

Procedimentos para Análise Lignocelulósica





ISSN 0103-0205

Dezembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 236

Procedimentos para Análise Lignocelulósica

*João Paulo Saraiva Moraes
Morsyleide de Freitas Rosa
José Manoel Marconcini*

Campina Grande, PB
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Algodão

Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário
CEP 58428-095
Caixa Postal 174
Fone: (83) 3182 4300
Fax: (83) 3182 4367
Home page: <http://www.cnpa.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Carlos Alberto Domingues da Silva
Secretário-Executivo: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Membros: Fábio Aquino de Albuquerque, Giovani Greigh de Brito, João Luis da Silva Filho, Máira Milani, Maria da Conceição Santana Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Valdinei Sofiatti, Wirton Macêdo Coutinho.

Supervisão editorial: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Revisão de texto: Ana Luisa Barra Soares
Normalização bibliográfica: Valter Freire de Castro
Tratamento de ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Editoração eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho
Foto da capa: João Saraiva Morais
Capa: Flávio Tôrres de Moura

1ª edição

1ª impressão (2010): 500

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Algodão

Morais, João Paulo Saraiva.

Procedimentos para análise lignocelulósica. / por João Paulo Saraiva Morais, Morsyleide de Freitas Rosa e José Manoel Marconcini.- Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

54 p. (Embrapa Algodão/ Documentos, 236).

1. Lignocelulose-análise. 2. Holocelulose. 3. Alfacelulose. 4. Lignina. 5. Cinzas. 6. Extrativos. I. Saraiva, João Paulo Saraiva. II. Rosa, Morsyleide de Freitas. III. Marconcini, José Manoel. IV. Título. V. Série

CDD: 634.905

© Embrapa 2010

Autores

João Paulo Saraiva Morais

Farmacêutico, M.Sc. em Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas

Pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB,
saraiva@cnpa.embrapa.br

Morsyleide de Freitas Rosa

Engenheiro Químico, D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical.
morsy@cnpat.embrapa.br

José Manoel Marconcini

Engenheiro de Materiais, D.Sc. em Química

Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária
marconcini@cnpdia.embrapa.br

Apresentação

O petróleo é uma importante commodity, fonte de energia e de matéria-prima para inúmeros compostos, os petroquímicos. Desde o início da revolução industrial, por volta de 1750, a humanidade depende de fontes fósseis não renováveis de petróleo e de carvão. Como essas fontes não são renováveis, elas serão exauridas um dia. Não é uma questão de “se”, mas de “quando”.

A humanidade passa por uma fase de transição, quando deixa de depender do petróleo, e começa a explorar e reexplorar fontes renováveis de energia (eólica, solar, hídrica, entre outras) e de matéria-prima (biomassa). Nesse contexto, a fitomassa vegetal assume um papel de destaque.

Das plantas, podem-se obter: proteínas; aminoácidos e enzimas de interesse industrial; óleos e gorduras, com utilidades energéticas e de síntese de matérias-primas; lignina (uma substituta para o carvão, a qual é um combustível sólido que ainda pode ser convertido em combustível gasoso e pode ser a origem de uma rede de derivados similar à dos petroquímicos); hemicelulose; matéria-prima para produção de espessantes, adesivos, emulsificantes, estabilizantes, edulcorantes, plásticos, entre outros; e celulose, capaz de ser convertida em combustível líquido e em matéria-prima para vários ramos industriais, hoje atendidos pela petroquímica.

Apesar de as plantas poderem fornecer todos os materiais acima citados, dificilmente um mesmo vegetal será apto para fornecer, ao mesmo tempo, todos esses materiais. Dessa forma, torna-se fundamental que se conheçam as potencialidades de cada fonte de biomassa, bem como suas limitações.

As metodologias aqui descritas, principalmente para celulose, hemicelulose e lignina, podem apresentar uma grande variação de resultados, tanto por causa das diferentes composições dos materiais lignocelulósicos, como também por causa dos próprios erros intrínsecos dos métodos. Há metodologias mais precisas, que empregam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC, na sigla em inglês), com procedimentos não citados aqui. As metodologias aqui apresentadas visam permitir comparações e medições que não necessitem de muita acurácia, e que permitam um conhecimento mínimo sobre o material utilizado.

Dessa forma, neste documento visa-se reunir e apresentar protocolos utilizáveis para determinar o percentual, em massa, das frações lignocelulósicas (umidade, cinzas, extrativos, lignina, hemicelulose e celulose) de um material vegetal, auxiliando na otimização da exploração das suas oportunidades.

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Procedimentos para Análise Lignocelulósica	11
1. Introdução.....	11
2. Procedimentos.....	10
2.1. Preparo da amostra.....	10
2.2. Umidade.....	10
2.2.1. Determinação do teor de umidade.....	11
2.3. Cinzas.....	15
2.3.1. Determinação do teor percentual de cinzas.....	17
2.4. Extrativos.....	20
2.4.1. Determinação do teor de extrativos.....	21
2.5. Lignina.....	25
2.5.1. Determinação de lignina.....	27
2.6. Holocelulose.....	34
2.6.1. Determinação de holocelulose.....	35
2.7. Alfacelulose.....	40
2.7.1. Determinação de alfacelulose.....	42
Referências Bibliográficas.....	47

Procedimentos para Análise Lignocelulósica

João Paulo Saraiva Morais

Morsyleide de Freitas Rosa

José Manoel Marconcini

1. Introdução

Materiais lignocelulósicos são renováveis, geralmente subutilizados e disponíveis abundantemente em várias matérias-primas. Esses materiais podem ser obtidos a custos relativamente baixos, de uma grande variedade de recursos, como resíduos agroflorestais e resíduos urbanos (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

A partir desses materiais, pode-se, por exemplo, extrair adesivos e produzir: compostos aromáticos leves e combustível sólido sem enxofre, a partir da lignina; gomas vegetais para a produção de espessantes, adesivos, emulsificantes, estabilizantes e outros produtos químicos, como precursores de polímeros, a partir da hemicelulose; ácido levulínico, um precursor de solventes, lubrificantes, entre outros produtos químicos; e glicose, com todos os seus derivados (etanol, ácidos orgânicos e solventes orgânicos), a partir da celulose (KAMM; KAMM, 2004). Além disso, da celulose, também podem ser extraídos nanocristais, utilizáveis no preparo de compósitos, como plásticos, filmes, membranas e implantes médicos (HUBBE et al., 2008); no preparo de géis e espumas (BLAKER et al., 2009; PÄÄKÖ et al., 2008); e no reforço de papéis e derivados (AKZO-NOBEL, 2008; HENRIKSSON et al., 2008). Podem, também, até mesmo ser engenheirados na indústria têxtil, no preparo

de tecidos que permitem uma maior facilidade de transpiração (MÄNNER et al., 2004). Além de permitir esses usos, o conhecimento dos teores lignocelulósicos é importante para a predição de digestibilidade de forragens usadas na alimentação animal, principalmente de ruminantes (JUNG, 1997), e para a resistência de madeiras à biodegradabilidade (AHMAD, 2007).

Com base em todas as aplicações desses compostos, torna-se necessário o uso de uma metodologia que permita a determinação dos seus teores, nas matérias-primas em estudo. O objetivo desta publicação é divulgar uma metodologia empregada por Unidades do Sistema Embrapa, adaptável a vários produtos agroindustriais, para a determinação de componentes lignocelulósicos, e apresentar uma forma ágil de tratamento dos dados.

2. Procedimentos

2.1. Preparo da amostra

As amostras devem ser homogeneizadas em um moinho de facas de Wiley, usando-se, sempre que possível, a malha com o menor diâmetro de abertura de poro. Deve-se tomar cuidado para que o material não embole dentro do moinho, nem que ocorra um aquecimento excessivo por atrito, que possa danificar o equipamento e as fibras a serem analisadas.

2.2. Umidade

A umidade é representada como o teor de água presente na amostra. As formas mais comuns de determinação envolvem o aquecimento da amostra em forno, por um tempo suficiente para ocorrer a total evaporação. Medindo-se a massa da amostra antes e depois da secagem, pode-se determinar o teor percentual de água na amostra, ou seja, a umidade.

Há várias metodologias para essa determinação. Algumas envolvem o uso de fornos elétricos, com ou sem circulação de ar (TAPPI, 2009; THIEX, 2002), ou de fornos caseiros de micro-ondas (SOUZA; NOGUEIRA; RASSINI, 2002).

Em um estudo elaborado pela AOAC, verificou-se que, para análises de alfafa e de centeio, o tempo de três horas em estufa foi considerado adequado (THIEX, 2002). Apesar de o tempo de permanência na estufa variar para cada material, esse tempo pode ser utilizado como um tempo inicial para medidas, e que deverá ser ajustado para cada caso, até a obtenção de uma massa constante.

Quando a diferença da massa do conjunto entre duas pesagens consecutivas for menor do que 0,1% da massa do material (TAPPI, 2002a), pode-se considerar que não há mais umidade, e que as variações de massa são devidas a erros experimentais, ou seja, o material atingiu a massa constante. Para uma amostra de 2,0000 g, em uma balança analítica, esse valor representaria uma oscilação de 0,0020 g. Há referências, como a Farmacopeia Brasileira (1988), que consideram como massa constante a oscilação menor do que 0,1% para alguns materiais (1,0 mg para cada g de amostra) e 0,05% para outros materiais (0,5 mg para cada g de amostra).

2.2.1. Determinação do teor de umidade

O recipiente no qual a massa será medida pode ser um cadinho de porcelana ou de metal, uma placa de Petri, ou outro recipiente inerte, sem tendência a absorver umidade e com resistência a temperaturas acima de 100 °C. Esse recipiente deve ser lavado e seco na estufa. Após a secagem, a partir desse ponto da metodologia, todas as vezes em que o recipiente for manuseado, isso deve ser feito com uma pinça metálica, para evitar o transporte de umidade e de gordura da mão do operador para o recipiente. A seguir, deve ser mantido em dessecador com sílica gel, cloreto de cálcio anidro, alumina anidra ou outro agente dessecante, por pelo menos 30 minutos, para garantir o resfriamento até a temperatura ambiente. Deve-se, então, proceder à medida e à

anotação da massa do recipiente. A balança a ser empregada deve, preferencialmente, ter precisão de 0,1 mg.

O material vegetal a ser analisado deve ser pesado no recipiente, em uma quantidade de aproximadamente 2,0000 g. Deve-se anotar a medida da massa com o máximo de algarismos possível que o aparelho possa indicar.

A seguir, o conjunto material-recipiente deve ser levado à estufa (forno elétrico) ou ao forno de micro-ondas. Se for para a estufa, o conjunto deve permanecer a 105 ± 2 °C, por pelo menos três horas.

Após a permanência na estufa, o conjunto deve ser retirado e posto em um dessecador com agente dessecante (sílica gel, cloreto de cálcio anidro ou outro) para resfriar à temperatura ambiente por, pelo menos, meia hora. Findo esse tempo, o conjunto deve ser pesado, a massa deve ser rapidamente anotada, e o conjunto deve retornar ao dessecador. Para aumentar a precisão e a exatidão da análise, o conjunto deve retornar para a estufa por mais meia hora, no mínimo, e o procedimento de resfriamento-pesagem deve ser repetido até a obtenção de uma massa constante.

Na análise de umidade, usando-se um forno de micro-ondas devidamente calibrado (SOUZA; NOGUEIRA; RASSINI, 2002), deve-se verificar a massa de um béquer de 250 mL, adicionar uma massa aproximada de 20 g da amostra vegetal, e proceder à secagem em forno de micro-ondas com a seguinte rampa de aquecimento: por 3 minutos, a 20% da potência máxima; por 6 minutos, a 100%; e por 5 minutos, a 50%. A potência máxima real é conhecida após o estabelecimento de uma equação da reta, com os valores de calibração. Após a secagem, o frasco deve ser retirado do forno, deve-se esperar que esfrie em um dessecador, e deve ser verificada a massa do conjunto amostra/frasco.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra úmida (MAU), da massa do conjunto recipiente/amostra úmida (MRAU) e da massa do conjunto recipiente/amostra seca (MRAS), é possível o cálculo da massa da amostra seca (AS) e, conseqüentemente, a determinação do teor de umidade (TU%) em percentagem, de acordo com a equação a seguir:

Eq. 1:

$$\frac{(MRAU - MRAS) \times 100\%}{MAU} = TU\%$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E	F	G
1	Número do cadinho	Massa do recipiente (MR) (g)	Massa da amostra úmida (MAU) (g)	Massa do conjunto recipiente/amostra úmida (MRAU) (g)	Massa do conjunto recipiente/amostra seca (MRAS) (g)	Massa da umidade perdida (g)	
2	1	40,0849	2,0034	42,0883	41,8767	0,2116	
3	2	45,0359	2,1082	47,1441	46,9243	0,2198	
4	3	43,1288	2,0872	45,2160	44,9948	0,2212	
5	4	40,0302	2,1118	42,1420	41,9262	0,2158	
6	5	41,0503	2,0774	43,1277	42,9111	0,2166	
7							
8	Número do cadinho	Teor de umidade (TU%)					
9	1	10,56					
10	2	10,43					
11	3	10,60					
12	4	10,22					
13	5	10,43					
14							

Fig. 1. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para a determinação do teor de umidade.

Nesse exemplo, as massas MR e MAU são determinadas diretamente na balança, e é permitido o cálculo de MRAU ao digitar, na célula D2, a fórmula “=B2 + C2”. Após a secagem, pode-se determinar, também diretamente na balança, a massa de MRAS e, na célula F2, pode-se digitar a fórmula “=D2-F2”, para a obtenção da massa de umidade perdida. A seguir, na célula B9, obtém-se o teor de umidade percentual por meio da fórmula “=(F2 * 100)/C2”. As fórmulas devem ser digitadas na tabela sem as aspas.

Com base nos valores de teor de umidade obtidos, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C
1	Número do cadinho	Teor de umidade (TU%)	
2	1	10,56	
3	2	10,43	
4	3	10,6	
5	4	10,22	
6	5	10,43	
7			
8	Repetições	5	
9	Média	10,45	
10	Desvio-Padrão	0,15	
11	C.V.	1,43	
12	Erro-padrão	0,07	
13	Coefficiente de confiança (95%)	2,78	
14	Limite mínimo	10,36	
15	Média	10,45	
16	Limite máximo	10,49	
17			

Fig. 2. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação do teor de umidade.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc®, da suíte de aplicativos BrOffice®, utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B6)” na célula B8, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B6)” na célula B9, para o cálculo da média; “=DESVPAD(B2:B6)” na célula B10, para o cálculo do desvio-padrão; “=B10*100/B9” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; “=B10/RAIZ(B8)” na célula B12, para o cálculo do erro-padrão; e “=INVT(0,05;4)” na célula B13, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 4 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número dos graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Com base nessa análise, pode-se estimar um intervalo de confiança, somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas “=B9-B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B14, para o limite inferior, e “=B9+B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B16, para o limite superior. A média apresentada na célula B15 é apenas a repetição do valor presente em B9, por meio da fórmula “=B9”.

Após a tabela ter sido elaborada, ela pode ser salva com nomes diferentes, e reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

2.3. Cinzas

As cinzas, em amostras vegetais, representam basicamente os minerais presentes na amostra, apesar de também poderem consistir em resíduos de produtos usados durante o preparo da amostra, em materiais metálicos com os quais ela entrou em contato, nos minerais da própria amostra, ou em substâncias adicionadas propositalmente, o que permite, por exemplo, o uso do seu teor como uma predição para a contaminação com areia ou solo (RAO; XIANG, 2009; STUTH; JAMA; TOLLESON, 2003; TAPPI, 2002b).

O teor de cinzas pode ser determinado pela ignição do material orgânico, o que promove a formação de gases (RAO; XIANG, 2009) e a consequente eliminação de carbono, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e enxofre da amostra, permanecendo apenas os minerais como, por exemplo, sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, zinco e outros.

Na determinação de cinzas totais, em uma ração animal, Thiex (2002) recomenda o uso de uma ignição em mufla a 600 °C, por duas horas, com uma rampa suave de aquecimento desde a temperatura ambiente até esse ponto, apesar de não sugerir uma velocidade de rampa. Já o

método TAPPI T211 om-02 (2002) recomenda que, para celulose, papel e papelão, os cadinhos sejam condicionados a 525 ± 25 °C por 30 a 60 minutos, e então resfriados e mantidos em dessecador com sílica gel, cloreto de cálcio anidro, alumina anidra ou outro agente dessecante, devendo-se aumentar a temperatura suavemente até essa mesma temperatura, sem geração de chama, porém, não define em detalhes como se deve proceder a esse aquecimento suave. A Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2005), para a análise de ervas medicinais, recomenda o uso de aquecimento brando até 575 °C e a manutenção dessa temperatura até a obtenção de cinzas brancas e de um peso constante. Já a Farmacopeia Brasileira preconiza também, para materiais vegetais, uma metodologia similar à chinesa, mas a 600 °C. Por fim, Hojo et al. (2008) utilizaram uma mufla a 600 °C por três horas, para a determinação de cinzas em um bagaço de cana-de-açúcar.

Em materiais com grande teor de cálcio, no qual uma parte do carbono pode ficar capturada, na forma de carbonato de cálcio, recomenda-se manter as cinzas a 900 ± 25 °C por 30 a 60 minutos, para a determinação de óxidos de silício ou titânio (TAPPI, 1993). Na determinação de cinzas insolúveis em ácido, Rao e Xiang (2009) e Leão et al. (2008) sugerem o seguinte procedimento: adicionar 10 mL – 20 mL de ácido clorídrico diluído às cinzas, com grande cuidado; cobrir o cadinho com um vidro de relógio, e levar o conjunto a banho-maria por 10 minutos ou levar a chapa aquecedora até a ebulição por 5 minutos, ao final dos quais o vidro de relógio deve ser enxaguado com 5 mL de água quente e adicionado ao cadinho; filtrar o seu conteúdo em papel de filtro qualitativo (sem cinzas), e lavar o precipitado que permaneceu no filtro até não haver mais reação para a presença de cloretos no filtrado; e recolocar o papel de filtro no cadinho original e repetir a operação de ignição a 575 °C. Com esse protocolo de cinzas insolúveis em ácido, obtém-se a fração mineral inerte e indisponível aos animais, composta principalmente de silicatos (LEÃO et al., 2008).

A massa das amostras analisadas por meio de métodos de calcinação em mufla varia de pelo menos 1,0 g (TAPPI, 2002b) até 5,0 g (HOJO et al., 2008).

Visando a redução do tempo gasto e o aumento da precisão dos resultados, há várias pesquisas que propõem a substituição da determinação de minerais, feita por meio de meios gravimétricos, por métodos espectrofotométricos, como o infravermelho próximo (NIR) ou termoanalíticos mais sofisticados, como o TG/DTG (ARAÚJO et al., 2006; HOJO et al., 2008; RAO; XIANG, 2009; STUTH; JAMA; TOLLESON, 2003). A vantagem desses métodos é que é possível realizar a determinação simultânea de umidade e de cinzas, com um conteúdo menor de amostras, em menos tempo e com a dispensa de pré-tratamentos.

2.3.1. Determinação do teor percentual de cinzas

Embora cada material tenha um comportamento distinto de outros, sugerimos, neste documento, como uma metodologia inicial para as análises de cinzas totais em forno mufla, que se empregue de 1,5000 g a 2,0000 g de material vegetal, úmido ou seco. Esse material deve ser adicionado a cadinhos previamente calcinados a 600 °C por 30 minutos, e resfriados em dessecador. É importante lembrar que, após o condicionamento inicial dos cadinhos, eles só deverão ser manipulados, a partir desse ponto, com pinças metálicas, para prevenir uma contaminação com sujidades provenientes do operador. O conjunto deve ser colocado em um forno mufla à temperatura ambiente, e deve-se utilizar uma rampa de aquecimento de aproximadamente 9,6 °C/min, para que a temperatura de trabalho de 600 °C seja atingida após 60 minutos de aquecimento. Essa temperatura deve ser mantida por três horas, e, ao final desse tempo, deve decair para 200 °C em no mínimo uma hora. Quando a mufla atingir esse ponto, deve-se remover o conjunto cadinho-amostra calcinada e colocá-lo em um dessecador que contenha algum agente dessecante por pelo menos 30 minutos, antes de proceder à medida da massa de cinzas.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra (MA) e da massa do conjunto recipiente/amostra calcinada (MRAC), é possível o cálculo da determinação do teor de cinzas totais (TC%) em percentagem, de acordo com a equação a seguir:

Eq. 2:

$$\frac{MRAC - MR}{MA} \times 100\% = TC\%$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E
1	Número do cadinho	Massa do recipiente (MR) (g)	Massa da amostra (MA) (g)	Massa do conjunto recipiente/amostra calcinada (MRAC) (g)	
2	1	40,087	1,637	40,131	
3	2	45,049	1,547	45,092	
4	3	43,142	1,507	43,181	
5	4	40,036	1,532	40,073	
6	5	41,079	1,594	41,119	
7					
8	Número do cadinho	Teor de cinzas (TC%)			
9	1	2,73			
10	2	2,75			
11	3	2,57			
12	4	2,38			
13	5	2,50			
14					

Fig. 3. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para determinação de teor de cinzas.

Nesse exemplo, as massas MR, MA e MRAC são determinadas diretamente na balança. Na célula B9, pode-se digitar diretamente a fórmula “=((D2-B2)/C2)*100”, sem as aspas. Com base nos valores de teor de cinzas obtidos, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C
1	Número do cadinho	Teor de cinzas (TC%)	
2		1	2,73
3		2	2,75
4		3	2,57
5		4	2,38
6		5	2,50
7			
8	Repetições		5
9	Média		2,59
10	Desvio-padrão		0,16
11	C.V.		6,03
12	Erro-padrão		0,07
13	Coefficiente de confiança (95%)		2,78
14	Limite mínimo		2,50
15	Média		2,59
16	Limite máximo		2,67
17			

Fig. 4. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação do teor de cinzas.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc[®], da suíte de aplicativos BrOffice[®], utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B6)” na célula B8, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B6)” na célula B9, para o cálculo da média; “=DESVPAD(B2:B6)” na célula B10, para o cálculo do desvio-padrão; “=B10*100/B9” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; “=B10/RAIZ(B8)” na célula B12, para o cálculo do erro-padrão; e “=INVT(0,05;4)” na célula B13, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 4 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número de graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Com base nessa análise, pode-se estimar um intervalo de confiança, somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas “=B9-B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B14, para o limite inferior, e “=B9+B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B16, para o limite superior. A média apresentada na célula B15 é apenas a repetição do valor presente em B9, por meio da fórmula “=B9”.

Após a tabela ter sido elaborada, ela poderá ser salva com nomes diferentes, e ser reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a única alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

2.4. Extrativos

Os extrativos são definidos como compostos que podem ser extraídos de materiais lignocelulósicos, tanto por solventes polares quanto por apolares, que não são componentes estruturais da parede celular. Nessa categoria, incluem-se vários compostos de baixa ou de média massa molecular, incluindo uma grande variedade de moléculas, como: alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água); ácidos ou ésteres graxos; álcoois de cadeia longa; ceras; resinas; esteroides; e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (PINO et al., 2007; SILVÉRIO et al., 2006; TAPPI, 1997).

Os extrativos podem variar quantitativa ou qualitativamente, oscilando, em materiais provenientes de madeiras, de 2% a 5%, podendo alcançar níveis de 15% em algumas espécies tropicais (MIYAUCHI; MORI; ITO, 2005; ZHANG et al., 2007). Suas principais funções fisiológicas incluem o acúmulo de nutrientes, e a preservação da madeira contra ataques de bactérias, fungos e cupins, e contra a formação de cor e de aromas (PINO et al., 2007; SUN; SUN, 2001; ZHANG et al., 2007).

No processo de extração de celulose, principalmente para a produção de papel, os extrativos podem gerar uma série de problemas, acumulando-se no maquinário, em depósitos denominados de “pitch” (SILVÉRIO et al., 2006; ZHANG et al., 2007). Além disso, se lançados no meio ambiente, podem causar problemas hormonais e hematológicos em peixes e em crustáceos, mesmo em baixas concentrações (CHRISTIANSON-HEISKA et al., 2008; KAMAYA; TOKITA; SUZUKI, 2005; LEIVISKÄ; RÄMÖ, 2008).

Como os extrativos representam uma classe muito ampla de moléculas, nenhum solvente orgânico sozinho é capaz de extrair todas essas substâncias, e diferentes solventes removem diferentes combinações (TAPPI, 1997). A norma preconizada pela TAPPI recomenda a extração em Soxhlet por diclorometano, ou a mistura 1:2 (v/v) de etanol:benzeno, para a determinação dos extrativos. No entanto, como o etanol e o benzeno são solventes voláteis e inflamáveis, e o benzeno é particularmente tóxico (TAPPI, 1997), vários autores empregam outros solventes e misturas para essa determinação, como: acetona 70% – 7:3 (v/v) de acetona:água – (TAYLOR et al., 2007); acetona pura ou tolueno:etanol 2:1 (v/v) (SILVÉRIO et al., 2006); acetona pura (ZHANG et al., 2007); metil-terbutil éter (LEIVISKÄ; RÄMÖ, 2008); ou HCl-etanol 3:100 (v/v) (MIYAUCHI; MORI; ITO, 2005), entre outros exemplos.

Cada material a ser analisado terá uma composição de extrativos diferente, devendo-se otimizar o processo para cada caso. A seguir, descrevemos uma metodologia que pode ser usada como um início, a partir da qual serão realizadas otimizações.

2.4.1. Determinação do teor de extrativos

É importante, desde o início do experimento, usar EPIs e calçar luvas, tanto para evitar danos ao operador, causados por respingos ou por derramamento acidental dos reagentes, quanto para reduzir o erro causado pelas sujidades presentes nas mãos.

Em uma aparelhagem limpa e desengordurada para extração por Soxhlet, deve-se colocar um cartucho com pelo menos 4,0000 g de maté-

ria vegetal seca. Pode-se colocar um chumaço de algodão, uma tela metálica com pequeno diâmetro de poros, ou um disco de vidro sinterizado sobre a abertura do cone, para evitar extravasamento de material durante a extração. Ao balão de vidro, deve-se adicionar 150 mL do solvente, ou da mistura de solventes a ser trabalhada, e conectar o extrator. O conjunto balão-extrator deve ser colocado em uma manta aquecedora e conectado ao condensador. Deve-se ajustar o número de refluxos para que ocorram não menos do que 24 refluxos no período de quatro a cinco horas de extração.

Após esse tempo, o balão com solvente e extrativos deve ser removido, e o solvente deve ser recuperado até que o volume final no balão fique de 20 mL a 25 mL. O extrato deve ser transferido para um recipiente de pesagem, previamente limpo, seco e com a massa determinada, utilizando-se pequenos volumes do solvente fresco para que não haja perdas, e sempre manuseando o recipiente com pinças, para evitar contaminações a partir do operador.

O recipiente deve ser posto em uma estufa a 105 ± 2 °C por uma hora exatamente, já que não é possível que o material atinja um peso constante, por causa da volatilidade ou de mudanças químicas que podem ocorrer nesse extrato. Após esse tempo, deve-se remover o material da estufa para um dessecador, onde deve permanecer por pelo menos 30 minutos, até resfriar à temperatura ambiente, e deve-se medir a massa final.

Deve-se executar uma análise similar, utilizando-se somente o solvente, sem material vegetal, para calcular quanto da massa final é devido a contaminantes do solvente. O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número de análises possível, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com o conhecimento dos valores da massa do recipiente (MR), da massa da amostra (MA), da massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) e da massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS),

é possível o cálculo da determinação do teor de extrativos (TE%) em percentagem, de acordo com a equação a seguir:

Eq. 3:

$$\frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100\% = TE\%$$

É importante lembrar que esses dados vão se referir à massa da amostra seca. Ou seja, é necessário realizar mais um cálculo, a fim de corrigir os valores que deverão constar na tabela de análise centesimal do material original, de acordo com a equação a seguir:

Eq. 4:

$$\frac{TE\% \times (100 - TU\%)}{100} = TE\% \text{ corrigido}$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E	F
1	Número do recipiente	Massa do recipiente (MR) (g)	Massa da amostra (MA) (g)	Massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) (g)	Massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS) (g)	
2	1	40,0536	1,0245	40,1030	40,0537	
3	2	39,7840	1,0560	39,8354	39,7842	
4	3	41,1398	1,0078	41,1892	41,1399	
5	4	43,1009	1,1195	43,1551	43,1011	
6	5	37,0762	1,0741	37,1288	37,0763	
7						
8	Número do recipiente	Teor de extrativos (TE%)	Teor de extrativos corrigido (TEC%)			
9	1	4,81	4,40			
10	2	4,85	4,44			
11	3	4,89	4,48			
12	4	4,82	4,41			
13	5	4,89	4,47			
14						
15	Teor de umidade (%)	8,52				
16						

Fig. 5. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para a determinação do teor de extrativos.

Nesse exemplo, as massas MR, MA, MRE e MRRS são determinadas diretamente na balança. Na célula B9, pode-se digitar diretamente a fórmula “=(D2-E2)*100/C2”, sem as aspas. Conhecendo-se o teor de umidade (B15), é possível corrigir os valores calculados para a amostra original, por meio da fórmula “=B9*(100-B15)/100” em C9, sem as aspas.

O solvente reaproveitado pode ser destilado e reutilizado para futuros ensaios. O resíduo de extrativos pode ser utilizado, posteriormente, para a determinação dos compostos presentes, por meio de técnicas espectrométricas, espectrofotométricas ou cromatográficas. Caso não seja de interesse fazer essa determinação das moléculas extraídas, este deve ser reunido em um recipiente adequado, identificado e armazenado para uma posterior incineração.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com base nos valores do teor de extrativos obtido, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C
1	Número do cadinho	Teor de cinzas (TC%)	
2	1	4,40	
3	2	4,44	
4	3	4,48	
5	4	4,41	
6	5	4,47	
7			
8	Repetições	5	
9	Média	4,44	
10	Desvio-padrão	0,03	
11	C.V.	0,75	
12	Erro-padrão	0,01	
13	Coefficiente de confiança (95%)	2,78	
14	Limite mínimo	4,42	
15	Média	4,44	
16	Limite máximo	4,46	

Fig. 6. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação do teor de extrativos.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc®, da suíte de aplicativos BrOffice®, utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B6)” na célula B8, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B6)” na célula B9, para o cálculo da média; “=DESVPAD(B2:B6)” na célula B10, para o cálculo do desvio-padrão; “=B10*100/B9” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; “=B10/RAIZ(B8)” na célula B12, para o cálculo do erro-padrão; e “=INVT(0,05;4)” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 4 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número de graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Assim, pode-se estimar um intervalo de confiança, somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas “=B9-B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B14, para o limite inferior, e “=B9 + B13*(B12/RAIZ(B8))” na célula B16, para o limite superior. A média apresentada na célula B15 é apenas a repetição do valor presente em B9, por meio da fórmula “=B9”.

Após a tabela ter sido elaborada, ela poderá ser salva com nomes diferentes, e ser reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a única alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

2.5. Lignina

A lignina é a substância aromática mais abundante na biosfera, e um dos maiores constituintes dos vegetais (LI; YUAN; YANG, 2009a).

Ela está presente na parede celular, conferindo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo (PEREZ et al., 2002). Estruturalmente, a lignina é uma molécula extremamente complexa, construída a partir de unidades de fenilpropano, em uma estrutura tridimensional, e sintetizada a partir de reações enzimáticas que envolvem radicais livres sobre os álcoois coniferílico, cumarílico e sinapílico. Esses três álcoois reagem entre si, formando duas ligações de éter para cada ligação carbono-carbono na lignina (FANG et al., 2008; PEREZ et al., 2002; TAHERZADEH; KARI-MI, 2007).

É importante o conhecimento sobre os teores de lignina de uma amostra vegetal, para a determinação da sua digestibilidade como forragem e da facilidade de extração de celulose a partir da matéria vegetal, e para a avaliação do uso do material em uma biorrefinaria, a qual, por exemplo, pode fornecer gasolina, metanol, gasogênio e outros produtos (HATFIELD et al., 2007; KAMM; KAMM, 2004; KENEALY et al., 2007; SANTOS; SILVA; QUEIROZ FILHO, 2001).

Hatfield e Fukushima (2005) afirmam que, mesmo após mais de 50 anos de estudos, e após a definição e a aprovação de vários procedimentos para determinar lignina em plantas, ainda não há um método definitivo e sem ambiguidades para essa determinação. Entre os métodos revisados, há métodos não invasivos, como NIR e RMN; métodos indiretos, em que um agente oxidante, como cloro ou permanganato, destrói a lignina, e, por meio do cálculo da diferença em relação à massa inicial, determina-se seu teor; métodos de solubilização de lignina, em que se usa tioglicolato ou acetilbrometo para dissolver a lignina e medir sua concentração em espectrofotômetro; e o método direto de determinação, conhecido como lignina de Klason, no qual se emprega uma solução diluída de ácido sulfúrico para dissolver todos os carboidratos, permanecendo somente a lignina, insolúvel, que é filtrada, e é verificada sua massa.

Uma pequena porção da lignina pode se solubilizar na solução ácida durante a determinação da lignina de Klason. Por esse motivo, costuma-

-se recolher uma alíquota do filtrado ácido dessa determinação, para a verificação, em espectrofotômetro, do teor de lignina solúvel. Há várias referências sobre o comprimento de onda no qual a alíquota deve ser lida, variando desde 200 nm (HATFIELD; FUKUSHIMA, 2005) até 320 nm (SLUITER et al., 2008), bem como várias formas de realizar os cálculos com base na absorbância. Para cada material, com diferentes tipos de lignina, deve ser determinado o método mais adequado, com base em experimentos.

2.5.1. Determinação de lignina

É importante, desde o início do experimento, usar EPIs e calçar luvas, tanto para evitar danos ao operador, causados por respingos ou por derramamento acidental dos reagentes, quanto para reduzir o erro causado pelas sujidades presentes nas mãos.

Na determinação de lignina de Klason, segundo a norma TAPPI T 222 om-22 (2002c), com modificações, utiliza-se cerca de 1,0000 g de amostra moída, sem umidade nem extrativos. Esse material deve ser colocado em um almofariz no qual caibam pelo menos 300 mL, e adicionado de 17,0 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m), resfriado em geladeira de 10 °C a 15 °C, antes do uso. Após 15 minutos de agitação vigorosa e cuidadosa com o pistilo, até não haver mais partículas visíveis não solubilizadas, deve-se começar a marcar 24 horas de espera, para o início da próxima etapa.

Entre as duas etapas, deve-se lavar um funil de vidro sinterizado – ASTM tipo C ou 4 –, que tenha uma abertura de poro de 10 μ a 16 μ , e uma capacidade de pelo menos 50 mL, e colocá-lo pelo menos por duas horas em uma estufa a 105 \pm 2 °C. A seguir, o funil deve ser removido com pinças e guardado em um dessecador que contenha algum agente dessecante, até o momento da utilização, no dia seguinte.

Depois de decorrido o tempo de digestão, deve-se adicionar 306 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4%, transferir quantitativamente o conteúdo para um balão de 1.000 mL, em várias porções, levar o balão para uma manta aquecedora ou outra fonte de

calor, conectar um condensador, e manter o material sob aquecimento e refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura. Findo o tempo de refluxo, deve-se desligar o aquecimento e esperar alguns minutos até o balão atingir a temperatura ambiente.

Enquanto isso, deve-se preparar a aparelhagem de filtração. A massa do funil de vidro sinterizado deve ser medida, e o funil deve ser colocado sobre um kitassato de 1.000 mL, usando-se um conector, que pode ser feito cortando-se uma manta de borracha em um círculo um pouco maior do que a abertura superior do frasco, com um espaço interno vazado para colocar o funil. Por fim, deve-se, então, conectar uma bomba de vácuo ao kitassato para iniciar a filtração.

O conteúdo do balão deve ser transferido para o funil, com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do funil. Liga-se a bomba de vácuo, para agilizar o processo.

Na metade da operação, deve-se desligar a bomba e recolher o filtrado. Com essa porção, será realizada a determinação de lignina solúvel. É mais recomendável recolher o filtrado do que uma alíquota do material inicial, para evitar a contaminação com uma parte da lignina insolúvel em suspensão. O material recolhido deve ser mantido em um frasco protegido da luz, e resfriado em uma geladeira até o momento da determinação, para evitar a degradação.

Após a transferência de todo o conteúdo do balão, este deve ser limpo com mais água destilada ou desmineralizada, para que nenhum resquício de lignina insolúvel seja perdido. O precipitado recolhido no funil deve ser enxaguado até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada. Pode-se utilizar um papel indicador ou um medidor de pH para essa verificação.

A seguir, o funil deve ser levado para uma estufa a 105 ± 2 °C e secado até adquirir um peso constante, conforme discutido na determinação de umidade. Apesar das variações que ocorrerão para diferentes materiais, pode-se indicar um tempo de três horas como um parâmetro

inicial para a secagem, e, a partir dele, realizar adaptações de metodologia. Após a secagem, deve-se colocar o conjunto funil-lignina em um dessecador com agente desecante, por pelo menos 30 minutos, para atingir a temperatura ambiente, e medir a massa do funil somada à massa de lignina, em uma balança analítica, com uma precisão de 0,0001 g.

Caso não seja conhecido, ainda, o teor de cinzas, pode-se colocar o funil com a lignina em uma mufla, e proceder-se à determinação de cinzas, conforme descrito anteriormente.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); na massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa (MFL); e na massa do funil com cinzas, após calcinação em mufla (MFC), pode-se calcular o teor de cinzas (TC%) e o teor de lignina insolúvel (TLI%), conforme as fórmulas a seguir:

Eq. 5:

$$\frac{MFC - MF}{MA} \times 100\% = TC\%$$

Eq. 6:

$$\left(\frac{MFL - MF}{MA} \times 100\% \right) - TC\% = TLI\%$$

É importante lembrar que esses dados vão se referir à massa da amostra seca e sem extrativos. Ou seja, é necessário realizar mais um cálculo

lo, a fim de corrigir os valores que deverão constar na tabela de análise centesimal do material original, de acordo com as equações a seguir:

Eq. 7:

$$\frac{TC\% \times [100 - (TE\% + TU\%)]}{100} = TC\% \text{ corrigido}$$

Eq. 8:

$$\frac{TLI\% \times [100 - (TE\% + TU\%)]}{100} = TLI\% \text{ corrigido}$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E	F
1	Número do funil	Massa do funil (MF) (g)	Massa da amostra (MA) (g)	Massa do conjunto funil/lignina (MFL) (g)	Massa do conjunto funil/cinzas (MFC) (g)	
2	1	40,0536	1,0245	40,5145	40,0989	
3	2	39,7840	1,0560	40,2543	39,8301	
4	3	41,1398	1,0078	41,5934	41,1851	
5						
6	Número do funil	Teor de cinzas (TC%)	Teor de lignina insolúvel (TLI%)	Teor de cinzas corrigido (%)	Teor de lignina corrigida (%)	
7	1	4,42	40,57	3,92	35,95	
8	2	4,37	40,17	3,87	35,60	
9	3	4,49	40,52	3,98	35,91	
10						
11	Teor de umidade (%)	6,55				
12	Teor de extrativos (%)	4,83				

Fig. 7. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para a determinação do teor de lignina insolúvel.

Nesse exemplo, as massas MF, MA, MFL e MFC são determinadas diretamente na balança. Na célula B7, pode-se digitar diretamente a fórmula “=(E2-B2)*100/C2” e, na célula C7, a fórmula “=((D2-B2)*100/C2)-B7”, sem as aspas. Conhecendo-se o teor de umidade (B11) e o teor de extrativos (B12), é possível corrigir os valores calculados para a amostra original, com as fórmulas “=(B7*(100-(B11+B12)))/100” em D7 e “=(C7*(100-(B11+B12)))/100” em E7, sem as aspas.

O filtrado ácido deve ser recolhido em um frasco apropriado e tratado com algum agente alcalinizante (hidróxido, carbonato, ou óxido de metal alcalino ou alcalino terroso) para ser neutralizado, antes do descarte final. Deve-se observar que o uso de derivados de cálcio levará à formação de sulfato de cálcio, insolúvel, que deverá ser separado da fase líquida.

Para a determinação da lignina solúvel, sugere-se a utilização do método de Goldschimid (1971), no qual se realiza uma varredura da absorvância de 280 nm a 215 nm. A amostra deve ser diluída com ácido sulfúrico 4% até que a absorvância fique menor do que 1,0.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com base nesses valores, deve-se empregar a seguinte fórmula, na qual CLS representa a concentração de lignina solúvel, em g L⁻¹, A₂₁₅ representa a absorvância a 215 nm, e A₂₈₀ representa a absorvância a 280 nm:

Eq. 9:

$$CLS = \frac{4,53 \times A_{215} - A_{280}}{300}$$

Como a amostra inicial tinha um volume de 323 mL, multiplicando-se a CLS por 0,323 L, é obtida a massa de lignina solúvel (MLS) na amostra seca e sem extrativos. Para a obtenção do teor de lignina solúvel (TLS%) e da correção para a amostra original, usam-se as seguintes equações:

Eq. 10:

$$\left(\frac{MLS}{MA} \right) \times 100 = \text{TLS}\%$$

Eq. 11:

$$\frac{\text{TLS\%} \times [100 - (\text{TE\%} + \text{TU\%})]}{100} = \text{TLS\% corrigido}$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Número da amostra	Absorbância a 215 nm (sem diluição)	Absorbância a 280 nm (sem diluição)	Absorbância a 215 nm (1/3)	Absorbância a 280 nm (1/3)	Concentração de lignina solúvel (g/L)	Massa de lignina solúvel (MLS) (g)	
2	1	1,162	0,810	0,464	0,229	0,0062	0,0060	
3	2	1,085	0,755	0,492	0,243	0,0066	0,0064	
4	3	0,960	0,666	0,483	0,238	0,0065	0,0063	
5								
6	Número da amostra	Massa da amostra (MA) (g)	Teor de lignina solúvel (TLS%)	Teor de lignina corrigido (%)				
7	1	1,0245	0,59	0,52				
8	2	1,0560	0,61	0,54				
9	3	1,0078	0,62	0,55				
10								
11	Teor de umidade (%)	6,55						
12	Teor de extrativos (%)	4,83						
13								

Fig. 8. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para a determinação do teor de lignina solúvel.

Nesse exemplo, foi gerado um espectro que forneceu os valores da absorbância a 215 nm (coluna B, de B2 a B4) e a 280 nm (coluna C, de C2 a C4). Como o valor da absorbância a 215 nm era superior a 1,0, decidiu-se, arbitrariamente, diluir uma parte do extrato com duas partes de ácido sulfúrico 4%, diluindo-se em uma concentração final de 1/3 da inicial. Aplicando-se a fórmula “=(4,53*D2-E2)/300” na célula F2, sem aspas, foi obtida a CLS (em g L⁻¹) para a amostra diluída. Multiplicando-se esse resultado por 0,323 L (volume total do extrato) e por 3 (fator de diluição), por meio da fórmula “=3*F2*0,323”, na célula G2, foi obtida a massa, em gramas, de lignina solúvel na amostra. Utilizando-se esse valor na fórmula “=G2*100/B7”, na célula C7, foi obtido o teor de lignina solúvel (TLS%). Conhecendo-se o teor de umidade (B11) e o teor de extrativos (B12), é possível corrigir o valor calculado para a amostra original, por meio da fórmula “=(C7*(100-(B11 + B12)))/100”, conforme mostrado na célula D7.

Com base nos valores dos teores de lignina obtidos, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C	D
1	Número da amostra	Teor de lignina corrigido (%)	Teor de lignina corrigido (%)	
2	1	35,95	0,52	
3	2	35,6	0,54	
4	3	35,91	0,55	
5				
6	Repetições	3	3	
7	Média	35,82	0,54	
8	Desvio-padrão	0,19	0,02	
9	C.V.	0,54	2,84	
10	Erro-padrão	0,11	0,01	
11	Coefficiente de confiança (95%)	4,3	4,3	
12	Limite mínimo	35,68	0,53	
13	Média	35,82	0,54	
14	Limite máximo	35,96	0,55	
15				

Fig. 9. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação do teor de lignina.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc[®] da suíte de aplicativos BrOffice[®], utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B4)” na célula B6, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B4)” na célula B7, para o cálculo da média; “=DESPAD(B2:B4)” na célula B8, para o cálculo do desvio-padrão; “=B8*100/B7” na célula B9, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; “=B8/RAIZ(B6)” na célula B10, para o cálculo do erro-padrão; e “=INVT(0,05;2)” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 2 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número de graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Com base nessa análise, pode-se estimar um intervalo de confiança,

somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas “=B7-B11*(B10/RAIZ(B6))” na célula B12, para o limite inferior, e “=B7+B11*(B10/RAIZ(B6))” na célula B14, para o limite superior. A média apresentada na célula B13 é apenas a repetição do valor presente em B7, por meio da fórmula “=B7”. As mesmas fórmulas da coluna B, para teor de lignina insolúvel (TLI%), foram utilizadas na coluna C, para teor de lignina solúvel (TLS%), substituindo-se “B” por “C” nas fórmulas.

Após a tabela ter sido elaborada, ela poderá ser salva com nomes diferentes, e ser reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a única alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

2.6. Holocelulose

O termo holocelulose é geralmente usado para designar os carboidratos totais presentes em uma célula vegetal. Ou seja, ela engloba os valores da celulose e dos demais carboidratos, notadamente as pentoses, denominados em conjunto como hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Conhecendo-se os valores de holocelulose e de alfacelulose de um material, pode-se, por meio do cálculo da diferença, determinar o teor de hemicelulose.

Estruturalmente, as hemiceluloses são moléculas planas, que auxiliam na formação de ligações cruzadas entre a celulose e a lignina (AHMAD et al., 2007). Essas moléculas são heteropolissacarídeos, ou seja, são constituídas por vários açúcares, ligados entre si de diferentes formas. Os mais abundantes são os xilanos, polissacarídeos compostos de uma cadeia ramificada de xilose. A principal característica química da hemicelulose é que ela pode ser separada da celulose por meio de extração alcalina de material delignificado (HATFIELD et al., 2007).

Comercialmente, a hemicelulose pode ser uma fonte de carboidratos para a formação de etanol (TAHERZADEH; KARIMI, 2007), espessantes, adesivos, coloides protetores, emulsificantes, estabilizantes, furfural e derivados (KAMM; KAMM, 2004). Além disso, pode ocasionar a melhoria de bebidas como cervejas e sucos, a melhoria da digestibilidade de alimentos para animais, a produção de xilitol, e a produção de precursores para a síntese de polímeros e resinas (SAHA et al., 2003). Para a nutrição animal, o conteúdo de xilanos aumenta o tempo de digestão em ruminantes, por não ser tão prontamente digerível quanto o amido e outros carboidratos.

A principal técnica empregada na determinação da holocelulose consiste na oxidação da lignina em um meio ácido, principalmente a oxidação por cloro, proveniente da reação entre clorito de sódio e ácido acético a quente. Há diversas variações para essa técnica básica, envolvendo diferentes massas da amostra vegetal inicial, concentrações de clorito de sódio e de ácido acético, e tempos de reação (HERBST, 1952; KHERALLAH; ALY, 1989; LOVELL, 1945; SALIM; WAHAB, 2008; YOKOYAMA; KADLA; CHANG, 2002). Neste documento, será apresentado um método que se tem mostrado adequado em fibras vegetais e em forragens não provenientes de madeiras.

2.6.1. Determinação de holocelulose

É importante, desde o início do experimento, usar EPIs e calçar luvas, tanto para evitar danos ao operador, causados por respingos ou por derramamento acidental dos reagentes, quanto para reduzir o erro causado pelas sujidades presentes nas mãos. No caso da utilização de um respirador facial, deve-se verificar se ele está com um filtro para gás cloro e/ou vapores de compostos clorados, como ácido clorídrico e dióxido de cloro.

Inicialmente, devem-se lavar os funis de vidro sinterizado, que serão utilizados nesta determinação tipo ASTM 2 ou M, com abertura de poro de 40 μ a 100 μ e capacidade de pelo menos 150 mL. Após a lavagem, esse funil deve ser colocado para secar por pelo menos duas horas a

105 ± 2 °C. A seguir, o funil deve ser removido com pinças e guardado em um dessecador que contenha algum agente dessecante, até o momento da utilização.

Em um erlenmeyer de 500 mL, adicionam-se cerca de 3,0000 g do material vegetal, sem umidade nem extrativos, e com seu conteúdo de holocelulose a ser determinado. A seguir, adicionam-se 120 mL de água destilada ou deionizada. Em uma capela de exaustão, deve-se preparar um banho-maria ou de glicerina, que mantenha a temperatura constante a 70 ± 2 °C. Ao erlenmeyer, devem ser acrescentados 2,5 g de clorito de sódio (NaClO₂), com pureza aproximada de 80%, e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza ≥ 99,85%. Também se deve acrescentar uma barra magnética para garantir uma agitação constante durante a reação. O conjunto erlenmeyer-reagentes deve ser tampado com um erlenmeyer de 25 mL, mergulhado no banho, aquecido por uma hora, e mantido sobre um agitador magnético ligado. Após esse tempo, deve-se realizar uma nova adição de 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e continuar mantendo a temperatura de 70 ± 2 °C por mais uma hora. Findo esse tempo, adiciona-se, mais uma vez, 2,5 g de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, e prossegue-se com o aquecimento em banho por mais três horas. Ao longo do aquecimento, ocorre a elevação de cloro, como pode ser notado pela formação de um gás amarelo-esverdeado dentro do erlenmeyer.

Durante as cinco horas de aquecimento e degradação oxidativa da lignina, deve-se providenciar gelo e água gelada suficientes para a realização de um banho de gelo, que cubra até além da altura do conteúdo do erlenmeyer. O recipiente deverá permanecer nesse banho de gelo por 30 minutos.

Enquanto isso, deve-se preparar a aparelhagem de filtração, na capela de exaustão. A massa do funil de vidro sinterizado deve ser medida, e o funil deve ser colocado sobre um kitassato de 1.000 mL, usando-se um conector, que pode ser feito cortando-se uma manta de borracha em um círculo um pouco maior do que a abertura superior do frasco, com um espaço interno vazado para colocar o funil. Por fim, deve-se, então, conectar uma bomba de vácuo ao kitassato para iniciar a filtração.

O conteúdo do balão deve ser transferido para o funil, com uma agitação constante para evitar a perda de precipitado no interior do funil. Liga-se a bomba de vácuo, para agilizar o processo. Com água deionizada ou destilada, deve-se lavar o erlenmeyer e transferir o conteúdo para o funil, tanto para não ocorrerem perdas de holocelulose, quanto para lavar o material recolhido. O precipitado recolhido no funil deve ser enxaguado até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada. Pode-se utilizar um papel indicador ou um medidor de pH para essa verificação. Verificando-se a proximidade da neutralidade, deve-se fazer uma lavagem com um pequeno volume, de cerca de 10 mL a 20 mL de acetona ou de metanol, seguida de mais um enxague com bastante água deionizada ou destilada.

O funil, então, deve ser levado para uma estufa a 105 ± 2 °C e secado até adquirir um peso constante, conforme discutido na determinação de umidade. Apesar das variações que ocorrerão para diferentes materiais, pode-se indicar um tempo de 18 horas como um parâmetro inicial para a secagem, e, a partir dele, realizar adaptações de metodologia. Após a secagem, deve-se colocar o conjunto funil-holocelulose em um dessecador com agente desecante, por pelo menos 30 minutos, para atingir a temperatura ambiente, e medir a massa do funil somada à massa de holocelulose, em uma balança analítica, com precisão de 0,0001 g.

O filtrado ácido deve ser recolhido em um frasco apropriado, e tratado com algum agente alcalinizante (hidróxido, carbonato, ou óxido de metal alcalino ou alcalino terroso) para ser neutralizado. Deve-se observar que o uso de derivados de cálcio levará à formação de sulfato de cálcio, insolúvel, que deverá ser separado da fase líquida. O cloro residual pode ser neutralizado, a seguir, por meio da adição de tiosulfato de sódio. A quantidade necessária deve ser calculada com base em uma titulação de uma alíquota do resíduo. Utilizando-se um enxágue com solvente orgânico, o resíduo pode ser destilado, para a separação da fase orgânica, que será concentrada e enviada para a incineração, permitindo o descarte final seguro da fase aquosa.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é impor-

tante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra (MA); e na massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa (MFH), pode-se calcular o teor de holocelulose (TH%), conforme a fórmula a seguir:

Eq. 12:

$$\frac{MFH - MF}{MA} \times 100\% = TH\%$$

É importante lembrar que esses dados vão se referir à massa da amostra seca e sem extrativos. Ou seja, é necessário realizar mais um cálculo, a fim de corrigir os valores que deverão constar na tabela de análise centesimal do material original, conforme a fórmula a seguir:

Eq. 13:

$$\frac{TH\% \times [100 - (TE\% + TU\%)]}{100} = TH\% \text{ corrigido}$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E
1	Número do funil	Massa do funil (MF) (g)	Massa da amostra (MA) (g)	Massa do conjunto funil/holocelulose (MFH) (g)	
2	1	126,1501	3,0022	127,6373	
3	2	139,0884	3,0023	140,6940	
4	3	128,2947	3,0080	129,7993	
5					
6	Número do funil	Teor de holocelulose (TH%)	Teor de holocelulose corrigido (%)		
7	1	49,54	43,90		
8	2	53,48	47,39		
9	3	50,02	44,33		
10					
11	Teor de umidade (%)	6,55			
12	Teor de extrativos (%)	4,83			
13					

Fig. 10. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para a determinação do teor de holocelulose.

Nesse exemplo, as massas MF, MA e MFHL são determinadas diretamente na balança. Na célula B7, pode-se digitar diretamente a fórmula “=(D2-B2)*100/C2”, sem as aspas. Conhecendo-se o teor de umidade (B11) e o teor de extrativos (B12), é possível corrigir os valores calculados para a amostra original, por meio da fórmula “=(B7*(100-(B11 + B12))/100)” em C7, sem as aspas.

Com base nos valores do teor de holocelulose obtido, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C
1	Número da amostra	Teor de holocelulose (TH%)	
2	1	49,54	
3	2	53,48	
4	3	50,02	
5			
6	Repetições	3	
7	Média	51,01	
8	Desvio-padrão	2,15	
9	C.V.	4,22	
10	Erro-padrão	1,24	
11	Coefficiente de confiança (95%)	4,3	
12	Limite mínimo	49,47	
13	Média	51,01	
14	Limite máximo	52,56	
15			

Fig. 11. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação do teor de holocelulose.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc[®] da suíte de aplicativos BrOffice[®], utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B4)” na célula B6, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B4)” na célula B7, para o cálculo da média; “=DESVPAD(B2:B4)” na célula B8, para o cálculo do desvio-padrão;

" = $B8 * 100 / B7$ " na célula B9, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; " = $B8 / \text{RAIZ}(B6)$ " na célula B10, para o cálculo do erro-padrão; e " = $\text{INVT}(0,05;2)$ " na célula B11, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 2 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número de graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Com base nessa análise, pode-se estimar um intervalo de confiança, somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas " = $B7 - B11 * (B10 / \text{RAIZ}(B6))$ " na célula B12, para o limite inferior, e " = $B7 + B11 * (B10 / \text{RAIZ}(B6))$ " na célula B14, para o limite superior. A média apresentada na célula B13 é apenas a repetição do valor presente em B7, por meio da fórmula " = B9". As mesmas fórmulas da coluna B, para teor de lignina insolúvel (TLI%), foram utilizadas na coluna C, para teor de lignina solúvel (TLS%), substituindo-se "B" por "C" nas fórmulas.

Após a tabela ter sido elaborada, ela poderá ser salva com nomes diferentes, e ser reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a única alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

2.7. Alfacelulose

A celulose é o mais abundante composto orgânico e material biorrenovável, com uma longa e bem definida base tecnológica. A produção na biosfera é estimada em mais de 10^{12} t por ano. Nas fibras lignocelulósicas, ela também é o principal componente. Essa molécula é um

polímero linear, constituído de resíduos de glicose, que formam ligações de hidrogênio entre moléculas vizinhas, e tendem a se agrupar na forma de microfibrilas (ASASUTJARIT et al., 2009; HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2009; HATFIELD et al., 2007; LI et al., 2009b; MOXLEY; ZHANG, 2007; SWATLOSKI et al., 2002). A concentração de celulose varia de por volta de 30% em arbustos, a 40% – 50% em arbustos, a 65% – 70% em plantas fibrosas, como linho ou rami, e a mais de 90% em fibras de algodão (IOELOVICH, 2008).

A celulose contribui para a resistência da parede celular das células vegetais. Também é uma fonte de carboidratos para os ruminantes. Na forma de madeira, ela pode ser usada pela indústria moveleira e pela construção civil, além de poder ser usada como combustível sólido. Após a extração industrial, ela pode ser empregada na indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e de manufatura de papéis (KAMM; KAMM, 2004; LI et al., 2009b; FORT et al., 2007). Recentemente, o interesse pela celulose tem sido renovado pela produção de etanol, de solventes e de compostos orgânicos, e pela extração de nanocristais de celulose, para o preparo de compósitos (AHOLA et al., 2007; SUN; CHENG, 2002; TAHERZADE; KARIMI, 2007).

Segundo a definição da norma TAPPI T 203 cm-99 (2009), alfacelulose é a celulose não degradada, betacelulose é a celulose degradada, e gamacelulose é, principalmente, hemicelulose. Experimentalmente, a alfacelulose não se dissolve em uma solução aquosa a 17,5% (m/v) de hidróxido de sódio. Nessa solução, a betacelulose pode ser separada da gamacelulose por meio da acidificação a quente do meio, gerando um precipitado de betacelulose. A diferença básica entre a celulose degradada e a não degradada é o tamanho da molécula e o número de resíduos de glicose presentes, o qual é maior na alfacelulose do que na betacelulose (ZIAIE-SHIRKOLAEI et al., 2007).

A metodologia mais empregada para a determinação do teor de alfacelulose ainda é a determinação da fração de holocelulose que não se dissolve na solução, acima citada, de hidróxido de sódio. Comumente,

em vez de se determinar, também, o valor da betacelulose, para então se calcular o valor da hemicelulose por meio do cálculo da diferença entre os valores de holocelulose, alfacelulose e betacelulose, considera-se apenas a diferença entre os valores de holocelulose e de alfacelulose.

2.7.1. Determinação de alfacelulose

Inicialmente, deve-se lavar um funil de vidro sinterizado – ASTM tipo M ou 2 – que tenha uma abertura de poro de 40 μ a 100 μ , e uma capacidade de pelo menos 50 mL, e colocá-lo pelo menos por duas horas em uma estufa a 105 ± 2 °C. A seguir, o funil deve ser removido com pinças e guardado em um dessecador que contenha algum agente dessecante, por pelo menos 30 minutos, até o momento da utilização. Procede-se, então, à montagem da aparelhagem de filtração. A massa do funil de vidro sinterizado deve ser medida, e o funil deve ser colocado sobre um kitassato de 1.000 mL, usando-se um conector, que pode ser feito cortando-se uma manta de borracha em um círculo um pouco maior do que a abertura superior do frasco, com um espaço interno vazado para colocar o funil. Por fim, conecta-se uma bomba de vácuo ao kitassato, para ser ligada quando iniciar-se a filtração.

Deve-se pesar cerca de 1,0000 g da holocelulose seca obtida, e colocá-la em um almofariz, à temperatura ambiente, em que caibam pelo menos 100 mL. Deve-se adicionar 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5%, aguardar dois minutos de contato entre a solução e a celulose, e, então, começar a triturar o material por oito minutos. Terminado esse tempo, deve-se adicionar 40 mL de água destilada ou deionizada ao almofariz, e transferir o conteúdo, quantitativamente, para o funil.

O conteúdo do almofariz deve ser transferido para o funil com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do instrumental. Lava-se bem o almofariz com mais água destilada ou deionizada, transferindo-se para o funil, e liga-se a bomba de vácuo, para agilizar o processo. O precipitado recolhido no funil deve ser enxaguado até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada. Pode-se utilizar um papel indicador ou um medidor de pH para essa verificação.

O funil, então, deve ser levado para uma estufa a 105 ± 2 °C, e secado até adquirir um peso constante, conforme discutido na determinação de umidade. Apesar das variações que ocorrerão para diferentes materiais, pode-se indicar um tempo de 18 horas como um parâmetro inicial para a secagem, e, a partir dele, realizar adaptações de metodologia. Após a secagem, deve-se colocar o conjunto funil-holocelulose em um dessecador com agente dessecante, por pelo menos 30 minutos, para atingir a temperatura ambiente, e medir a massa do funil somada à massa de alfacelulose, em uma balança analítica, com uma precisão de 0,0001 g.

O resíduo alcalino da filtração deve ser neutralizado por meio de uma solução ácida antes do descarte final. Com essa neutralização, é esperado que ocorra a precipitação de betacelulose, que deverá ser removida da fase aquosa.

O procedimento deve ser feito pelo menos em duplicata, mas é importante sempre tentar realizar o maior número possível de análises, para permitir a redução do desvio-padrão e a eliminação de dados fora da escala, sem sacrifício do rigor estatístico.

Com base na massa do funil limpo e seco (MF); na massa da amostra de holocelulose (MAH); e na massa do funil somada à massa de alfacelulose, após a secagem em estufa (MFA), pode-se calcular o teor de alfacelulose (TA%), conforme a fórmula a seguir:

Eq. 14:

$$\frac{MFA - MF}{MAH} \times 100\% = TA\%$$

Para a obtenção do teor corrigido de alfacelulose ($TA_{\text{corrigido}}$), com base no teor corrigido de holocelulose ($TH_{\text{corrigido}}$), pode-se realizar o cálculo da seguinte fórmula:

Eq. 15:

$$\frac{(TH_{\text{corrigido}} \times TA)}{100} = TA_{\text{corrigido}}$$

E, por meio do cálculo da diferença entre os valores dos dois teores, calcula-se, então, o valor do teor percentual corrigido de hemicelulose ($TH_{\text{eC}_{\text{corrigido}}}$), conforme a fórmula a seguir:

Eq. 16:

$$TH_{\text{corrigido}} - TA_{\text{corrigido}} = TH_{\text{eC}_{\text{corrigido}}}$$

O exemplo a seguir pode ser aplicado em um software de planilha eletrônica, como Microsoft® Excel® ou OpenOffice® Calc®:

	A	B	C	D	E
1	Número da amostra	Massa de holocelulose (MAH) (g)	Massa do funil (MF) (g)	Massa do funil somada à massa de alfacelulose (MFA) (g)	Teor de alfacelulose (%)
2	1	1,0428	66,9322	67,6554	69,35
3	2	1,0562	67,0548	67,7956	70,14
4	3	1,0201	63,7881	64,5228	72,02
5					
6	Número da amostra	Teor de holocelulose corrigido (%)	Teor de alfacelulose corrigido (%)	Teor de hemicelulose corrigido (%)	
7	1	49,54	34,35	15,18	
8	2	53,48	37,51	15,97	
9	3	50,02	36,02	14,00	

Fig. 12. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos para determinação de teores de alfacelulose e hemicelulose.

Nesse exemplo, as massas MAH, MF e MFA são determinadas diretamente na balança. Com isto, é obtido o teor percentual de alfacelulose presente na holocelulose. Como já é conhecido o teor corrigido de holocelulose, na célula B7, pode-se escrever na célula C7 a fórmula “=B7*E2/100”, sem as aspas, para o cálculo do teor corrigido de alfacelulose. Por fim, o teor de hemicelulose, já corrigido para o material inicial, é calculado na célula D7 pela fórmula “=B7-C7”, sem as aspas.

Com base nos valores obtidos, pode-se proceder a algumas análises de estatística descritiva, como mostrado a seguir.

	A	B	C	D	E
1	Número da amostra	Teor de holocelulose corrigido (%)	Teor de alfacelulose corrigido (%)	Teor de hemicelulose corrigido (%)	
2	1	49,54	34,35	15,18	
3	2	53,48	37,51	15,97	
4	3	50,02	36,02	14,00	
5					
6	Repetições	3	3	3	
7	Média	51,01	35,96	15,05	
8	Desvio-padrão	2,15	1,58	0,99	
9	C.V.	4,22	4,39	6,60	
10	Erro-padrão	1,24	0,91	0,57	
11	Coefficiente de confiança (95%)	4,3	4,3	4,3	
12	Limite mínimo	49,47	34,83	14,34	
13	Média	51,01	35,96	15,05	
14	Limite máximo	52,56	37,10	15,76	

Fig. 13. Exemplo de planilha eletrônica com cálculos estatísticos para a determinação dos teores de holocelulose, alfacelulose e hemicelulose.

Com base nos valores obtidos, para o programa Calc[®] da suíte de aplicativos BrOffice[®], utilizaram-se as seguintes fórmulas: “=CONT.VALORES(B2:B4)” na célula B6, para o cálculo do número de repetições; “=MÉDIA(B2:B4)” na célula B7, para o cálculo da média; “=DESVPAD(B2:B4)” na célula B8, para o cálculo do desvio-padrão; “=B8*100/B7” na célula B9, para o cálculo do coeficiente de variação percentual; “=B8/RAIZ(B6)” na célula B10, para o cálculo do erro-padrão; e “=INVT(0,05;2)” na célula B11, para o cálculo do coeficiente de confiança, segundo uma distribuição t de Student com 95% de confiança e 2 graus de liberdade. A escolha do coeficiente de confiança pode depender tanto do formato da distribuição de dados considerada (distribuição normal ou t de Student, por exemplo), como do nível de confiança (0,05 para 95%, e 0,01 para 99%, por exemplo), e do número de graus de liberdade, calculável como o número de amostras menos um.

Com base nessa análise, pode-se estimar um intervalo de confiança, somando-se e subtraindo-se à média o valor do erro-padrão multiplicado pelo valor obtido pela divisão do coeficiente de confiança pela raiz quadrada do número de amostras repetidas, conforme as fórmulas “=B7-B11*(B10/RAIZ(B6))” na célula B12, para o limite inferior, e “=B7+B11*(B10/RAIZ(B6))” na célula B14, para o limite superior. A

média apresentada na célula B13 é apenas a repetição do valor presente em B7, por meio da fórmula “=B9”. As mesmas fórmulas da coluna B foram utilizadas nas colunas C e D, substituindo-se “B” por “C” ou por “D”, respectivamente, nas fórmulas.

Após a tabela ter sido elaborada, ela poderá ser salva com nomes diferentes, e ser reutilizada para diferentes amostras, agilizando o processo de análise dos dados. Convém ressaltar que essa não é a única alternativa para o cálculo desses parâmetros estatísticos, podendo-se, por meio de diferentes manuseios dos teores obtidos, chegar aos mesmos resultados.

Referências Bibliográficas

ACORDIS FIBRES (UK). James martin Gannon; Ian Graveson; Pamela Ann Johnson; Calvin Roger Woodings. **Lyocell fibre and a process for its manufacture**. GB n. 94125002, 28 dez. 1995, 28 mar. 2000.

AHMAD, F.; MCGUIRE, T. M.; LEE, R. S.; BECVAR, E. Considerations for the design of organic mulch permeable reactive barriers. **Remediation Journal**, v. 18, n. 1, p. 59-72, 2007.

AHOLA, S.; MYLLYTIE, P.; ÖSTERBERG, M.; TEERINEN, T.; LAINE, J. Effect of polymer adsorption on cellulose nanofibril water binding capacity and aggregation. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1315-1328, 2008.

AKZO NOBEL N. V. (Arnhem, NL). Ylva Wildlock; Anette Heijnesson-Hultén. **Method of producing a paper product**. EP n. 1 936 032 A1, 18 dez. 2006, 26 jun. 2008.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

ASASUTJARIT, C.; CHAROENVAI, S.; HIRUNLABH, J.; KHEDARI, J. Materials and mechanical properties of pretreated coir-based green composites. **Composites: part B**, v. 40, n.7, p. 633-637, 2009.

BLAKER, J. J.; LEE, K. Y.; LI, X.; MENNER, A.; BISMARCK, A. Renewable nanocomposite polymer foams synthesized from pickering emulsion templates. **Green Chemistry**, v. 11, n. 9, p. 1321-1326, 2009.

CHRISTIANSON-HEISKA, I. L.; HAAVISTO, T.; PARANKO, J.; BERGELIN, E.; ISOMAA, B. Effects of the wood extractives dehydroabietic acid and betulinol on reproductive physiology of zebrafish (*Danio rerio*) - A two-generation study. **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 388-396, 2008.

FANG, Z.; SATO, T.; SMITH JUNIOR., R. L.; INOMATA, H.; ARAI, K.; KOZINSKI, J.A. Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3424-3430, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, 1988.

FORT, D. A.; REMSING, R. C.; SWATLOSKI, R. P.; MOYNA, P.; MOYNA, G.; ROGERS, R. D. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. **Green Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 63-69, 2007.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Microfibrillated cellulose from the peel of prickly pear fruits. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 423-429, 2009.

HATFIELD, R.; FUKUSHIMA, R. S.; Can lignin be accurately measured? **Crop Science**, v. 45, n. 3, p. 832-839, 2005.

HATFIELD, R. D.; JUNG, H. J. G.; BRODERICK, G.; JENKINS, T. C.; Nutritional chemistry of forages. In: BARNES, R. F.; NELSON, C. J.; MOORE, K. J.; COLLINS, M. (Ed.). **The Science of Grassland Agriculture**. 6. ed. Ames: Blackwell, 2007. v. 2. cap. 31, p. 467-485.

HENRIKSSON, M. HENRIKSSON, G.; BERGLUND, L. A.; LINDSTRÖM, T. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3434-3441, 2007.

HENRIKSSON, M.; BERGLUND, L. A.; ISAKSSON, P.; LINDSTRÖM, T.; NISHINO, T. Cellulose nanopaper structures of high toughness. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 6, p. 1579-1585, 2008.

HERBST, J. H. E. The preparation of chlorite holocellulose. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 668-678, 1952.

HOJO, O.; ERNESTO, V. A. R. T.; RIBEIRO, C. A.; FISCARELLI, P.; FERTONANI, F. L. Comparação metodológica entre mufla convencional e automática para análise de umidade e cinzas em bagaço de cana. In: CONGRESSO DA QUALIDADE EM METROLOGIA, 8., 2008, São Paulo. **Anais...** São Paulo: REMESP, 2008, p. 1-6.

HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M. Cellulosic nano-composites: a review. **Bioresources**, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.

IOELOVICH, M. Cellulose as a nanostructured polymer: a short review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1403-1418, 2008.

JUNG, H. J. G. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 810S-813S, 1997.

KAMAYA, Y.; TOKITA, N.; SUZUKI, K. Effects of dehydroabietic acid and abietic acid on survival, reproduction, and growth of the crustacean *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 1, p. 83-88, 2005.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 64, n. 2, p.137-145, 2004.

KENEALY, W. R.; HOUTMAN, C. J.; LAPLAZA, J.; JEFFRIES, T. W.; HORN, E. G. Pretreatments for converting wood into paper and chemicals. In: ARGYROPOULOS, D. S. (Ed.). **Materials, chemicals, and energy from forest biomass**. Washington: Oxford University Press, 2007. cap.25, p. 392-408. (ACS Book Symposium, 954)

KHERALLAH, I. E.; ALY, H. I. Fiber length, specific gravity, and chemical constituents of two tropical hardwood peeler logs. **Journals of King Saud University, Agricultural Sciences**, v. 1, n. 1, p. 103-112, 1989.

LEÃO, V. P. C.; FERREIRA, J. Q.; FIGUEIREDO, M. P.; VIANA, A. E. S.; PEREIRA, L. G. R. Cinza insolúvel em ácido em ensaio de digestibilidade

em ovinos alimentados com cana-de-açúcar e feno da parte aérea da mandioca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 480-487, 2008.

LEIVISKÄ, T.; RÄMÖ, J. Coagulation of wood extractives in chemical pulp bleaching filtrate by cationic polyelectrolytes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, n. 1-2, p. 525-531, 2008.

LI, J.; YUAN, H.; YANG, J. Bacteria and lignin degradation. **Frontiers of Biology in China**, v. 4, n. 1, p. 29-38, 2009a.

LI, R.; FEI, J.; CAI, Y.; LI, Y.; FENG, J.; YAO, J. Cellulose whiskers extracted from mulberry: a novel biomass production. **Carbohydrate Polymers**, v.76, n.1, p.94-99, 2009b.

LOVELL, E. L. Fibrous holocellulose from softwoods. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 1034-1037, 1945.

LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Biocomposites of plasticized starch reinforced with cellulose crystallites from cottonseed linter. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 11, p. 1101-1107, 2005.

MÄNNER, J.; SCHUSTER, K. C.; SUCHOMEL, F.; GÜRTLER, A.; FIRGO, H. Higher performance with natural intelligence. **Lenziger Berichte**, v. 83, p. 99-110, 2004.

MIYAUCHI, T.; MORI, M.; ITO, K. Quantitative determination of benzalkonium chloride in treated wood by solid-phase extraction followed by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1095, n. 1-2, p. 74-80, 2005.

MORÁN, J. I.; ALVAREZ, V. A.; CYRAS, V. P.; VÁZQUEZ, A. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 149-159, 2008.

MOXLEY, G.; ZHANG, Y. H. P. More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3684-3688, 2007.

PÄÄKÖ, M.; VAPAAVUORI, J.; SILVENNOINEN, R.; KOSONEN, H.; ANKERFORS, M.; LINDSTRÖM, T.; BERGLUND, L.A.; IKKALA, O. Long and entangled native cellulose I nanofibers allow flexible aerogels and hierarchically porous templates for functionalities. **Soft Matter**, v. 4, n. 12, p. 2492-2499, 2008.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, RUBIA, T. de la; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 53-63, 2002.

PHARMACOPOEIA OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. Beijing: Chemical Industry Press, v. 1, 2005.

PINO, V.; AYALA, J. H.; GONZÁLEZ, V.; AFONSO, A. M. Determination of the alkyl- and methoxy-phenolic content in wood extractives by micellar solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 505-513, 2007.

RAO, Y.; XIANG, B. Determination of total ash and acid-insoluble ash of chinese herbal medicine *Prunellae Spica* by infrared spectroscopy. **Yakugaku Zasshi**, v. 129, n. 7, p. 881-886, 2009.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SALIM, R.; WAHAB, R. Effect of oil heat treatment on chemical constituents of semantan bamboo (*Gigantochloa scortechinii*) Gamble. **Journal of Sustainable Development**, v. 1, n. 2, p. 91-98, 2008.

SANTOS, E. A.; SILVA, D. S.; QUEIROZ FILHO, J. L. Composição química do capim-elefante cv. Roxo cortado em diferentes alturas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 18-23, 2001.

SILVA, D.J.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel**, v. 70, n. 7, p. 34-52, 2009.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A.; GOMIDE, J. L.; REIS, F. P.; PILÓ-VELOSO, D. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **Revista *Árvore***, v. 30, n. 6, p. 1009-1016, 2006.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, C.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008, 16 p.

SOUZA, G. B.; NOGUEIRA, A. R. A.; RASSINI, J. B. **Determinação de matéria seca e umidade em solos e plantas com forno de microondas doméstico**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2002, 9 p. (Circular Técnica, 33).

STUTH, J.; JAMA, A.; TOLLESON, D. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. **Field Crops Research**, v. 84, n. 1-2, p. 43-56, 2003.

SUN, R. C.; SUN, X. F. Identification and quantitation of lipophilic extractives from wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 14, n. 1, p. 51-64, 2001.

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

SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 18, p. 4974-4975, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresource**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

TAPPI. **T 203 cm-99. Alpha-, beta- and gamma-cellulose in pulp**. 2009, 7 p.

TAPPI. T 204 cm-97. **Solvent extractives of wood and pulp.** 1997, 4 p.

TAPPI. T 211 om-02. **Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C.** 2002b, 5 p.

TAPPI. T 222 om-02. **Acid-insoluble lignin in wood and pulp.** 2002c, 5 p.

TAPPI. T 413 om-93. **Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 900°C.** 1993, 4 p.

TAPPI. T 421 om-02. **Moisture in pulp, paper and paperboard.** 2002a, 3 p.

TAYLOR, A. M.; BROOKS, J. R.; LACHENBRUCH, B.; MORRELL, J. J. Radial patterns of carbon isotopes in the xylem extractives and cellulose of Doulgas-fir. **Tree Physiology**, v. 27, n. 6, p. 921-927, 2007.

THIEX, N. Committee on feeds, fertilizers, and related topics. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 1, p. 270-273, 2002.

YOKOYAMA, T.; KADLA, J. F.; CHANG, H. M. Microanalytical method for the characterization of fiber components and morphology of woody plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 1040-1044, 2002.

ZHANG, X.; NGUYEN, D.; PAICE, M. G.; TSANG, A.; RENAUD, S. Degradation of wood extractives in thermo-mechanical pulp by soybean lipoxygenase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 866-873, 2007.

ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, S.; DING, Y.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 325-327, 2006.

ZIAIE-SHIRKOLAEI, Y.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; CHARANI, P. R.; KHAJEHEIAN, M. B. Study on cellulose degradation during or-

ganosolv delignification of wheat straw and evaluation of pulp properties. **Iranian Polymer Journal**, v. 16, n. 2, p. 83-96, 2007.

ZIMMERMANN, T.; BORDEANU, B.; STRUB, E. Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1086-1093, 2010.



**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 9063