armazenagem (Pandey *et al.*, 2000). Para liberar os carboidratos da biomassa lignocelulósica, uma etapa de pré-tratamento é necessária para expor a celulose que é, a seguir, hidrolisada utilizando enzimas fúngicas. Os monossacarídeos liberados são as potenciais fontes de carbono para a produção de etanol por meio de processos de fermentação (Kuhad *et al.*, 2011).

A metodologia analítica utilizada para a determinação da composição química do material lignocelulósico é de extrema importância em estudos de valorização desses materiais. Deste modo, existe a necessidade de desenvolvimento de um método de análise robusto, preciso e exato para quantificação de carboidratos em amostras de biomassa, previamente hidrolisada com ácido sulfúrico (Badger, 2002).

Os métodos cromatográficos são as técnicas analíticas mais potentes para a análise de carboidratos em xaropes de biomassa lignocelulósica (Cheng *et al.*, 2010). Cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são comumente utilizadas para separação e identificação dos carboidratos, porém eles são frequentemente quantificados por CLAE usando a detecção por índice de refração (IR) uma vez que esse método é capaz de realizar medições rápidas, sensíveis, precisas e exatas (Raessler, 2011).

Para garantir a confiabilidade do procedimento analítico por CLAE é importante que o método de análise seja validado, a fim de comprovar a garantia de qualidade e consistência dos resultados analíticos.

2. OBJETIVO

Validação da metodologia analítica para a quantificação, por CLAE-IR, de cinco carboidratos (celobiose, glicose, xilose, galactose e arabinose) presentes em xaropes oriundos da hidrólise ácida do bagaço da cana-de-açúcar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Equipamento

As análises dos carboidratos (celobiose, glicose, xilose, galactose e arabinose) foram realizadas no equipamento Ultimate 3000 (ThermoScientific®, Germany) equipado com um detector de índice de refração RI-101 (SHODEX®, Japan). O sistema de colunas utilizado é composto pelo cartucho Deashing (4.6 mm I.D. × 30 mm, BioRad, USA), pré-coluna Aminex Carbo P (4.6 mm I.D. × 30 mm, BioRad, USA) e coluna analítica Aminex HPX-87P (7.8 mm I.D. × 300 mm, BioRad, USA). O *software* utilizado foi o *Chromeleon* 6.8 (Dionex®, Canada).

3.2 Padrões de carboidratos

- D-Galactose (Merck[®], teor $\geq 99\%$).
- D-Xilose (Sigma[®], teor $\geq 99\%$).
- D-Glicose (Merck[®], teor $\geq 99\%$).
- D-Arabinose (Sigma[®], teor $\geq 99\%$).
- D(+)-Celobiose (Sigma[®], teor $\geq 99\%$).

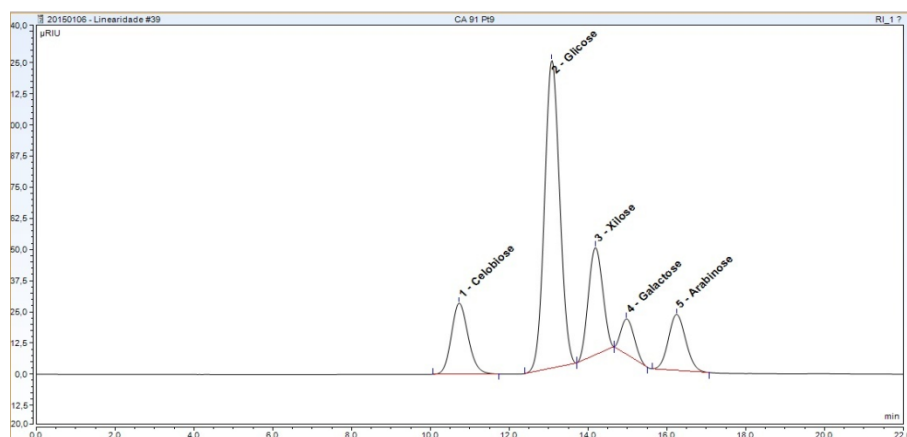
3.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel: água deionizada (grau reagente tipo I com 18,2 M Ω -cm de resistividade, descarbonatada e filtrada em filtro de 0,2 μ m) com fluxo de 0,6 mL por minuto; temperatura do forno (apenas para coluna analítica): 80°C; temperatura do *Post-Column Cooler*: 45°C; temperatura do amostrador automático: 15°C; temperatura do detector: 45°C e tempo de corrida: 22 min.

A metodologia analítica aqui avaliada foi descrita por Sluiter *et al* (2008) e tem sido utilizada rotineiramente no laboratório de Bioetanol do Departamento de Bioquímica da UFRJ.

Na figura 1 abaixo é apresentado um cromatograma obtido por CLAE-IR de uma solução padrão com os carboidratos de interesse.

Figura 1 – Cromatograma obtido por CLAE-IR de uma solução padrão com os carboidratos de interesse.



3.4 Validação do método de caracterização

A validação do método de caracterização foi obtida pela determinação dos seguintes parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, faixa de linearidade e precisão, utilizando o Programa Microsoft Office Excel 2010.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Linearidade

A linearidade foi determinada pelo teste de Mandel, obtida pelas equações (1), (2), (3) e (4):

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (1)$$

$$DS^2 = (n - 2) \times S_{y/x}^2 - (n - 3) \times S_{y2}^2 \quad (2)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}, \text{ onde } \hat{y} = y * ax + b \quad (3)$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}}, \text{ onde } \hat{y} = y * ax^2 + bx + c \quad (4)$$

Onde:

DS^2 = Diferença de variância;

$S_{y/x}$ = Desvio padrão dos pontos à equação da reta;

S_{y2} = Desvio padrão dos pontos à equação da parábola;

n = Número de pontos da curva

y = Área do pico

Na tabela 1 é apresentada a faixa linear, o coeficiente de determinação (r^2) e a equação da reta das curvas de calibração dos carboidratos. Todos os valores de r^2 foram maiores que 0,999.

Tabela 1 - Faixa de linearidade, r^2 e equação da reta das curvas de calibração dos carboidratos

Carboidrato	Faixa de linearidade (mg/mL)	r^2	Equação da reta
Celobiose	0,20 – 30,15	0,99998	$y = 2,5085x - 0,0671$
Glicose	0,87 – 20,90	0,99999	$y = 2,1426x + 0,0731$
Xilose	0,40 – 9,54	0,99995	$y = 1,4333x + 0,0408$
Galactose	0,21 – 6,40	0,99957	$y = 0,7362x + 0,0247$
Arabinose	0,20 – 4,79	0,99997	$y = 1,9477x - 0,0599$

4.2 Precisão

A precisão dos valores de área e tempo de retenção obtidos para cada carboidrato foi determinada por múltiplas injeções ($n = 10$) do menor valor de concentração de suas respectivas faixas de linearidade, analisadas no mesmo dia. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram todos abaixo de 2,36%, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2 - DPR dos valores de tempo de retenção e área para cada carboidrato

Carboidrato	DPR do tempo de retenção (%)	DPR da área (%)
Celobiose	0,10	0,29
Glicose	0,08	0,59
Xilose	0,08	2,03
Galactose	0,08	2,36
Arabinose	0,07	1,87

4.3 Limite de quantificação (LDQ) e limite de detecção (LDD)

Os limiares analíticos foram obtidos pelas equações (5) e (6), e estão descritos na tabela 3.

$$LDD = \frac{3,3s_y / x}{b} \quad (5)$$

$$LDQ = \frac{10s_y / x}{b} \quad (6)$$

Onde b representa o coeficiente angular da equação da reta e $S_{y/x}$ é o desvio padrão dos pontos à equação da reta.

Tabela 3 - Valores de LDQ e LDD dos carboidratos analisados

Carboidrato	LDQ (mg/mL)	LDD (mg/mL)
Celobiose	0,58	0,19
Glicose	0,36	0,12
Xilose	0,22	0,073
Galactose	0,82	0,27

Arabinose	0,12	0,039
-----------	------	-------

5. CONCLUSÃO

Validar um método significa provar e documentar resultados que indiquem que ele é seguro dentro dos limites estabelecidos e que, com sua aplicação, os resultados desejados são obtidos. Concluiu-se que o método utilizado possui uma ótima faixa de linearidade e precisão. Entretanto, observou-se que o valor de concentração mais baixo da celobiose e da galactose deve ser elevado, já que o valor de LDQ foi superior a eles. A validação desse método traz um importante avanço para as pesquisas com materiais lignocelulósicos, como a produção de bioetanol a partir do bagaço de cana de açúcar.

6. REFERÊNCIAS

Badger, P. C (2002). "Ethanol from cellulose: A general review." Trends in new crops and new uses 17-21.

Cheng, C., C.-S. Chen, *et al.* (2010). "On-line de salting and carbohydrate analysis for immobilize denzyme hydrolysis of waste cellulosic biomass by column-switching high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography **1217**(14): 2104-2110.

Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, *et al.* (2006). "Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today." Trends in Biotechnology **24**(12): 549-556.

Kuhad, R. C., R. Gupta, *et al.* (2011). "Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects." Renewable and Sustainable Energy Reviews **15** (9): 4950-4962.

Pandey, A., C. R. Soccol, *et al.* (2000). "Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse." Bioresource Technology **74** (1): 69-80.

Raessler, M. (2011). "Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants." TrACTrends in Analytical Chemistry **30**(11): 1833-1843.

Sarkar, P., E. Bosneaga, *et al.* (2009). "Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles." Journal of Experimental Botany **60**(13): 3615-3635.

Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton. (2008). Determination of Sugars, Byproducts, and in Liquid Fraction Process Samples. Laboratory Analytical Procedure (LAP) of NREL. Technical Report NREL/TP-510-42623.

Zhang, Y. H. P. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(5): 367-375.

