

MÉTODOS DE ANÁLISE EM QUÍMICA DA MADEIRA

(Métodos de análise química utilizados no Laboratório de Química da Madeira do Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas da UFRRJ)

Heber dos Santos Abreu, Alexandre Monteiro de Carvalho, Maria Beatriz de Oliveira Monteiro, Regina Paula Willemen Pereira, Hulda Rocha e Silva, Kelly Carla de Almeida de Souza, Kelysson de Freitas Amparado, Daniel Bastos Chalita

Departamento de Produtos Florestais do Instituto de Florestas/UFRRJ

BR 465, Km 07 - Seropédica

Cep. 23890-000

APRESENTAÇÃO

A presente publicação tem o objetivo de dar suporte metodológico aos usuários de laboratórios de Química da Madeira, relacionando métodos e procedimentos utilizados em química da madeira, principalmente nas aulas práticas e no desenvolvimento de pesquisas. Os métodos descritos visam facilitar professores, pesquisadores, estudantes, laboratoristas e interessados que desenvolvem pesquisas relacionadas à madeira e outros materiais lignocelulósicos, principalmente com relação à obtenção de celulose, hemicelulose, lignina e seus produtos de transformação. Alguns métodos foram ajustados às condições de trabalho do laboratório, melhorando assim os resultados obtidos.

INTRODUÇÃO

A madeira ou qualquer outro material lignocelulósico constitui um acervo químico e bioquímico cuja constituição e organização ainda reveste-se de segredos e desconhecimentos, apesar do grande avanço tecnológico nas últimas décadas. A constituição química dos materiais lignocelulósicos é abrangente e diversificada, com relação às substâncias que nelas se traduzem em um sistema multimolecular de alta complexidade estrutural, de ligações cruzadas e de grande importância na preservação e nas propriedades dos materiais lenhosos. Hoje a química da madeira toma novos rumos e novos desafios com o aprimoramento tecnológico das análises

e ao surgimento de madeiras modificadas por transgenia, mutação e melhoramento genético, portanto, novos conhecimentos haverão de advir com novas fontes de informações até então desconhecidas. Esta complexidade e progresso tecnológico fascinam, o especialista em busca de metodologias mais adequadas na rotina de um laboratório de química da madeira. Os métodos descritos neste artigo são comumente usados em laboratórios de química da madeira, alguns na forma originalmente descritos, outros modificados. A intenção do grupo de Química e Bioquímica da Lignina do Departamento de Produtos Florestais será o lançamento continuado de outros artigos sobre métodos em química e bioquímica da madeira.

1. PREPARO DA MADEIRA LIVRE DE EXTRATIVOS

1.1. Aparelhagem

- a) Aparelho de extração tipo Soxhlet;
- b) Erlenmeyer ou balão de 1000mL;
- c) Banho-maria;
- d) Equipamento para filtração: funil de placa sinterizada de porosidade média, kitasato e fonte de vácuo;
- e) peneira granulométrica.

1.2. Solventes

- a) Ciclohexano;
- b) Solução álcool etílico:ciclohexano (1:2);
- c) Etanol 95%;
- d) Água destilada.

1.3. Procedimento

- Utilizar a fração que atravessa a peneira número 16 internacional (malha 40 ASTM) e a que fica retida na peneira número 24 internacional (malha 60 ASTM).
- A partir da amostra seca ao ar, transferir uma dada quantidade para o tubo de extração, de maneira que a serragem não atinja a extremidade superior do sifão.
- Extrair seguindo a série eluotrópica na ordem: ciclohexano, álcool etílico:ciclohexano (1:2) e álcool etílico 95%, durante 4-6 horas para cada extração.
- Transferir a serragem para o funil de placa sinterizada, remover o excesso de solvente, por sucção e ao final de cada extração remover o tubo de extração até evaporação total do solvente.
- Após a extração com etanol, transferir o material para o erlenmeyer ou balão de vidro e extrair sucessivamente com 3 porções de 1000mL de água destilada, aquecendo o

frasco em cada extração durante 1 hora em banho-maria a 100°C.

- Filtrar, lavar com 500mL de água destilada quente e deixar o material secar completamente ao ar.

2. PREPARAÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO LIVRE DE PROTEÍNA

- Tratamento para solubilizar proteína total de materiais lignocelulósicos de tecidos jovens de plantas, folhas, cascas, frutas.

2.1. Procedimento

- Pesar 1g do material livre de extrativos e colocar em um Erlenmeyer de 250mL, contendo 40mL de solução de pepsina (1% em ácido clorídrico 0,1N).
- Manter em banho-maria a 40°C por 13 horas. Após este período a amostra deve ser filtrada sob vácuo em um funil de placa sinterizada. Deve ser realizada lavagem utilizando 48mL de água bidesionizada quente e 12,8mL de ácido sulfúrico (5%) por duas vezes. Em seguida a amostra deve ser transferida para um balão de vidro contendo 240mL de ácido sulfúrico (5%) e colocada em refluxo por uma hora. Filtrar utilizando um funil de placa sinterizada e realizar a lavagem com 48mL de água bidesionizada quente por duas vezes. Em seguida, realizar mais duas lavagens com 32mL de etanol e duas lavagens com 24mL de éter.

3. LIGNINA DE KLASON (INSOLÚVEL)

3.1. Aparelhagem

- a) Banho - maria;
- b) Vidro de relógio;
- c) Tubo de ensaio;
- d) Pipetas;
- e) Cadinho de porcelana;
- f) Estufa ou dessecador de vidro;
- g) Balança analítica;
- h) Bastão de vidro.

3.2. Reagente

- a) Ácido Sulfúrico

3.3. Procedimento

- Transferir aproximadamente 300mg de amostra seca de madeira livre de extrativo para um tubo de ensaio, e adicionar lentamente 3mL de ácido sulfúrico (72%).
- A amostra deve ser homogeneizada por agitação contínua durante 1 minuto. Conservar a mistura por 1 hora entre 25 e 30°C, agitando freqüentemente se necessário.
- Transferir o material para um balão de 250mL e diluir a solução de ácido sulfúrico, adicionando 84mL de água destilada.
- Deixar o material em refluxo por 4 horas, depois em repouso para sedimentação do resíduo. Retirar a solução por meio de pipeta.
- Em seguida lavar o resíduo com 500mL de água destilada quente em um funil de placa sinterizada. Retirar a solução por meio de pipeta.
- Secar em estufa a 105°C ou em dessecador de vidro com anidrido fosfórico, até peso constante.
- Proceder a análise por duas vezes.
- Devem ser realizadas duas pesagens com variação de 0,2mg.
- A porcentagem de lignina é calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ lignina} = (\text{Peso Seco do resíduo (mg)} /$$

$$\text{peso da amostra de madeira}) \times 100$$

4. LIGNINA DE WILLSTÄTTER OU DE ÁCIDO CLORÍDRICO

4.1. Procedimento

- Tratar 1g de madeira moída livre de extrativo (partículas superiores a 40 mesh) com 20mL de ácido clorídrico (40 - 42%), sob temperatura de 1 a 5°C.
- A suspensão obtida deve ser agitada freqüentemente durante 2 horas à temperatura ambiente. Após esse processo, adicionar gelo picado (aproximadamente 6,5g). Em seguida, a solução deve permanecer em repouso durante 18 horas a temperatura ambiente.
- Logo após, adicionar 6,5mL de água destilada e centrifugar a mistura final. Lavar o precipitado formado com ácido clorídrico (1:1; 20mL), depois com água destilada promovendo novamente uma centrifugação.
- Aquecer o resíduo proveniente da centrifugação em 20mL de água destilada, à temperatura de ebulição, com gradual adição de carbonato de sódio, até neutralização do pH da solução.
- O precipitado deve então ser removido por centrifugação e novamente tratado com 20mL de água destilada em ebulição, por 10 minutos e em seguida centrifugar. Este último processo deve ser repetido três vezes.

5. LIGNINA DE BJÖRKMAN

5.1. Procedimento

- Moer a madeira.
- Homogeneizar as partículas para 40 mesh.
- Extrair com acetona ou outro solvente.
- Secar até obter peso constante com anidrido fosfórico ou cloreto de cálcio em um

- dessecador de vidro.
- Moer em um moinho de bolas giratório ou outro tipo de moinho correspondente.
 - Extrair com dioxano (800 mL/42mL de água) por 4 dias sob agitação magnética.
 - Filtrar a solução de dioxano por duas vezes em um funil de porcelana, utilizando papel de filtro, consecutivas.
 - Evaporar a solução a 40°C em 55mbar de pressão negativa. No início da operação, a pressão deve ser inferior a este valor.
 - Evaporar completamente a solução dioxano/água.
 - Após a evaporação, adicionar 100mL de ácido acético/água 9:1 para dissolver a lignina. Esta solução deve ser adicionada sem aquecimento para evitar a formação de ésteres.
 - Observação: Preparar, pelo menos, 200mL de ácido acético. Usar 10mL para limpar os funis.
 - Após dissolver o material por completo, filtrar, primeiramente, em um funil de vidro sinterizado de placa porosa número 5 e depois no funil de número 4.
 - Transferir a solução de ácido acético, filtrada, para um funil de separação. Gotejar a solução em uma porção de 1600mL de água destilada ou 10 vezes o volume da solução de ácido acético usada, sempre com agitação.
 - Filtrar a solução aquosa em um funil de porcelana com papel de filtro.
 - Recolher este material filtrado em uma placa de petri.
 - Este material deve permanecer em um dessecador de vidro com KOH.
 - Após seco, dissolver em uma solução de 1,2-dicloroetano + etanol (2:1), não mais do que 100mL.
 - Gotejar em éter etílico por duas vezes, alternado com duas operações de centrifugação. A lavagem constitui a última

etapa deve ser realizada com éter de petróleo.

6. LIGNINA DIOXANO

6.1. Material

- a) Uma certa quantidade de madeira;
- b) 200mL (dioxano/H₂O): 9/1;
- c) 180mL de dioxano;
- d) 20mL de H₂O destilada
- e) Balão de 1000mL com três saídas;
- f) Condensador de bolas;
- g) Funil de decantação de 200mL;
- h) 1,46mg HCl ou 1,23mL de HCl.
- i) Chapa de aquecimento;
- j) Evaporador rotatório;
- l) Centrífuga;
- m) Dessecador e fonte de vácuo.

6.2. Procedimento

- Adicionar lentamente em um balão de 1000mL de três saídas e contendo amostra de lignina, uma solução de (dioxano e H₂O (9:1)) + HCl.
- A mistura reacional adquirida deve ser aquecida em uma chapa de aquecimento a 90-95°C, em atmosfera de nitrogênio, por um período de 0,5-48horas.
- Em seguida, deixar esfriar a mistura reacional ainda em atmosfera de N₂. Depois filtrar e lavar utilizando um funil de placa sinterizada com 12mL da mesma solução.
- O extrato (solução ácida) deve ser concentrado, em um evaporador rotatório, até o aparecimento de um material viscoso.
- Precipitar este material em um grande volume de H₂O destilada sob agitação permanente.
- O precipitado deve ser separado por centrifugação e, em seguida, lavado totalmente com água destilada por três vezes.

- A amostra, em seguida, deverá ser seca em um dessecador com anidrido fosfórico sob vácuo.

7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA UTILIZANDO BROMETO DE ACETILA

7.1. Procedimento

- 5g de madeira livre de extrativo devem ser colocados em um trap de vidro de 15 mL contendo uma solução de 25% (p/p) de brometo de acetila em ácido acético (5mL) contendo ácido perclórico (70%) (0,2 mL).
- Os traps deverão ser fechados e colocados em uma estufa a 70°C por 30 minutos.
- Durante a digestão o mesmo, deverá ser agitado em intervalos de 10 minutos.
- Após a digestão a solução deverá ser transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100mL contendo NaOH 2M (10mL) e ácido acético (25mL).
- Em seguida o material restante no trap deverá ser lavado com ácido acético e adicionado ao balão volumétrico até completar 100mL.
- O espectro no UV deverá ser registrado tendo uma solução branca e uma amostra de lignina como padrão. A absorção da lignina será medida em 280nm.
- Uma curva de calibração deve ser realizada.

$$\% \text{ de lignina} = 100 (A_s - A_b) V / aw$$

A_s e A_b = Absorbância da amostra e do padrão, respectivamente.

V = Volume da solução

a = Absorvidade da lignina padrão $1 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(pode ser uma lignina conhecida)

w = Peso da amostra

8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CELULOSE POR REAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO

8.1. Aparelhagem

- a) Manta de aquecimento;
- b) Chapa de aquecimento;
- c) Funil de vidro simples;
- d) Funil de placa perfurada;
- e) Becher;
- f) Kitasato;
- g) Condensador de refluxo;
- h) Balão de fundo chato ou fundo redondo.

8.2. Reagente

- a) Ácido nítrico;
- b) Etanol P.A.;
- c) Solução de ácido acético 1%;
- d) Solução de NaOH 4%.

8.3. Procedimento

- Refluxar 5g de madeira moída por 1 hora em uma solução alcoólica de ácido nítrico (densidade 1,4).
- Filtrar o material e aquecer com água destilada durante 30 minutos.
- Extrair o resíduo com uma solução aquosa de NaOH (4%) durante 40 minutos. Este resíduo deve ser lavado com água destilada, depois com ácido acético e novamente com água. Posteriormente, deve ser levado à estufa a 105°C e seco até peso constante.

Obs.: Preparar a solução em capela, na proporção de 100mL de etanol e 25mL de ácido nítrico. O etanol pode ser substituído pela água.

9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE

METOXILA DE LIGNINA E DE MATERIAIS LIGNOCELULOSICOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE SEIZEL MODIFICADO

9.1. Produtos

- Cristais de fenol;
- Fósforo vermelho;
- Ácido iodídrico $d = 1.7$;
- Amido e bicarbonato de sódio = 1:1;
- Solução de acetato de sódio + ácido acético;
- Bromo;
- Acetato de sódio cristalino;
- Iodeto de potássio;
- Amido;
- Solução de tiosulfato de sódio N/10;
- CO_2 ou N_2 .

9.2. Aparelhagem

- Recipiente para a lignina (cápsula gelatinosa ou um pequeno tubo de vidro com uma das extremidades fechada);
- Aparelho para determinação de metoxila;
- Pipeta de 5mL;
- Espátula;
- Pipeta de 10mL;
- Pissete;
- Vidro de relógio de 6 cm de diâmetro;
- Bureta de 50mL (1/100mL).

9.3. Procedimento A

- No balão (K), como mostra a figura 1, adicionar uma porção de fósforo vermelho, utilizando apenas a ponta de uma espátula, alguns cristais de fenóis, 0,5mL de anidrido acético e logo depois 10mL de ácido iodídrico ($d=1,7$). O balão deve ser conectado ao resto do aparelho, já com o condensador refrigerado pela circulação de água. Também deve ser controlada a vazão

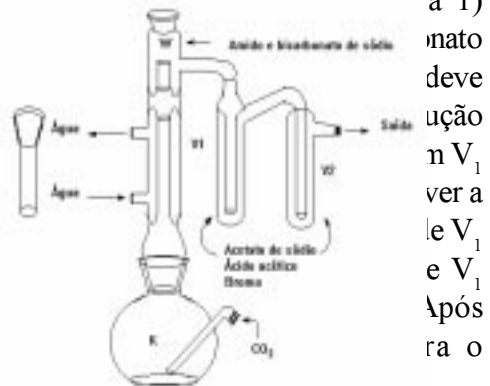
de CO_2 ou N_2 em, aproximadamente, 30 borbulhas por minuto.

- Deixar refluxar o conteúdo deste balão por 30 minutos em banho de óleo, à temperatura de ebulição do sistema ($140-150^\circ\text{C}$), e depois deixar esfriar, utilizando a corrente de CO_2 .

Figura 1. Aparelho de vidro para determinação de metoxila.

9.4. Procedimento B

- No balão (K), como mostra a figura 1, adicionar uma porção de fósforo vermelho, utilizando apenas a ponta de uma espátula, alguns cristais de fenóis, 0,5mL de anidrido acético e logo depois 10mL de ácido iodídrico ($d=1,7$). O balão deve ser conectado ao resto do aparelho, já com o condensador refrigerado pela circulação de água. Também deve ser controlada a vazão



- Pesar 20-30mg de lignina ($\approx 0,02\text{mg}$) em um pequeno recipiente de vidro e colocar no interior do balão.
- Aquecer rapidamente o balão ($140-150^\circ\text{C}$), mantendo a água fria em circulação no condensador durante 45 minutos.
- Depois, retirar o produto e transportar quantitativamente para um Erlenmeyer.

- Em seguida, adicionar duas porções de acetato de sódio (ponta de espátula) e algumas gotas de ácido fórmico, até a solução se tornar totalmente transparente. Nesse momento, adicionar 1g de KI e deixar o recipiente tampado com vidro de relógio por 5 minutos em ausência de luz.
- Após este procedimento, titular com tiosulfato de sódio N/10. O conteúdo reacional do balão poderá ser utilizado para 5 determinações.

$$\frac{0,517 \times V}{E} \times 100 = \% \text{OCH}_3$$

V= Volume em mL de tiosulfato de sódio N/10 consumido

E= Peso da lignina em mg

10. PREPARO DE SOLUÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METOXILA

10.1. Solução aquosa de amido

- Utilizar 5g de amido para 1 litro de água destilada.
- Agitar a solução durante 5 minutos em aquecimento e depois filtrar em papel de filtro.

10.2 Solução aquosa de bicarbonato de Sódio

- Utilizar 100g de bicarbonato de sódio para 1 litro de água destilada.

10.3. Solução amido/bicarbonato de sódio

- Juntar 500mL da solução de amido com 500mL de solução de bicarbonato de sódio.
- ### 10.4 Solução de acetato de sódio e ácido acético
- Utilizar 28g de ácido acético e 8g de acetato de sódio.

- Juntar ambos em um frasco e agitar até solubilizar completamente o acetato de sódio.

11. METILAÇÃO DE HIDROXILA FENÓLICA

11.1. Procedimento

- Em um balão de vidro, em gelo, dissolver 2g de p-toluilsulfonil-metil-nitrosamida em 30mL de éter etílico, em seguida adicionar 10mL de uma solução de etanol (96%) e KOH a 4% (w/v), deixando em banho de gelo durante 5 minutos. Com o aparecimento de um precipitado amarelo, torna-se necessário adicionar mais etanol para dissolvê-lo.
- Em seguida, destilar a mistura reacional em banho-maria a 40°C para liberação de diazometano-éter. O destilado deve ser recolhido em um Erlenmeyer contendo 1g de lignina, dissolvida em uma solução de dioxano-metanol (10:2 v/v) resfriado a 0°C. Após 40 horas a 4°C, evaporar a solução e dissolver o resíduo em 10mL de dioxano. A lignina deve ser precipitada em éter etílico e recuperada por centrifugação.
- Observação: o material reacional é explosivo, não devendo ser agitado. O uso de aparelho de vidro com juntas esmerilhadas deve ser também evitado.

12. METILAÇÃO TOTAL

12.1. Procedimento

- Dissolver 200mg de lignina em 15mL de dioxano/H₂O a 96%(v/v) concentração comercial, acrescentar 3g de NaOH moído, em 2mL de sulfato de metila. Após 4 horas de agitação, à temperatura ambiente, neutralizar a mistura com HCl 1N. Precipitar, a lignina inteiramente metilada em éter etílico e,

depois, recolher por centrifugação.

Observação: O sulfato de metila requer cuidados especiais, não devendo entrar em contato com a pele.

13. OXIDAÇÃO DA LIGNINA POR NITROBENZENO

13.1. Procedimento

- Fibras: Colocar em uma microbomba de aço inox de 45mL o material livre de extrativo (700mg), NaOH (10mL) 2 N e nitrobenzeno 1mL. Aquecer a mistura em 170°C por duas horas e depois esfriar com água fria. Lavar a mistura reacional com água (2mL), para depois, o filtrado, mais o produto da lavagem, serem extraídos com éter (5x50mL). Acidificar o licor extraído a pH 3 com ácido sulfúrico 2 N e extrair novamente com éter (4x50mL).

- Secar o segundo extrato etérico por 24 horas em sulfato de sódio anidro, evaporar, secar e armazenar em um dessecador de vidro com anidrido fosfórico. Dissolver o resíduo etérico em metanol (10mL), e usar o 3,4,5-trimetilbenzaldeído como referência interna, como padrão, para traçar a curva de calibração que antecede a aplicação da cromatografia de gás. Este método também se aplica a amostra pura de lignina. O nitrobenzeno requer cuidados especiais, não devendo entrar em contato com a pele.

14. REDUÇÃO DE GRUPOS ALDEÍDO TERMINAIS DA LIGNINA POR NaBH₄

14.1. Procedimento

- Dissolver 100mg de lignina em uma solução

de etanol (2mL) e (1mL) de NaOH 0,1N em atmosfera de nitrogênio. Adicionar 20mg de NaBH₄ e 2mL de água destilada. Após 2 dias, a solução deve ser acidificada a pH 4 com HCl diluído e, o produto da reação, deve ser precipitado em água destilada, centrifugado e recentrifugado por 2 vezes com água (2x12mL) e seco a frio.

15. SAPONIFICAÇÃO DA LIGNINA

- Dissolver 20mg de lignina em NaOH 5% (0,5mL), à temperatura ambiente, em atmosfera de N₂, e deixar em repouso durante 24 horas. Precipitar a lignina por acidificação a pH 6-7, depois centrifugar, lavar duas vezes com água e secar a frio.

16. SOLUBILIDADE DA MADEIRA EM HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1%

16.1. Aparelhagem

- Balança analítica com precisão de 1mg;
- Estufa com temperatura mantida a 105°C;
- Banho-maria;
- Equipamento para filtração: funil de placa sinterizada, 50mL de capacidade, porosidade média; pesa-filtro; kitassato com anel de borracha e fonte de vácuo;
- Becher de 250 mg;
- Pipeta volumétrica de 100mL;
- Vidro de relógio;
- Bastão de vidro.

16.2. Reagentes

- Hidróxido de sódio 1% (0,25 N);
- Ácido acético 10%.

16.3. Amostragem

- A serragem utilizada será aquela que atravessar a peneira de nº 16 internacional (malha 40 ASTM).

16.4. Procedimento

- A partir da amostra seca, pesar em um vidro de relógio, uma quantidade equivalente a 2,0 g \pm 0,1 g absolutamente seca.
- Transferir para um Becher de 200mL e adicionar, com pipeta, 100mL de solução de NaOH e agitar com bastão.
- Colocar o becher em banho-maria e cobrir com vidro de relógio.
- Conservar em banho-maria exatamente por uma hora, agitando rapidamente o conteúdo do Becher após 10, 15 e 25 minutos do início.
- Secar em estufa a 105°C até peso constante.
- Transferir o funil de placa sinterizada para um pesa filtro previamente tarado, deixar esfriar em um dessecador e, em seguida, pesar.
- A porcentagem dos produtos solubilizados será dada por:

$$X\% = (P_i - P_f / P_f) \times 100$$

E = Porcentagem de produto solubilizado

P_i = Peso inicial da amostra a.s. em g

P_f = Peso da amostra após o ensaio

- Os resultados em duplicação não devem variar mais de 5% do valor médio. Com cuidado é possível conservar a variação dentro de 2%.

17. UMIDADE DA MADEIRA POR SECAGEM EM ESTUFA

- Este o método é usado para a determinação da umidade da madeira, através de secagem

em estufa a 105 \pm 3°C, na madeira reduzida a serragem.

- O presente método não deve ser aplicado àquelas madeiras que contenham substâncias voláteis que não a água.

17.1. Aparelhagem

- Balança analítica com precisão de 0,1mg;
- Estufa com temperatura controlada a 105 \pm 3°C;
- Pesa-filtro com tampa esmerilhada ou cápsula de alumínio com tampa;
- Dessecador com desidratante e indicador de saturação (utilizar alumina ou sílica-gel).

17.2. Procedimento

- Aquecer o pesa filtro com a tampa a 105 \pm 3°C, esfriar em dessecador e pesar com precisão de 0,1mg. Repetir a operação até obter o peso constante.
- Pesar 1 a 2g da amostra diretamente no pesa filtro previamente tarado, secar em estufa a 105 \pm 3°C por 4 horas.
- Tampar, transferir para o dessecador e deixar esfriar até temperatura ambiente. Pesar com precisão de 0,1mg. Repetir estas operações até obter peso constante, aquecendo por períodos de 2 horas.
- O resultado é expresso em porcentagem, pela fórmula:

$$U = (P - P_{a.s.} / P) \times 100\%$$

U = Umidade expressa em porcentagem do peso inicial da amostra.

P = Peso inicial da amostra.

P_{a.s.} = Peso absolutamente seco da amostra

- Observações: Os resultados em duplicação

não devem diferir mais do que 0,2%.
Se conveniente, expressar esta determinação em termos da porcentagem absolutamente seca (% a. s. = 100 – U).

18. DETERMINAÇÃO DE HOLOCE- LULOSE POR CLORAÇÃO

18.1. *Aparelhagem*

- a) Funil de placa sinterizada
- b) Erlenmeyer (250 e 25mL)
- c) Banho-maria
- d) Papel Filtro
- e) kitasato e fonte de vácuo

18.2. *Reagentes*

- a) Ácido acético
- b) Clorito de sódio (80%)

18.3. *Procedimento*

- A amostra de madeira deve estar completamente livre de extrativos e totalmente seca.
- Para 2,5g de amostra deve-se adicionar 8mL de água destilada quente, 0,5mL de ácido acético e 1g de clorito de sódio em um Erlenmeyer de 250mL. Recomenda-se tampar o Erlenmeyer.
- A mistura deve ser aquecida em um banho-maria a 70°C. Após 60 minutos, 0,5mL de ácido acético e 1g de clorito de sódio deve ser adicionado. Após sucessivas horas, 0,5mL de ácido acético e 1g de clorito de sódio devem ser readicionados sob agitação. Essa etapa deve ser repetida até as fibras mostrarem-se completamente separadas da lignina. Normalmente são necessárias 6 horas de cloração.
- Após esse período, a amostra reacional deve ser mantida em repouso sem adição de qualquer reagente durante 24 horas.

- Esfriar o material e em seguida filtrar lavando com água destilada até a cor amarela e odor de cloro desaparecerem completamente. Essa etapa deve ser realizada sob vácuo. Recomenda-se por último adicionar acetona e em seguida o material deve ser seco em uma estufa a 105°C durante 24 horas.
- O material deve ser esfriado em um dessecador por 1 hora para proceder a pesagem.

19. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE □-CELULOSE

19.1. *Aparelhagem*

- a) Banho-maria ou chapa de aquecimento
- b) 3 Bechers de 250mL
- c) Filtro de porosidade média

19.2. *Reagentes*

- a) Hidróxido de sódio 17,5% e 8,3%
- b) Ácido acético 10% (misturar uma parte por peso de ácido glacial com 9 partes de água destilada).

19.3. *Procedimento*

- A amostra deve ser preparada a partir da holocelulose.
- Pesar aproximadamente 2g de holocelulose seca e colocar dentro de um Becher de 250 mL e cobri-lo com vidro de relógio.
- Medir 25mL de uma solução de NaOH 17,5% em uma proveta e mantê-la a 20°C.
- Adicionar 10mL da solução de NaOH 17,5% a holocelulose em um Becher de 250mL e cobrir com um vidro de relógio mantendo a temperatura a 20°C em um banho-maria.
- Manipular a holocelulose com um bastão de vidro, após 2 minutos promover a maceração até perceber que as partículas estão total-

mente separadas.

- Após 5 minutos adicionar mais 5mL de NaOH 17,5% e agitar a mistura rigorosamente com um bastão de vidro até dissolver todo o material
- Manter a mistura reacional a 20°C por 30 minutos perfazendo um total de tempo de tratamento de 45 minutos.
- Adicionar 33mL de água destilada a 20°C.
- Agitar o material contido no Becher mantendo a temperatura 20°C durante 1 hora.
- Sob vácuo, filtrar o material reacional em um filtro de porosidade média.
- Lavar o material com 100mL de NaOH 8,3% e 20°C e em seguida lavar duas vezes com água destilada a mesma temperatura.
- No próprio filtro colocar 15mL de ácido acético 10% (temperatura ambiente), aguardar 3 minutos e em seguida utilizar vácuo para retirar todo ácido acético.
- Lavar com água destilada a 20°C por várias vezes até o resíduo celulósico ficar livre completamente do ácido acético.
- Lavar novamente com 250mL de água destilada e em seguida secar o material em uma estufa a 105 °C durante 24 horas.
- Esfriar o material em um dessecador por 1 hora, e em seguida pesá-lo.

$$\% \text{ de } \square \text{ celulose} = P_2/P_1 \times 100$$

P_2 = peso do resíduo celulósico

P_1 = peso da amostra holocelulósica original

20. REDUÇÃO DO CONIFERALDEÍDO E SINAPALDEÍDO

20.1. Álcool coniferílico (Método 1)

- Dissolver o coniferaldeído (50mg; 0,28mmol) em acetato de etila (10mL). Adicionar hidreto de boro e sódio (21mg; 0,56mmol; 2 equiv.) à solução e manter agitando por 1h

em temperatura ambiente. Durante este tempo, deve ocorrer à formação de um precipitado amarelo. A mistura reacional deve ser purificada em água (50mL), a fase orgânica separada e a fase aquosa extraída com acetato de etila (2 x 50mL).

- As fases orgânica e aquosa deverão ser combinadas em uma única fase, e depois seca em $MgSO_4$ anidro e evaporada a baixa pressão (40°C) para obter álcool coniferílico. Um sólido branco/amarelo ou algumas vezes um óleo amarelo deve ser formado (49,9mg; 99%). O álcool coniferílico possui ponto de fusão de 78,2°C.

20.2. Álcool sinapílico

- O aldeído sinapílico é reduzido conforme descrito para o álcool coniferílico. O rendimento do álcool (óleo) poderá alcançar o valor de 94%. A cristalização poderá ser feita em cloreto de metila/éter de petróleo.

20.3. Álcool coniferílico (Método 2)

20.3.1. Preparação do triacetoxihidreto de boro e sódio.

- Preparar uma suspensão de $NaBH_4$ (74mg) em acetato de etila (15mL) sob refrigeração em um banho de gelo e água. Adicionar ácido acético glacial (3,05eq), através de uma seringa, gotejando por mais 5 min, até a formação de uma solução clara. A solução corresponde ao agente e pode ser usada imediatamente.

Para larga escala (3,5g), a adição de ácido acético é feita por gotejamento durante 30min, e a agitação continuada por mais 30min.

20.3.2. Álcool Coniferílico

- O coniferaldeído (134mg;0,753mmol) deve ser adicionado ao triacetoxihidreto de boro e sódio (3,0eq) preparado em acetato de etila. A reação deve ser monitorada por CCD (Cromatografia em camada delgada – 5% CH₃OH em CH₂CL₂). O material inicial desaparece completamente em 7hs. Entretanto o meio reacional deve ser mantido em repouso durante a noite e então diluído em acetato de etila e extraído com água (20mL). A fase orgânica deve ser separada e a fração aquosa extraída com acetato de etila (2x20mL). O acetato de etila deve ser lavado com água destilada (20mL), NH₄CL (20mL) e seco em MgSO₄. A evaporação do solvente produzirá um xarope amarelo ainda contendo ácido acético. O ácido acético residual deve ser removido por coevaporação com etanol absoluto.
- A cristalização deve ser realizada com CH₂CL₂/éter de petróleo. Para preparação em larga escala (5g), seguindo o mesmo procedimento por aproximadamente 10hs à temperatura ambiente.

21. SÍNTESE DE DHP-POTEÍNA PELO MÉTODO CONTÍNUO

- 50mg de álcool coniferílico, mp 73-75°C, deve ser dissolvido em uma solução tampão de fosfato (88mL) pH 5,5. Uma solução de peroxidase (300 unidades – 275 unidades) de 2,4mg dissolvida em 24mL de solução tampão de fosfato pH 5,5.
- 0,076mL de peróxido de hidrogênio deve ser dissolvido em 88 mL de uma solução tampão de fosfato pH 5,5. O colchão de solução protéica deve manter em agitação constante para receber por gotejamento as soluções de peroxidase, peróxido de hidrogênio e a solução contendo o álcool coniferílico.

- O material deve ficar em agitação durante 4 dias. Todo procedimento deve ser realizado sob atmosfera de Nitrogênio.
- Observação: dissolver 10mg de proteína em 88mL de solução tampão de fosfato.
- Após 48 horas de reação, a solução deve ser centrifugada em 30.000rpm sob refrigeração e lavado com H₂O bidesionizada por três vezes

22. PREPARO DE SOLUÇÃO TAMPÃO

- Dissolver 1,98g/L de KH₂PO₄ e 5,3 g/L de NaHPO₄ em H₂O bidesionizada. Ajustar o pH adicionando NaOH ou HCl.

23. PURIFICAÇÃO DO DHP-PROTEÍNA

- 10mg de DHP deve ser dissolvido em 800iL de 100mM de TRIS-HCl pH 8,8 ou 7,5 e agitado por 5min. Depois 200iL de uma solução tampão de fosfato pH 5.5 com tripsina (5mg/mL) deve ser adicionada sob forte agitação e em seguida deixada em incubação durante 1 hora a 37°C também sob agitação 960rpm). Após isto o produto reacional deve ser centrifugado a 15800rpm (10 minutos) em uma centrífuga e o sobrenadante retirado. O resíduo deve ser novamente suspenso em água destilada e lavado por 4 vezes por centrifugação. A

amostra será então suspensa em água destilada (250 mL) e depois resfriada e seca a frio.

24. ACETILAÇÃO DA LIGNINA

- Dissolver 300mg de lignina em 5mL de piridina, em seguida, adicionar 5mL de anidrido acético para proporção (1:1) durante 48 horas. Depois, a lignina deve ser recuperada, por precipitação, da mistura reacional em éter etílico e lavado cuidadosamente por três vezes com este mesmo solvente usando a centrifugação. Posteriormente, secar a frio durante três dias em um dessecador de vidro, com KOH sob pressão reduzida.

25. DESACETILAÇÃO

- Dissolver 100mg de lignina acetilada em NaOH 0,5 N a 2-5°C e deixar em repouso por 48 horas. A solução deve ser neutralizada em amberlite IR (120) (H⁺) e concentrada.

26. TESTE DE MÄULE

- O teste de Mäule é um procedimento analítico de reação de cor sobre o tecido lenhoso ou lignina, para verificação da presença de unidades de siringila.
- Na reação de Mäule, o permanganato de potássio é reduzido pela madeira a dióxido de manganês, que é depositado sobre a fibra, reage com ácido clorídrico, formando cloro em seguida reagindo com a lignina

26.1. Procedimento

- Preparar um corte citológico de 20µm de espessura.
- Inserir em placa de Petri em solução de permanganato de potássio (1%) por cinco

minutos.

- Lavar por duas vezes com água bidesionizada e tratar com solução de ácido clorídrico (3%) até a cor passar de marrom escuro à marrom claro.
- Descartar a solução de ácido clorídrico e lavar a amostra com água por duas vezes.
- Tratar com hidróxido de amônio concentrado.

27. TESTE DE WIESNER

- O reagente é preparado através de uma combinação de 50mL de uma solução de floroglucinol 2% em etanol 95% e 25mL de ácido clorídrico concentrado. A solução deve ser armazenada em vidro âmbar devidamente fechado até o momento da utilização, quando misturado ao ácido clorídrico.
- No momento da aplicação sobre o tecido lenhoso imediatamente deve-se evidenciar a cor violeta-avermelhada.

28. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA TOTAL EM ANALISADOR AUTOMÁTICO KJELDAHL

28.1. Aparelhagem

- Tubos de digestão de 80mL;
- Erlenmeyer de 125mL;
- Analizador automático Kjeldahl;
- Balança de precisão de 1mg;

28.2. Reagentes

- Ácido sulfúrico;
- Solução de hidróxido de sódio (44,4%);
- Solução indicadora de ácido bórico (2%);
- Solução de THAM (Tri-hidróxi-amino-metano) 0,03N.

28.3. Procedimento

- A solução de ácido sulfúrico deve ser padronizada pela adição de 10mL de solução indicadora de ácido bórico (2%) e 5 mL de solução de THAM 0,03N. Após a titulação com ácido sulfúrico efetua-se o seguinte cálculo: Normalidade do ácido = $N \text{ do THAM} \times \text{Volume THAM} / \text{Tit.} \times \text{THAM}$
- Com a normalidade do ácido coloca-se o tubo de digestão com amostra, já previamente digerida, no Kjeldahl auto analyser.
- Solução de Hidróxido de Sódio 44,4%
- Pesam 444g de Hidróxido de Sódio e dissolver em 0,8 L de água, transferir para um balão de 1 L e aferir o balão.
- Solução indicadora de ácido bórico 2%.
- Solução de THAM (Tri-hidroximinometano) 0,03N
- Pesam 3,5g de Tri-hidroxiaminometano e dissolver em um balão volumétrico de 1L. Aferir o balão.

29. PREPARAÇÃO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E DE RMN ¹³C NO ESTADO SÓLIDO

- O material lignocelulósico livre de extrativo e de proteína, deve ser moído em um moinho de bolas até apresentar aparência de talco. Dependendo do tipo de moinho e do material, o tempo de moagem deverá ser ajustado. Após moagem o material deverá ser seco em um dessecador contendo anidrido fosfórico. De um a dois miligramas de material destinar-se-á ao infravermelho e 500 mg ao RMN¹³C.

ANEXO

Tabela 1. Propriedades dos solventes citados neste artigo.

Solventes	Ebulição (°C)	D 20° 4°	N 20° D	Ponto de inflamação (°C)	Meios de Desidratação
Acetona	56	0,791	1,359	-18	CaCl ₂ , k ₂ CO ₃ , peneira molecular 3Å
Ácido Acético anidro	136	1,082	1,390	+49	CaCl ₂
Ácido Acético glacial	118	1,049	1,372	+40	P ₂ O ₅ , Mg(C ₁ O ₄) ₂ , CuSO ₄
Tetracloro de Carbono	77	1,594	1,466	Não inflamável	Destilação, CaCl ₂ , peneira molecular 4Å
Ciclohexano	81	0,779	1,426	-17	Na, peneira molecular 4Å
Clorofórmio	61	1,480	1,448	Não inflamável	CaCl ₂ , P ₂ O ₅ , peneira molecular 4Å
Diclorometano	40	1,325	1,424	Não inflamável	CaCl ₂ , peneira molecular 4Å
Dioxano	101	1,034	1,422	+11,8	CaCl ₂ , Na, peneira molecular 4Å
Etanol	78	0,791	1,361	+12	CaO, Mg, peneira molecular 3Å
Éter etílico	35	0,714	1,353	-40	CaCl ₂ , Na, peneira molecular 4Å

Tabela 1. Propriedades dos solventes citados neste artigo.

Continuação...

Tabela 2. Propriedades dos reagentes citados neste artigo.

Reagente	Formula	Estado
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	Líquido
Ácido clorídrico	HCl	Líquido
Óxido de cálcio	CaO	Sólido
Sulfato de cálcio	$CaSO_4$	Sólido
Sulfato de sódio	Na_2SO_4	Sólido
Ácido nítrico	HNO_3	Líquido
Ácido acético	CH_3COOH	Líquido
Óxido de zinco	ZnO	Sólido
Óxido de alumínio	Al_2O_3	Sólido

Tabela 2. Propriedades dos reagentes citados neste artigo.

Continuação....

Reagente	Quantidade	Observações
Sulfato de Sódio	2	
Sulfato de sódio	2	
hidreto de sódio	2	
óxido de sódio	2	
óxido de alumínio	2	
óxido de zinco	2	
óxido de cálcio	2	
óxido de silício	2	

Tabela 3. Relação de unidades de medidas granulométrica

Continuação...

LITERATURA CONSULTADA

- BAO, W., O'MALLEY, SEDEROFF, R. R. Wood contain a cell-wall structural protein, *Proc. Natl. Acad. Sci, Plant Biology*, V. 89, p.6604-6608, 1992.
- DASHEK, W. V. **Methods in plant biochemistry and molecular biology**, CRC Press, New York, 1997, 443p.
- BODDEY, R.M. , CHALK, P.M., VICTORIA, R.L., MATSUI, E., DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen of *Paspalum notatum* cv. Batatais. **Can. J. Microbiol.** n.29, p.1036, 1983.
- BREMMER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In: **Methods of soil analysis** (C.A. BLACK, D.D. EVANS, J.L. EVANS, J.L. WHILE, L.E. ENSMINGER, F.E. CLARK, eds) **American Society of Agronomy, Inc.**, Madson, 1965, p.1179-1237.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**, V1. e V. 2., Interscience publishers, Nova york, 1967, 377p.
- CONNORS, W.J., CHEN, C-L., PEW, J. C. Enzymatic dehydrogenation of the lignin model coniferaldehyde, **J. Org. Chem.**, V.35, n. 6. p.1920-1924, 1970.
- DASSHEK, W. **Methods in biochemistry and molecular biology**, CRC pres, Nova York, 443p.1997.
- EFLAND, M. J. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. **Tappi**, V. 60, n. 10, 1977,143-144.
- EVANS, J. J. & HIMMELSBACH, D. SA. Incorporation of peroxidase into synthetic lignin, **J. Agric. Food Chem.** V. 39, p.830-832, 1991.
- FAIX, O. Investigation of lignin polymer models (DHP's). **Holzforschung**, V. 40, p.273-230., 1986.
- GRABBER, J. H., RALPH, J. HATFIEL, R. D., QUIDEAU, S. KUSTER, T., PELL, A. Dehydrogenation polymer-Cell wall complexes as a model lignified grass walls, **J. Agric. Chem.**, n. 44, p.1453-1459. 1996.
- HARBONE, J. B. **Methods in plant biochemistry**, V.1., Academic Press, Londres, 537p. 1994.
- HILLIS, W. E. **Heartwood and tree exudates**, Springer-Verlag, Berlin, 1987, 239p.
- LIN, S. Y. E DENCE, C.W. **Methods in lignin chemistry**, Spring-Verlag, 1992, 568p.
- LOUREIRO, M. DE F. & BODDEY, R.M. Aprimoramento da tecnologia de kjedahl para estudos do balançom de N total. **R. Bras. Ci. Solo**, 1986.
- LU, FACHUANG & RALPH, J. Highly selective syntheses of coniferyl and sinapil alcohols, **J. Agric. Food Chem**, n. 46, p.1974-1976. 1998.
- LUDLEY, F. H. & RALPH, J. Improved preparation of coniferyl and sinapyl alcohols, **J. Agric. Food Chem.**, n. 44, 2942-2943. 1996.
- MACEDO, J. M. B., GOTTSCHAHK,

- BOM, E. P. S. **Applied, Biochemistry and Biotechnology**, V. 99, 77-7, 1999.
- McDOUGALL, G. STEWART, D. MORRISON, I. M. Tyrosine peridues enhance Grass-Linking of synthetic proteins into lignin. Like dhychosenaticas products. **Phytochemistry**, V. 41, n. 1, p. 43-47. 1996.
- MC COUGALL, G. J., STEWART, D., MARRISON, I. M. Cell-wall-bound oxidase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation, **Planta**, V.194, n. 14, p.9-14. 1994.
- MC DOUGALL, G. STEWART, D. MORRISON, I. M. Tyrosine peridues enhance Grass-Linking of synthetic proteins into lignin. Like dhychosenaticas products. **Phytochemistry**, V. 41, n. 1, p.43-47, 1996.
- MERCK, Reativos MERCK, Tablas auxiliares para el laboratorio químico. Alemanha.
- PAECH, K. E TRACEY M. V. **Modern methods of plant analysis**, Springler-Verlag, Berlim-Gottingen-Heidelberg 1955, 396p.
- RUSSEL, W. R., FORRESTER, A. R., CHESSON, A., BURKITT, M. Oxidative coupling during lignin polimerization is determinates by unpaired electron delocalization within parent phenylpropanoid radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, V. 332, n.2, p.357-366. 1996.
- RUZIN, S. E. **Plant Microtechnique and Microscopy**, Oxford University Press, Nova York, 1999, 307p.
- TAPPI, Official test methods and provisional test methods, Atlantam USA, 1979.
- TERASHIMA, N. ATALLA, R. H., VANDERHART, D. L. Solid state NMR spectroscopy of specifically ¹³C-enriched lignin in wheat straw from coniferin, **Phytochemistry**, V. 46, n. 5, p.863-870., 1997.
- VETEC, Catálogo (Reagentes Analítico), 2005, Brasil.
- WATERMAN, P. G E MOLE, S. **Analysis of phenolic plants metabolites**, Blackwell Scientific Publication, London, 1994, 235p.
- WAYMAN, M. & OBIAGA, T. I.. 1973. The modular structure of lignin, **Can. J. Chem.**, n. 52, p.2102-2110, 1974.
- ZAKIS, G F. **Functional Analysis of lignins e their derivatives**, TAPPI PRESS, Atlanta, 1994. 91p.