

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Ester Ribeiro Gouveia\*, Renata Trajano do Nascimento e Ana Maria Souto-Maior

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-901 Recife – PE, Brasil

George Jackson de Moraes Rocha

Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Campus I, CP 116, 12602-810 Lorena – SP, Brasil

Recebido em 23/7/08; aceito em 25/2/09; publicado na web em 3/7/09

VALIDATION OF METHODOLOGY FOR THE CHEMICAL CHARACTERIZATION OF SUGAR CANE BAGASSE. In this work, a methodology for the characterization of sugar cane bagasse was validated. Bagasse pre-treated with steam in a 5000 L reactor at a pressure of 15.3 kgf/cm<sup>2</sup>, during 7 min, was used to test the methodology. The methodology consisted of the hydrolysis of the material with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 72% v/v, for the quantification of carbohydrates, organic acid, furfural and hydroxymethylfurfural by HPLC; insoluble lignin and ash by gravimetry; and soluble lignin by spectrophotometry. Linearity, repeatability, reproducibility and accuracy of the results obtained in two Research Laboratories were determined, and were considered to be suitable for the validation of the methodology.

Keywords: bagasse; HPLC; validation.

## INTRODUÇÃO

Materiais lignocelulósicos na forma de biomassa de plantas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono e são constituídos, principalmente, de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina.<sup>1</sup> O bagaço de cana-de-açúcar, para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos utilizados para a bioconversão em etanol, já que estes materiais apresentam alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, transporte e armazenagem.<sup>2</sup>

A metodologia utilizada para a determinação da composição química do material é de extrema importância em estudos de valorização de materiais lignocelulósicos. Em particular, o desenvolvimento de processos para a produção de etanol a partir da biomassa da cana-de-açúcar envolve a otimização, de forma integrada, de diversas etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados. Para a avaliação da eficiência de diferentes processos alternativos, é fundamental uma caracterização precisa da composição química da biomassa durante a sua conversão nas diferentes etapas envolvidas.

Para a caracterização química de lignocelulósicos geralmente é utilizada uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico. Assim, ocorre uma despolimerização do polissacarídeo, formando oligômeros e seus açúcares constituintes, isto é, suas unidades repetitivas. No caso da hemicelulose, as maiores frações são de xilose, ácido acético e furfural. Já para a celulose, são formados glicose e hidroximetilfurfural (HMF) que, por sua vez, pode ser convertido a ácido fórmico.<sup>3</sup>

O objetivo deste trabalho foi a validação da metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar, quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. A metodologia analítica aqui avaliada foi descrita por Rocha *et al.*<sup>4</sup> e tem sido utilizada rotineiramente nos laboratórios do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) para análises de gramíneas, tais como bagaço e palha de cana-de-açúcar. No presente trabalho, esta metodologia foi validada, através da análise de resultados de caracterização de uma mesma amostra de bagaço obtidos por 2 laboratórios: pelo Departamento de Biotecnologia da EEL e pelo Laboratório

de Processos Biotecnológicos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Ambos os laboratórios participam da Rede Bioetanol (rede nacional financiada pela Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP/MCT), cujo objetivo é o desenvolvimento de um processo de produção de etanol a partir da biomassa da cana-de-açúcar. A validação desta metodologia garante a qualidade dos resultados obtidos pelos diversos grupos que compõem esta rede.

## PARTE EXPERIMENTAL

## Material

Para a validação da metodologia, foi utilizada uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado na Usina Vale do Rosário (SP), através de explosão a vapor. A amostra foi caracterizada no Laboratório B (EEL/USP) e no Laboratório A (Departamento de Antibióticos/UFPE) para comparação dos resultados.

O efeito do tratamento por explosão a vapor sobre a organização estrutural da celulose aumenta consideravelmente sua área superficial e, por conseguinte, sua susceptibilidade à hidrólise ácida e/ou enzimática. Por esta razão, este método de pré-tratamento tem sido proposto para a conversão de biomassa lignocelulósica a etanol.<sup>5</sup>

O pré-tratamento do bagaço, com uma umidade de aproximadamente 50%, foi realizado em reator de 5000 L a uma pressão de 15,3 kgf/cm<sup>2</sup> (equivalente a 200 °C – pressão de vapor d'água), durante 7 min. A completa abertura da válvula da base do reator se deu em 15 s e o material pré-tratado foi transferido para um ciclone por diferença de pressão. O material foi lavado exaustivamente até a total remoção dos açúcares hidrolisados e, em seguida, foi seco à temperatura ambiente e armazenado.

## Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico

Amostras de 2 g (moídas a 20 mesh em moinho Wiley) de bagaço pré-tratado, pesadas com precisão de 0,1 mg foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado (Fisatom) a 45 °C por 7 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água

\*e-mail: estergouveia@gmail.com

destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e auto-clavados por 30 min a 121 °C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

#### Determinação de lignina insolúvel na fração sólida

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klasson modificado por Rocha *et al.*<sup>4</sup> O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a Equação 1:

$$\%L_{ki} = \frac{M_k - M_c}{M_A} * 100 \quad (1)$$

onde:  $L_{ki}$  – Lignina Klason insolúvel;  $M_k$  – massa de lignina insolúvel seca;  $M_c$  – massa de cinzas;  $M_A$  – massa da amostra seca.

#### Determinação de lignina solúvel na fração líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 2.<sup>4</sup>

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (2)$$

onde:  $C_{lig}$  - concentração de lignina solúvel, em g/L;  $A_T$  - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;  $A_{pd} = c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2$  - absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações  $c_1$  e  $c_2$  foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida

Antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C<sub>18</sub> (Phenomenex). Para a construção das curvas de calibração dos carboidratos, foram injetadas no cromatógrafo líquido, soluções contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose. A construção das curvas de calibração dos ácidos orgânicos foi realizada através da injeção de soluções contendo ácido acético e ácido fórmico. As condições das análises no Laboratório A, foram: coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%); fase móvel: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol L<sup>-1</sup>; fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>; temperatura do forno: 45 °C e detector de índice de refração em cromatógrafo líquido da Agilent (modelo 1100). Nas análises de carboidratos e ácidos orgânicos, realizadas no Laboratório B, foi utilizada uma coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad) e um cromatógrafo da Shimadzu (modelo CR 7), empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RDI-6, sendo a fase móvel, o fluxo e a temperatura iguais àquelas utilizadas no Laboratório A.

Da mesma forma, para a construção das curvas de calibração de furfural e de hidroximetilfurfural, foram injetadas soluções contendo estes dois compostos. Nas análises de furfural e de hidroximetilfur-

fural, uma amostra do hidrolisado foi filtrado em membrana de 0,45 µm. As condições das análises no Laboratório A, foram: coluna C-18 (Beckman); fase móvel: solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>; detector UV/VIS a 274 nm; temperatura do forno a 25 °C, em cromatógrafo líquido Agilent (modelo 1100). Nas análises de carboidratos e ácidos orgânicos, realizadas no Laboratório B, foi utilizada coluna C-18 (Hewlett-Packard) em cromatógrafo Shimadzu modelo CR 7A com detector de UV visível marca Shimadzu modelo SPD-10, sendo a fase móvel, o fluxo e a temperatura também iguais àquelas utilizadas no Laboratório A.

#### Determinação de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla (Fornitec modelo MDS 15X15X30). Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 2 g do bagaço em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 3.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (3)$$

onde: % cinzas – percentual em massa de cinzas;  $M_c$  – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio);  $M_a$  – massa da amostra base seca.

#### Validação do método de caracterização

A validação do método de caracterização foi obtida pela determinação dos parâmetros: linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, utilizando os Programas Microsoft Office Excel 2007 e Microcal Origin 6.0. A análise da variância também foi realizada utilizando estes programas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito (produto comercial), a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.<sup>6</sup> A faixa linear de detecção que obedece a Lei de Beer depende do composto analisado e do tipo de detector utilizado. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (R), obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento (detector UV/VIS ou Índice de Refração) em função de várias concentrações dos analitos. A faixa linear para cada analito, em ambos laboratórios, foi: 0,0306-0,306 g/L (celobiose); 0,1621-1,621 g/L (glicose); 0,0622-0,622 g/L (xilose); 0,0316-0,316 g/L (arabinose); 0,0293-0,293 g/L (ácido fórmico); 0,0286-0,286 g/L (ácido acético); 0-1 g/L (furfural); 0-0,8 g/L (hidroximetilfurfural) O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos.<sup>6</sup> Neste trabalho foram utilizados 5 pontos. Os coeficientes para cada equação da reta ( $\text{Área} = a C + b$ ; C – concentração), obtidas em ambos laboratórios, são apresentadas na Tabela 1. Em ambos laboratórios foram obtidas adequadas linearidades, com coeficientes de correlação maiores que 0,995.<sup>7</sup>

### Repetibilidade

A repetibilidade expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais, aplicadas em um curto intervalo de tempo.<sup>6</sup> Para a

**Tabela 1.** Parâmetros das curvas de calibração dos componentes

	Laboratório A		Laboratório B		
	a	R	a	b	R
Celobiose	$3,44 \times 10^6$	1,000	$3,43 \times 10^6$	$3,34 \times 10^3$	0,997
Glicose	$3,12 \times 10^5$	0,999	$2,81 \times 10^5$	$9,19 \times 10^3$	0,997
Xilose	$2,94 \times 10^5$	1,000	$2,77 \times 10^5$	$4,13 \times 10^3$	0,997
Arabinose	$3,25 \times 10^5$	1,000	$2,81 \times 10^5$	$2,49 \times 10^3$	0,998
Ácido fórmico	$1,20 \times 10^5$	0,999	$9,67 \times 10^4$	$9,18 \times 10^2$	0,997
Ácido acético	$1,84 \times 10^5$	0,999	$1,48 \times 10^5$	$9,57 \times 10^2$	0,996
HMF	$1,24 \times 10^5$	0,990	$3 \times 10^7$	$1,02 \times 10^3$	1,000
Furfural	$1,69 \times 10^5$	0,998	$5 \times 10^7$	$3,91 \times 10^3$	1,000

**Tabela 2.** Repetibilidade obtida para celulose, hemicelulose e lignina total no Laboratório A

Experimentos	Analista 1			Analista 2		
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Total (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Total (%)
1	49,99	8,06	33,55	50,42	7,93	34,93
2	48,00	7,86	33,84	49,63	7,89	34,85
3	46,50	8,09	34,63	48,94	8,00	33,98
Média	48,16	8,00	34,01	49,66	7,94	34,59
S	1,43	0,10	0,46	0,60	0,04	0,43
CV	<b>2,97</b>	<b>1,28</b>	1,34	1,22	0,57	1,24

avaliação da repetibilidade do método de caracterização química, foram realizados seis (Laboratório A) e três (Laboratório B) procedimentos de hidrólise com ácido sulfúrico a 72% v/v e todas as etapas subsequentes, para determinar os teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes na amostra de bagaço de cana-de-açúcar. Ao determinar carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF, é possível se calcular os teores de celulose e de hemicelulose utilizando os seguintes fatores de conversão:<sup>4</sup> celulose (0,90 x massa de glicose; 0,95 x massa de celobiose; 1,20 x massa de HMF; 3,09 x massa de ácido fórmico); hemicelulose (0,88 x massa de xilose; 0,88 x massa de arabinose; 0,72 x massa de ácido acético; 1,37 x massa de furfural).

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados de repetibilidade de celulose, hemicelulose e lignina total obtidos em ambos os laboratórios, respectivamente.

**Tabela 3.** Repetibilidade obtida para celulose, hemicelulose e lignina total no Laboratório B

Experimentos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Total (%)
1	48,2	8,8	34,9
2	47,3	9,8	34,5
3	47,6	8,2	33,5
Média	47,7	8,9	34,3
S	0,37	0,66	0,59
CV	<b>0,78</b>	<b>7,39</b>	<b>1,72</b>

O coeficiente de variação (CV) menor que 20% foi utilizado como um critério para avaliar a repetibilidade do método.<sup>7</sup> Pode-se observar nas Tabelas 2 e 3 excelentes repetibilidades dos resultados obtidos em ambos os laboratórios, com coeficientes de variação bem abaixo de 20%.

## Reprodutibilidade

A reprodutibilidade designa a fidelidade entre laboratórios, geralmente obtida em análises colaborativas. A principal função da reprodutibilidade é confirmar se determinada metodologia pode ou não ser transferida de um laboratório para outro, gerando resultados confiáveis dentro dos critérios estabelecidos. Assim, enquanto o termo repetibilidade se refere à precisão intralaboratorial, a reprodutibilidade se refere à precisão interlaboratorial.<sup>6</sup>

A reprodutibilidade foi avaliada entre ambos os laboratórios pela análise da variância (Tabela 4). O nível de significância, no presente trabalho considerado 95%, é a probabilidade de se rejeitar a hipótese que as medidas não sejam significativamente diferentes, quando a probabilidade (p-valor) for menor ou igual a 0,05.<sup>8</sup> Como pode ser observado na Tabela 4, as medidas de celulose, hemicelulose e lignina na amostra de bagaço pré-tratado com vapor, realizadas nos dois laboratórios, não foram significativamente diferentes, uma vez que as probabilidades (p-valor) foram maiores que 0,05.

Os termos Entre Grupos e Dentro dos Grupos referem-se à forma como foram analisados os dados, ou seja, a comparação das medidas em cada laboratório (Dentro dos Grupos) e as medidas entre os laboratórios (Entre Grupos). Nas medidas da celulose, as variações em cada laboratório e entre os laboratórios foram semelhantes. No caso da hemicelulose, as variações também foram semelhantes, tanto em cada laboratório, como entre os laboratórios, mas cerca de quatro vezes menores, que aquelas encontradas nas medidas da celulose. As variações das medidas da lignina foram cerca de três vezes menores em cada laboratório que as variações nas medidas da celulose. Por outro lado, as variações entre os laboratórios foram cerca de quatorze vezes menores em variações que as medidas da celulose.

## Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado

**Tabela 4.** Reprodutibilidade obtida para celulose, hemicelulose e lignina total entre ambos laboratórios

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
CELULOSE					
Entre grupos	6,32	2	3,16	2,48	0,16
Dentro dos grupos	7,65	6	1,27		
HEMICELULOSE					
Entre grupos	1,86	2	0,93	4,14	0,07
Dentro dos grupos	1,34	6	0,22		
LIGNINA TOTAL					
Entre grupos	0,50	2	0,25	0,68	0,54
Dentro dos grupos	2,22	6	0,37		

e o valor aceito como verdadeiro ou como referência. Assim, uma variação expressa como 105% indicaria uma tendência positiva de desvio de 5%, enquanto uma exatidão expressa como 95% significaria uma tendência negativa de 5%.<sup>6</sup>

No presente trabalho, para a avaliação da exatidão, foram considerados os valores dos balanços de massa, ou seja, os teores de celulose, hemicelulose, lignina total e cinzas totais foram somados e considerados exatos, para resultados de  $100 \pm 5\%$ . A Tabela 5 apresenta os resultados dos balanços de massa do bagaço tratado com vapor e caracterizados em ambos os laboratórios. As cinzas totais obtidas para o Laboratório A foram igual a 6,6 e para o Laboratório B foram 5,5 %.

**Tabela 5.** Exatidão do método de caracterização química pelo balanço de massa obtido em ambos laboratórios

Laboratório A		Laboratório B
Analista 1	Analista 2	Analista
98,20	99,88	97,4
96,30	98,97	97,1
95,82	97,52	95,0

Para o bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento, os teores de celulose, hemicelulose e de lignina foram, respectivamente, 42,8; 25,8 e 22,1%, sendo a quantidade de cinzas totais 1,4% e de extrativos de 6,1%. Trabalho recente utilizando bagaço de cana-de-açúcar indica percentuais próximos para os três maiores componentes: celulose – 43,9%, hemicelulose – 26,4% e lignina – 22,2%.<sup>9</sup>

Observando-se as Tabelas 2 e 3, verifica-se que os teores de celulose (48,65%) e de lignina (34,29%) são um pouco maiores que aqueles encontrados para o bagaço sem pré-tratamento (42,8 e 22,1%, respectivamente), enquanto que os teores de hemicelulose

são menores (8,28%) que o do bagaço *in natura* (25,8%), devido ao material ter sido submetido a um pré-tratamento com vapor, que elimina boa parte da hemicelulose.<sup>5</sup>

## CONCLUSÕES

O método de caracterização do bagaço de cana-de-açúcar apresentou excelente linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, sendo possível a sua utilização em dois diferentes laboratórios. A validação deste método traz um importante avanço para as pesquisas com materiais lignocelulósicos, como a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

1. Badhan, A. K.; Chadha, B. S.; Kaur, J.; Saini, H. S.; Bhat, M. K.; *Biore-sour. Technol.* **2007**, *98*, 504.
2. Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V.; *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 69.
3. Palmqvist, E.; Hahn-Hagerdal, B.; *Biore-sour. Technol.* **2000**, *74*, 25.
4. Rocha, G. J. M.; Silva, F. T.; Curvelo, A. A. S.; Araújo, G. T.; *Resumos do 5<sup>th</sup> Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components*, Paraná, Brasil, 1997.
5. Ohgren, K.; Bura, R.; Saddler, J.; Zacchi, G.; *Biore-sour. Technol.* **2007**, *98*, 2503.
6. Lanças, M.; *Validação de métodos cromatográficos de análise*, Rima: São Paulo, 2004.
7. <http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/methdev.pdf>, acessada em Dezembro 2007.
8. Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*, Casa do Pão: São Paulo, 2005.
9. Rocha, G. J. M.; Silva, J. S.; *Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, São Paulo, Brasil, 2006.