

# Método Aprimorado para Determinação de Açúcares de Biocombustível por HPAE-PAD

Sachin Patil<sup>1</sup>, Akash Narani<sup>2</sup>, Pahillip Coffman<sup>2</sup>Todd Pray<sup>2</sup>, Deepti Tanjore<sup>2</sup>, and Jeffrey Rohrer<sup>1</sup>,  
<sup>1</sup>Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA; <sup>2</sup>Unidade de Demonstração de Processos de Biocombustíveis Avançados (PDU AB), Lawrence Berkeley National Lab, Berkeley, CA

## Palavras-chave

Biomassa lignocelulósica, sistema Dionex Integrion HPIC, açúcares fermentáveis, hidrólise de biomassa, detecção eletroquímica, conversão de biomassa em biocombustível

## Meta

Desenvolver um método de cromatografia de íons rápidos (IC) para a determinação de açúcares em amostras de biocombustíveis usando uma coluna Thermo Scientific™ Dionex™ CarboPac™ SA10-4µm e um sistema IC de alta pressão com detecção eletroquímica.

## Introdução

A redução significativa no fornecimento de combustíveis fósseis subterrâneos e o aumento da produção de gases de efeito estufa levaram a um foco mundial em caminhos alternativos para a geração de energia a partir de fontes renováveis, como a biomassa lignocelulósica<sup>1-2</sup>. A decomposição da celulose e hemicelulose contida nas matérias-primas de biomassa lignocelulósica produz açúcares de cinco e seis carbonos que podem ser fermentados em biocombustíveis, como etanol<sup>3</sup> e biodiesel<sup>4</sup>.

A eficiência da hidrólise de biomassa em açúcares fermentáveis é usada para avaliar a eficiência geral da conversão de biomassa em biocombustível e está diretamente relacionada ao objetivo de rendimento de biocombustível e economia de processo.<sup>5</sup>



A determinação de carboidratos em hidrolisados derivados da biomassa lignocelulósica é uma etapa crucial na produção de biocombustíveis. No entanto, o desenvolvimento de métodos analíticos robustos continua sendo um desafio. Os métodos atuais sofrem de várias desvantagens, como baixo rendimento, baixa resolução do analito e falta de aplicabilidade a um conjunto mais amplo de amostras de biomassa.

A cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD) pode ser usada para determinar açúcares de amostras de hidrolisados de biomassa. Demonstrou-se que o HPAE-PAD fornece determinações rápidas de carboidratos em amostras de hidrolisado de biomassa usando a coluna Thermo Scientific™ Dionex™ CarboPac™ SA10-4µm.<sup>7</sup> A determinação de carboidratos em amostras de fornos de milho hidrolisados com ácido com diluição de 10 vezes foi mostrada na Nota de Aplicação Thermo Scientific 1089 (AN1089).<sup>8</sup> O método usa eluente de hidróxido gerado eletroliticamente e uma junta de 62 mil na célula de fluxo

eletroquímica para resolver e detectar os oito açúcares fermentáveis derivados de biomassa lignocelulósica comum, incluindo xilose, sacarose, arabinose, galactose, glicose, manose, frutose e celobiose.

O presente artigo atualiza o sistema usado para a análise de carboidratos na AN1089.8 O novo sistema combina flexibilidade e facilidade de uso com alta sensibilidade e seletividade, trazendo um nível mais alto de conveniência e economia à simples análise de açúcar. O acessório aprimorado Thermo Scientific™ Dionex™ IC PEEK Viper™ reduz o volume morto no caminho do fluxo e melhora o desempenho cromatográfico. O método proposto aqui separa oito açúcares comuns de carboidratos em menos de oito minutos. O menor tempo de execução permite tempos de retorno mais curtos da amostra e consumo reduzido de eluentes, melhorando assim a economia geral do processo. Usando este método, os carboidratos presentes em 10 amostras individuais de biocombustíveis foram quantificados.

#### Condições

Coluna:	Thermo Scientific Dionex CarboPac SA10-4µm, 4 × 250 mm (Nº de Peça 088233), CarboPac Proteção SA10-4µm 4 × 50 mm (Nº de Peça 088234)
Temp. da Coluna:	45 °C
Temp. do Compartimento:	30 °C
Vazão:	1,5 mL/min
Eluente:	1 mM KOH
Fonte de Eluente:	Cartucho do Gerador de Eluente Dionex EGC 500 KOH (Nº de Peça 075778) com Dionex CR ATC 600 Coluna de Retenção de Ânions Continuamente Regenerada (Nº de Peça 088662)
Junta Eletroquímica de Células:	62 mil
Eletrodo de Referência:	pH-Ag/AgCl
Temp. da Bandeja do Amostrador:	Ambiente
Volume de Injeção:	0,4 µL (modo Push_Full)

#### Amostras

As amostras de hidrolisado de biomassa testadas neste estudo foram derivadas de palha de milho, capim e/ou cana energética. Essas amostras de biomassa foram pré-tratadas individualmente ou como misturas (matérias-primas misturadas) com qualquer um dos reagentes: ácido, álcalis ou líquidos iônicos. Os pré-tratamentos foram seguidos por hidrólise enzimática com Cellic® Ctec2 e Cellic Htec2 (Novozymes, CA) para produzir hidrólise quase completa de oligossacarídeos de biomassa.

Todas as amostras de hidrolisado de biomassa foram diluídas 10 vezes com água DI antes do uso.

Observação: As amostras derivadas de biomassa lignocelulósica possuem matrizes complexas. Contaminantes altamente retidos nessas amostras ocuparão uma parte dos locais de troca aniônica, limitando o número de locais disponíveis para retenção de ânions analitos, principalmente após o uso contínuo. Isso pode resultar em perda de capacidade da coluna e tempos de retenção reduzidos. Se houver suspeita de contaminação dessa coluna, a coluna Dionex CarboPac SA10-4µm pode ser facilmente limpa usando KOH ou NaOH 100 mM. Consulte o Anexo A "Conservação da Coluna CarboPac SA10-4µm" no manual da coluna (documento nº 065579-02) para o procedimento de lavagem da coluna e outras informações sobre a conservação da coluna.

#### Forma de Onda de Carboidratos

Tempo (s)	Potencial (V)	Integração
0,00	+0,10	
0,20	+0,10	Início
0,40	+0,10	Fim
0,41	-2,0	
0,42	-2,0	
0,43	+0,6	
0,44	-0,1	
0,50	-0,1	

#### Equipamento

- Um sistema Thermo Scientific™ Dionex™ Integriion™ HPIC™ foi usado neste artigo. O sistema Dionex Integriion HPIC é um cromatógrafo de íons integrado que inclui:
  - Bomba de sistema Dionex Integriion HPIC
  - Controle de temperatura do compartimento do detector
  - Detector eletroquímico (número de peça 22153-62035) e célula (número de peça 072044)
  - Eletrodo de referência pH-Ag/AgCl (Nº de Peça 061879)
  - Eletrodo de trabalho Au descartável com carboidratos, embalagem de 6 (duas juntas de 2,0 mil incluídas) (Nº de Peça 066480)
  - Amostrador automático AS-AP (Nº de Peça 074925) com opção de bandeja de resfriamento (recomendado) e bandeja de frascos de 1,5/0,3mL (Nº de Peça 074936)
- Tubos de microcentrifuga estéreis montados com tampa de rosca, 1,5 mL (Sarstedt Nº de Peça 72.692.005)
- Unidades de filtro Nalgene Rapid-Flow de 0,2 µm, 1000 mL, membrana de nylon, diâmetro de 90 mm (Thermo Scientific Nº de Peça 164-0020)
- Consumíveis
  - Os números de peça são mostrados na Tabela 1

Tabela 1. Consumíveis para o sistema Dionex Integrion HPIC.

Nome do Produto	Descrição do Dispositivo de Alta Pressão	Número da Peça
Kits de montagem de tubos acessórios Thermo Scientific™ Dionex™ IC PEEK Viper™	Kit de montagem de tubos Dionex IC PEEK Viper para o sistema Dionex Integrion HPIC: Inclui um de cada N° de Peças: 088815- 088821	088798
Dionex IC PEEK Viper montagem de tubos	Proteção da coluna separadora: 0,007 × 4,0 pol. (102 mm)	088815
	Válvula de proteção da coluna: 0,007 × 5,5 pol. (140 mm)	088816
	Saída EGC para Entrada Eluente CR -TC: 0,007 × 6,5 pol. (165 mm)	088817
	Separador para Entrada Célula ED: 0,007 × 7,0 pol. (178 mm), ED	088819
	Saída CR-TC para Entrada Desgaseificador: 0,007 × 9,5 pol. (241 mm)	088821
Frascos de autoamostras Thermo Scientific™ Dionex™ AS-AP	Embalagem de 100 frascos para injetáveis de poliestireno, cápsulas, septos, 0,3 mL	055428
Pod de válvula de injeção de 4 portas	Instale no lugar do pod de válvula de 6 portas. O pod de 4 portas possui um loop de amostra interno de 0,4 µL.	074699
Cartucho de Gerador de eluente Dionex EGC 500 KOH da Thermo Scientific™	Cartucho de gerador de eluente ao usar colunas de partículas de 4 µm	075778
Coluna de Captura de Ânions Regenerada Continuamente Thermo Scientific™ Dionex™ CR-ATC 600	Coluna de captura regenerada continuamente usada com cartucho Dionex EGC KOH 500	088662
Desgaseificador Dionex HP EG	Módulo desgaseificador	075522
Detector Eletroquímico (ED)	Sem célula, com recipiente de envio	22153-62035
Célula eletroquímica	Inclui botão e bloco de suporte	072044
Eletrodo de referência pH-Ag/AgCl	Eletrodo de referência	061879
Au em eletrodos de PTFE	Eletrodo de trabalho, pacote de seis	066480
Kit de análise de carboidratos de alta concentração	Inclui junta de 62 mil e bloco espaçador modificado	085324
Junta de 62 mil	Se adquirido separadamente, pacote de dois	075499
Tampão de pH, pH 7	Padrão de calibração de pH do eletrodo de referência	SB115-500*
Tampão de pH, pH 10	Padrão de calibração de pH do eletrodo de referência	SB107-500*

\* N° de Peça Fisher Scientific

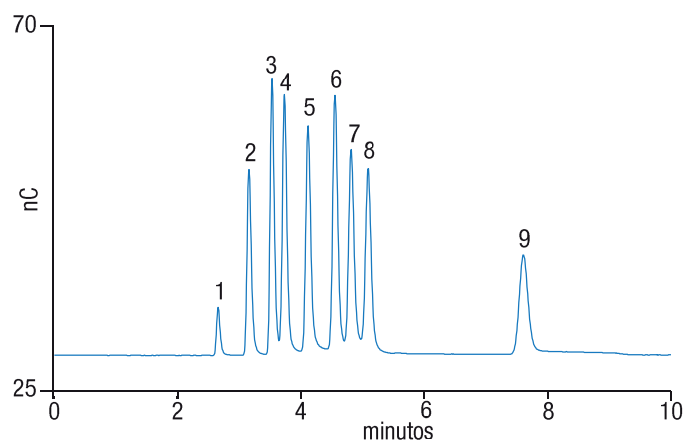
## Reagentes e Padrões

- Água deionizada (DI), classe de reagente Tipo I, resistividade de 18 MΩ-cm ou superior
- L(-)-Fucose (Sigma, N° de Peça F2543)
- D-Galactose (Sigma, N° de Peça G0625)
- D(+)-Manose (Sigma N° de Peça M6020)
- D-Frutose (Sigma N° de Peça F25X43)
- D-Xilose (Aldrich N° de Peça X-10705)
- Sacarose (Sigma N° de Peça 84097)
- D-Glicose (N° de Peça 1910-01)
- D(-)-Arabinose (Sigma N° de Peça A3131)
- D(+)-Celobiose (Sigma N° de Peça C7252)

## Resultados

### Separação

A Figura 1 mostra um cromatograma representativo obtido usando uma mistura padrão contendo oito açúcares comuns de biocombustível a 0,6 g/L cada, analisados na coluna Dionex CarboPac SA10-4µm. Utilizou-se glicose como padrão interno. Todos os picos foram bem resolvidos e a separação foi concluída em 8 minutos.



Coluna:	Dionex CarboPac SA10-4µm Analítico, 4 x 250 mm	Picos:	1. Fucose 2. Sacarose 3. Arabinose 4. Galactose 5. Glicose 6. Xilose 7. Manose 8. Frutose 9. Celobiose
Eluente:	1 mM KOH		
Quociente de vazão:	1,5 mL/min		
Inj. Volume:	0,4 µL		
Temp.:	45 °C		
Deteção:	PAD (Au)		
Junta:	62 mil		

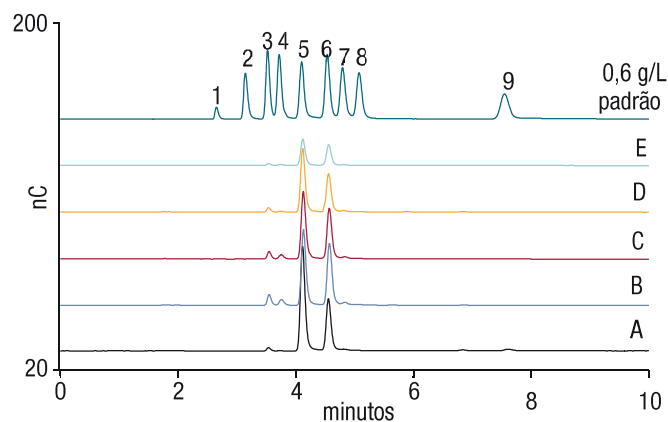
Figura 1. Separação de açúcares de biocombustível na coluna Dionex CarboPac SA10-4µm usando o método proposto (padrão de 0,6 g/L).

## Linearidade e Precisão

Utilizando este método, foram geradas curvas de calibração para os oito açúcares de biocombustível. Os resultados estão incluídos na Tabela 2. O método é linear para mais de duas ordens de magnitude de 0,005 a 2 g/L para todos os oito carboidratos. Essa ampla faixa dinâmica é uma característica importante exigida por qualquer método projetado para medir os açúcares presentes nos hidrolisados de biomassa, pois é ideal para a determinação dos açúcares que normalmente estão presentes em proporções divergentes. O tempo de retenção e os desvios padrão relativos da área do pico (RSD) são inferiores a 1,26% em todos os açúcares, indicando excelente precisão do método.

## Exatidão

Para determinar a exatidão do método, foram coletadas 10 amostras de hidrolisado de biomassa de campo. As amostras foram coletadas em várias etapas do processamento da biomassa e conversão da biomassa lignocelulósica em etanol. A exatidão do método foi avaliada pela primeira quantificação dos açúcares presentes nas amostras de hidrolisado de biomassa. Desse conjunto, cinco amostras foram selecionadas aleatoriamente para estudos de recuperação. Cromatogramas representativos para as cinco amostras de biocombustíveis selecionados são mostrados na Figura 2. Os principais açúcares presentes nessas amostras são glicose e xilose.



Coluna:	Dionex CarboPac SA10-4µm Analítico, 4 x 250 mm	Picos:	1. Fucose 2. Sacarose 3. Arabinose 4. Galactose 5. Glicose 6. Xilose 7. Manose 8. Frutose 9. Celobiose
Eluente:	1 mM KOH		
Quociente de vazão:	1,5 mL/min		
Inj. Volume:	0,4 µL		
Temp.:	45 °C		
Deteção:	PAD (Au)		
Junta:	62 mil		

Figura 2. Cromatogramas representativos de cinco amostras de biocombustíveis AE baseadas em biomassa lignocelulósica.

Todos os açúcares de biocombustível que estão presentes acima do padrão de calibração mais baixo foram aumentados com 50-150% da quantidade original encontrada na amostra de biocombustível. Os valores originais presentes, os valores aumentados e as porcentagens de recuperação de pico estão incluídos na Tabela 2. Para todas as quatro amostras estudadas aqui, foram obtidas excelentes recuperações para todos os açúcares de biomassa enriquecidos.

#### Robustez

Devido às matrizes complexas que são características das amostras de biomassa, é fundamental garantir um efeito mínimo da matriz no tempo de retenção e na estabilidade da área de pico durante um longo período de sequência. A robustez do método foi estudada injetando-se a mistura padrão de açúcar em intervalos frequentes durante uma execução de 200 sequências de injeção das amostras de biocombustível. Os resultados incluídos nas Tabelas 3 e 4 mostram excelente tempo de retenção e reprodutibilidade da área do pico, respectivamente, nas quatro injeções da mistura padrão de açúcar localizadas em diferentes posições na sequência.

Tabela 2. Dados de calibração (em 11 níveis entre 0,006 a 2 g/L de cada um dos açúcares de biocombustível) e dados de precisão (0,6 g/L, n=7) para oito açúcares comuns de biocombustível.

Parâmetro	Sacarose	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose	Celobiose
Coe. De Determinação	0,996	0,995	0,999	0,993	0,992	0,992	0,997	0,999
RT RSD (%)	0,12	0,08	0,08	0,10	0,06	0,10	0,05	0,04
Área RSD (%)	0,28	0,47	0,51	0,62	0,66	0,69	1,26	0,28

Tabela 3. Estudos de recuperação de açúcar

Nome da amostra	Açúcar	Média Quantidade (g/L)	Pico (g/L)	Recuperação (%)	RSD (%)
A	Arabinose	0,02	0,02	100	0,1
	Glicose	1,17	0,8	106	0,1
	Xilose	0,5	0,5	114	0,0
	Celobiose	0,03	0,04	98,7	0,0
B	Arabinose	0,01	0,10	94,1	0,0
	Galactose	0,07	0,05	97,6	0,0
	Glicose	1,07	0,8	89,4	0,0
	Xilose	0,8	0,5	95,6	0,0
C	Arabinose	0,09	0,10	91,2	0,0
	Galactose	0,05	0,05	129	0,1
	Glicose	1,03	0,8	93,8	0,0
	Xilose	0,7	0,5	104	0,0
D	Arabinose	0,04	0,02	88,3	0,3
	Galactose	0,00	0,01	117	0,1
	Glicose	0,72	0,8	97,7	0,0
	Xilose	0,4	0,5	111	0,0
E	Arabinose	0,03	0,02	95,3	0,1
	Galactose	0,01	0,02	99,1	0,0
	Glicose	0,55	0,8	100	0,0
	Xilose	0,4	0,5	108	0,0

Tabela 4 Robustez de tempo de

Inj. N°	Tempo de retenção (min)								
	Fucose	Sacarose	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose	Celobiose
1	2,66	3,16	3,53	3,74	4,13	4,56	4,83	5,10	7,63
75	2,68	3,18	3,55	3,75	4,13	4,58	4,83	5,12	7,63
100	2,66	3,16	3,53	3,73	4,12	4,56	4,82	5,10	7,60
200	2,66	3,15	3,53	3,73	4,10	4,53	4,79	5,08	7,55

Tabela 5. Robustez da área de

Inj. N°	Área (nC*min)								
	Fucose	Sacarose	Arabinose	Galactose	Glicose	Xilose	Manose	Frutose	Celobiose
1	0,46	2,09	2,91	3,08	3,10	3,48	2,99	2,78	2,20
75	0,44	2,03	2,85	3,03	3,01	3,35	2,88	2,74	2,16
100	0,44	2,05	2,88	3,05	3,04	3,37	2,93	2,75	2,20
200	0,44	2,03	2,84	3,03	3,02	3,33	2,91	2,72	2,21

### Conclusão

Um método aprimorado para quantificação de açúcares de biomassa que pode ser convertido em biocombustíveis é apresentado aqui. O método é capaz de separar todos os oito principais açúcares de biomassa em 8 minutos. Os dados de resposta para todos os açúcares de biomassa estudados aqui mostraram excelente correlação com a concentração. O método fornece excelente reprodutibilidade da área de pico, bem como precisão do tempo de retenção dentro dos níveis de concentração estudados. Os estudos de recuperação de pico realizados para demonstrar a precisão do método mostraram boa recuperação de todas as amostras com pico, sugerindo que o método é preciso. Finalmente, o método é robusto, com tempo de retenção e área de pico permanecendo estáveis quando submetido a mais de 200 injeções de amostras de biocombustíveis. Em resumo, o método proposto aqui é uma maneira conveniente, precisa e robusta de quantificar açúcares de biomassa em amostras complexas de hidrolisados e melhorará a confiabilidade da determinação de cálculos de eficiência de biomassa em biocombustível.

### Referências

- Hill, J.; Nelson, E.; Tilman, D.; Polasky, S.; Tiffany, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS*, 2006, 103(30), 11206–11201.
- Ragauskas, A.J.; et al. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 2006, 311, 484-489.
- Goldemberg, J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, 2007, 315, 808–810.
- Alonso, D. M.; et al. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chem.* 2010, 12, 1493–1513.
- Wyman C.E., Ethanol from Lignocellulosic biomass: Technology, economics and opportunity. *Bioresour. Technol.*, 1994, 50, 3–16.
- Sluiter, J.B.; et al. Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 58(16), 9043–9053.
- Nota de Aplicação Thermo Scientific 192. Amostras de Biocombustíveis para Determinação de Carboidratos. <https://apps.lab.thermofisher.com/App/2277/au192-carbohydrate-determination-biofuel-samples> (Acessado em 22 de julho de 2016).
- Nota de Aplicação Thermo Scientific 1089. Determinação de Carboidratos em Hidrolisados Ácidos da Madeira. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-1089-Carbohydrates-Acid-Hydrolysates-Wood-AN70941-EN.pdf> (Acesso em 22 de julho de 2016).

## **Agradecimentos**

Agradecemos ao Escritório de Tecnologias de Bioenergia (BETO) da divisão de Eficiência Energética e Energia Renovável (EERE) do Departamento de Energia (DOE) pelo financiamento necessário para realizar os estudos de desconstrução. Também agradecemos aos Drs. Allison Ray e Chenlin Li, do Departamento de Biocombustíveis e Tecnologias de Energia do Laboratório Nacional de Idaho, por nos fornecer as matérias-primas de biomassa lignocelulósica estudadas neste projeto. As enzimas Cellic® Ctec2 e Cellic® Htec2 usadas aqui foram graciosamente fornecidas para pesquisas propostas por Novozymes, CA.

Saiba mais em [thermofisher.com/IC](http://thermofisher.com/IC)