

Método de Fehling adaptado: uma ferramenta para analisar açúcares redutores totais em madeira hidrolisada

Marcelo Lazzarotto¹

Robson Ribeiro Netipany²

Washington Luiz Esteves Magalhães³

A madeira é composta principalmente por polissacarídeos de celulose (de 40% a 60% da biomassa seca) e hemicelulose (de 20% a 40%) e pela lignina (de 10% a 25%), um polímero polifenólico que proporciona a força estrutural para as plantas (HAMELINCK et al., 2005). Tecnologias para produzir biocombustíveis (como etanol, butanol ou vários hidrocarbonetos) e produtos de química verde provenientes de materiais lignocelulósicos são experiências com avanços significativos no esforço para satisfazer as necessidades de energia global e de substâncias químicas. Converter celulose em etanol envolve dois passos principais: quebrar as longas cadeias das moléculas de celulose em açúcares e fermentá-los para etanol.

Para a determinação do potencial de formação de açúcares redutores a partir de amostras de madeira, duas etapas são requeridas: a hidrólise e a quantificação da concentração destes açúcares. A importância da otimização na etapa de hidrólise da madeira busca viabilizar que a celulose e hemicelulose presentes nas paredes celulares sejam

convertidas a açúcares redutores. Nessa fase, os açúcares produzidos no processo de hidrólise podem sofrer reações paralelas, comprometendo a confiabilidade nos resultados de quantificação (CANETTIERI et al., 2007; YU et al., 2008).

As quantificações de açúcares por via úmida podem ser realizadas usando três grandes grupos de medição (CASTRICINI et al., 2010):

i) métodos titulométricos (EDTA e Lane-Eynon, Luff-Schoorl) (LANE; EYNON, 1923; MATISSEK et al., 1998);

ii) métodos gravimétricos (Munson-Walker) (SPENCER; MEADE, 1945);

iii) métodos espectrofotométricos (ADNS, antrona, fenol-sulfúrico, Somogyi-Nelson) (MILLER, 1959; NELSON, 1944; VILLELA et al., 1973).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica mais seletiva e mais sensível. Esta tecnologia possibilita identificar uma variedade maior de carboidratos na amostra (CANO; ALMEIDA-MURADIAN, 1998).

¹Químico, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, marcelo.lazzarotto@embrapa.br

²Graduando em Engenharia Florestal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

³Engenheiro Químico, Doutor, Pesquisador da Embrapa Florestas, washington.magalhaes@embrapa.br

Métodos cromatográficos são caros e complexos. Outras análises simples (como DNS e o método fenol-sulfúrico) usam reagentes tóxicos. Este estudo visou testar o método de Fehling adaptado, tendo em vista que esta metodologia necessita de ajustes para a matriz em questão, avaliando a eficiência do processo de hidrólise da madeira e a formação de açúcares redutores totais. As adaptações ao método de Fehling foram validadas em quatro situações: i) análises de soluções padrão de glicose e xilose; ii) hidrolisados de polpa de celulose; iii) hidrolisados de madeira na forma de serragem; iv) e de madeira microtomizada.

O presente método de Fehling foi adaptado de Meyer e Leygue-Alba (1991). A adaptação da metodologia consistiu em uma redução de escala analítica e um aumento do pH do meio reacional proveniente da hidrólise ácida, antes da reação com a solução cuproalcalina. Esta adaptação visou à aplicação nos estudos de quantificação de açúcares redutores totais provenientes da hidrólise ácida total da madeira. Desta forma, é necessária uma validação da metodologia para verificar se as adaptações podem influenciar nos resultados analíticos, devido à diminuição da amostragem.

Este método consiste em adicionar 5 mL de Fehling A (solução 44,3 g L⁻¹ de sulfato de cobre), 5 mL de Fehling B (solução de 346 g L⁻¹ de tartarato duplo de sódio e potássio e 103 g L⁻¹ de hidróxido de sódio) e a amostra num erlenmeyer de 250 mL, conforme Tabela 1.

Colocar sobre o erlenmeyer um funil de vidro para refrigeração em refluxo, aquecer até a fervura e prolongar por mais dois minutos. Esfriar a solução no mínimo até 15 °C.

Adicionar 1,5 mL de iodeto de potássio (30%), 5 mL de ácido sulfúrico (17%) e lavar as paredes do erlenmeyer com água destilada. Titular com tiosulfato de sódio 0,1 N, utilizando como indicador 1 mL de amido (1%). Verificar a formação de um complexo lilás que torna-se leitoso no momento da viragem e anotar o volume gasto.

O amido deve ser adicionado quando o meio estiver suficientemente pobre em iodo (no final da reação), uma vez que, com o excesso de iodo, forma-se um complexo irreversível que consome iodo e torna a viragem menos nítida.

Para determinar a quantidade de íons de Cu²⁺ existentes na solução cuproalcalina procede-se da mesma forma, substituindo a amostra por água destilada, anotando-se o volume de tiosulfato de sódio gasto (titulação do branco).

Para o cálculo do resultado, o teor de açúcares redutores totais é expresso em g L⁻¹, correspondente à diferença entre o volume gasto com a titulação da amostra e com a titulação do branco, fornecido pela Tabela 2.

Com o intuito de validar a metodologia de análise proposta, foram usadas soluções padrão de glicose nas concentrações de 0,5 g L⁻¹, 1,5 g L⁻¹, 2,5 g L⁻¹, 3,5 g L⁻¹, 5 g L⁻¹, 7 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 45 g L⁻¹ e 90 g L⁻¹ e os açúcares foram quantificados em quadruplicata. Também foram determinadas, em quadruplicata, as concentrações de xilose em soluções de 0,25 g L⁻¹, 0,75 g L⁻¹, 1,25 g L⁻¹, 1,75 g L⁻¹ e 5 g L⁻¹. A escolha da faixa de concentrações da xilose foi devido à relação celulose/hemicelulose presente na madeira.

Para as reações, foram respeitados os volumes e fatores de multiplicação da Tabela 1. Para a determinação do teor de açúcares redutores totais, expresso em g L⁻¹, foi usada a Tabela 2.

Tabela 1. Volumes de amostra e água destilada adicionadas para determinação do açúcar.

Faixa de concentração de açúcares (g L ⁻¹)	Volume de amostra (mL)	Volume de água destilada (mL)	Fator para multiplicação
9,0	5	5	1
18,0	2,5	7,5	2
45,0	1	9	5
90,0	0,5	9,5	10

Fonte: Meyer e Leygue-Alba (1991), com adaptações.

Tabela 2. Correspondência entre o volume de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N e a quantidade de açúcares redutores totais em g L⁻¹.

VOLUME gasto (mL) (n - n')	0,0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,75	0,8	0,85	0,9	0,95
0	0,00	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,27	0,31	0,34	0,38	0,41	0,44	0,48	0,51	0,54	0,58	0,61	0,65	0,68
1	0,72	0,75	0,78	0,81	0,85	0,88	0,92	0,95	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,15	1,19	1,22	1,26	1,29	1,32	1,36
2	1,39	1,43	1,46	1,49	1,53	1,56	1,60	1,63	1,66	1,70	1,73	1,76	1,79	1,83	1,87	1,90	1,93	1,96	2,00	2,03
3	2,06	2,10	2,14	2,17	2,21	2,24	2,27	2,31	2,34	2,37	2,40	2,44	2,48	2,51	2,54	2,57	2,61	2,65	2,68	2,71
4	2,74	2,78	2,81	2,84	2,88	2,91	2,95	2,99	3,02	3,05	3,08	3,12	3,16	3,19	3,23	3,26	3,30	3,34	3,37	3,41
5	3,44	3,47	3,51	3,54	3,58	3,62	3,65	3,69	3,72	3,76	3,80	3,83	3,87	3,90	3,93	3,97	4,00	4,04	4,07	4,11
6	4,15	4,18	4,22	4,25	4,29	4,32	4,35	4,39	4,42	4,46	4,50	4,53	4,57	4,60	4,64	4,68	4,71	4,75	4,78	4,81
7	4,85	4,88	4,92	4,96	4,99	5,03	5,06	5,10	5,14	5,17	5,21	5,25	5,29	5,33	5,36	5,40	5,43	5,47	5,51	5,54
8	5,58	5,61	5,65	5,69	5,72	5,76	5,79	5,83	5,87	5,91	5,95	5,98	6,02	6,06	6,09	6,13	6,16	6,20	6,24	6,27
9	6,31	6,34	6,38	6,42	6,45	6,49	6,53	6,57	6,61	6,64	6,68	6,72	6,75	6,79	6,82	6,86	6,90	6,93	6,97	7,00
10	7,04	7,08	7,11	7,15	7,19	7,23	7,27	7,30	7,34	7,37	7,41	7,45	7,48	7,52	7,56	7,60	7,64	7,68	7,72	7,76
11	7,80	7,84	7,88	7,92	7,95	7,99	8,03	8,07	8,11	8,15	8,19	8,23	8,27	8,31	8,35	8,39	8,43	8,47	8,51	8,55
12	8,59	8,63	8,66	8,70	8,74	8,78	8,82	8,86	8,90	8,94	8,98	9,01	9,05	9,09	9,12	9,16	9,19	9,23	9,27	9,31

n = volume gasto da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N na titulação do branco ; n' = volume gasto da solução de tiosulfato de sódio 0,1N na titulação da amostra. Volume gasto na horizontal corresponde à parte decimal da leitura e na vertical à parte inteira. Fonte: Meyer e Leygue-Alba (1991), com adaptações.

Para a avaliação da eficiência do processo de hidrólise ácida selecionou-se uma amostra de polpa branqueada de celulose de eucalipto. Esta polpa de celulose apresentou umidade de 5,66% ± 0,04% (determinação em triplicata a 100 °C) e teor de cinzas de 0,31% ± 0,03% (determinação em triplicata a 600 °C). Foram analisados os resultados da hidrólise de diferentes massas iniciais de polpa de celulose: aproximadamente 15 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg e 60 mg (base úmida) em 12 mL de solução. As amostras foram pesadas em duplicata em tubos de vidro com tampa de rosca e foi adicionado 1 mL de solução 12 M de H₂SO₄. Esta solução foi colocada a 37 °C, por 1 hora em um DryBlock MA400. Após este período, foram adicionados mais 11 mL de água destilada, e a solução foi mantida por mais 2 h a 100 °C.

A eficiência do processo de hidrólise ácida foi avaliada selecionando-se uma amostra de *Pinus taeda* coletada da área da Embrapa Florestas. Separou-se a amostra em duas sub-amostras, sendo que uma passou pelo processo de moagem e foi utilizada a fração retida entre as peneiras de 42 e 60 mesh, cuja umidade era de 11,07% ± 0,37%. A outra sub-amostra foi microtomizada com espessura de 30 mm e os valores de umidade

foram de 11,48% ± 0,06%. O teor de cinzas de ambas amostras eram de 0,33 % ± 0,03%. Foram analisados os resultados da hidrólise da madeira seca de aproximadamente 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg e 60 mg em 12 mL de solução, em duplicata experimental. O procedimento de hidrólise ácida usado com a amostra de madeira foi igual ao utilizado para a polpa de celulose.

As determinações das concentrações de açúcares redutores totais nas amostras de polpa de celulose e da madeira hidrolisadas foram realizadas usando a metodologia proposta neste trabalho, substituindo a água por uma solução de hidróxido de sódio 2,25 M. As demais etapas da análise foram mantidas.

Em todas as concentrações das soluções de glicose foi possível verificar um baixo coeficiente de variação entre as medidas das quadruplicatas, sendo que o maior valor foi de 9,44% para a solução de 0,5 g L⁻¹.

Quando são consideradas as concentrações de 45 e 90 g L⁻¹, observa-se uma estimativa de concentração de açúcares redutores totais menor do que a real.

Pode-se observar na Figura 1 que ocorreram maiores distorções na quantificação da concentração dos açúcares redutores para as soluções de 45 e 90 g L⁻¹, fato que pode estar associado aos efeitos da diluição. Os resultados de determinação das concentrações na escala de 0,5 a 10 g L⁻¹ mostraram-se melhores.

Na análise das soluções padrão de xilose pode-se observar que os coeficientes de variação nas concentrações de 0,25 g L⁻¹ e 0,75 g L⁻¹ foram 84,4% e 25,2%, respectivamente. Estes altos coeficientes de variação estão associados à precisão do método ser insatisfatória em concentrações muito baixas de açúcares redutores. Em soluções com concentrações muito baixas, é necessário o uso de técnicas analíticas mais sensíveis, como, por exemplo, a cromatografia líquida. A equação da curva mostra que o método permite quantificar xilose e não diferencia este açúcar da glicose (Figura 2).

A polpa de celulose, ao sofrer o processo de hidrólise, incorpora em sua estrutura 18 g mol⁻¹, uma molécula de água que é agregada a cada molécula de glicose produzida (Figura 3).

Visando à quantificação de açúcar produzido, foi adicionada a solução de hidróxido de sódio na solução de polpa de celulose hidrolisada. Isto foi feito para diminuir a acidez da solução, pois a reação de redução do Cu²⁺ ocorre em meio alcalino (proporcionado pelo Fehling B). As demais etapas da análise foram mantidas.

Os resultados de hidrólise em meio ácido da polpa de celulose indicam que este processo proporciona um rendimento médio de 89,0% ± 4,9% em relação ao máximo teórico de açúcares (Tabela 3).

Observa-se na Figura 4, que o método de determinação de açúcares redutores totais com o procedimento de reação de hidrólise ácida é confiável para toda faixa de concentração testada. Isto é confirmado através do coeficiente de determinação R², de 0,9944.

A madeira ao passar pelo processo de hidrólise ácida libera açúcares redutores a partir da celulose (Figura 3) e da hemicelulose (polissacarídeo ramificado de composição heterogênea), reação análoga à da Figura 3.

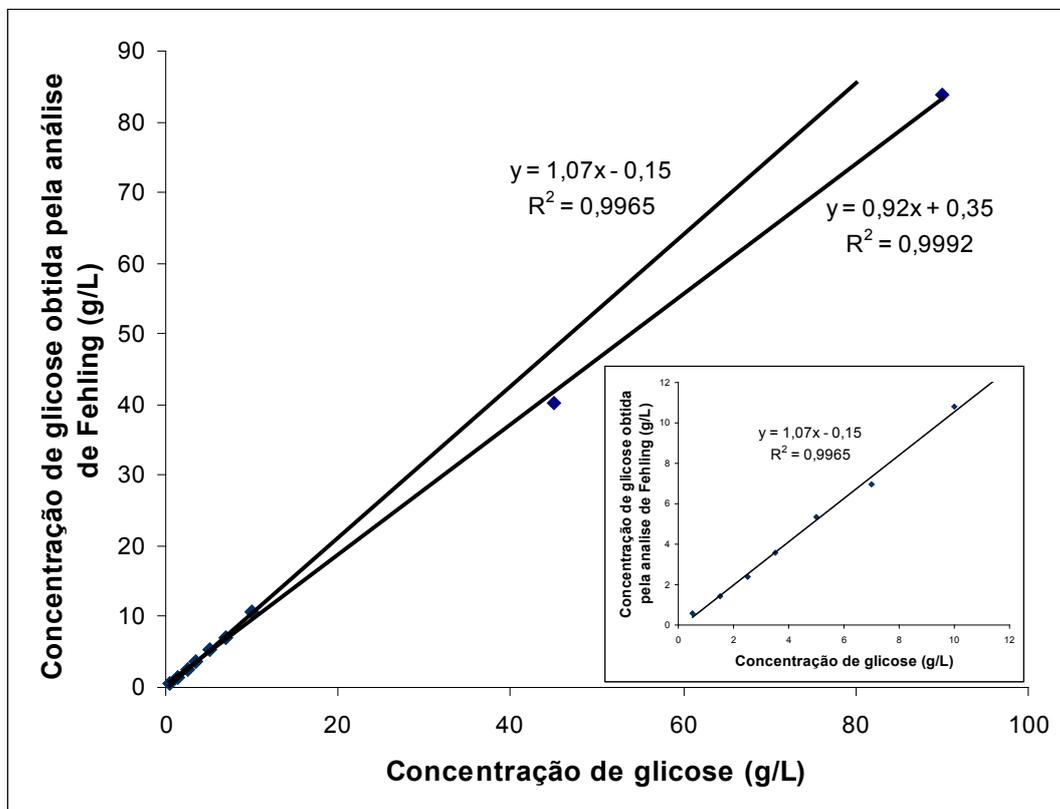


Figura 1. Concentração de glicose obtida pelo método de Fehling e concentração das soluções padrão de glicose, expressas em g L⁻¹. Curvas considerando a escala de 0,5 a 90 g L⁻¹ e de 0,5 a 10 g L⁻¹ (visão ampliada).

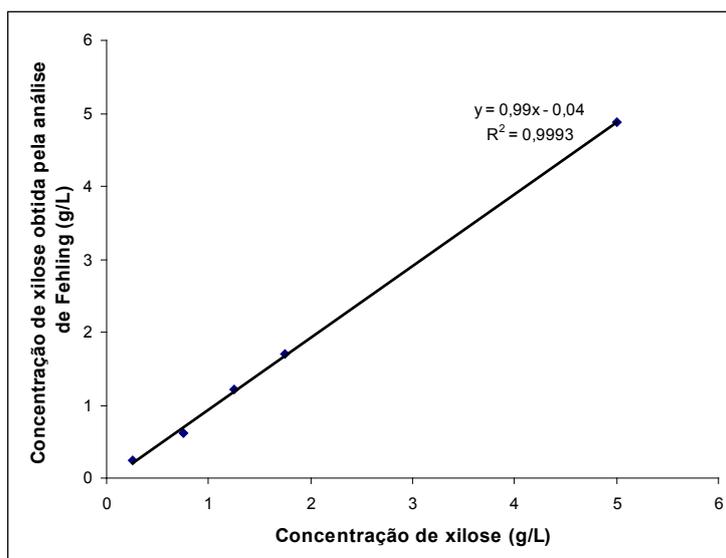


Figura 2. Concentração de xilose obtida pela análise de Fehling e concentração das soluções padrão de xilose, expressas em g L⁻¹.

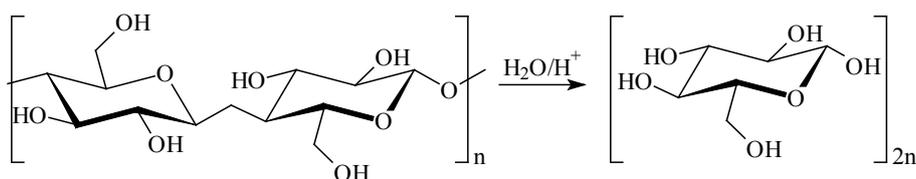


Figura 3. Reação de hidrólise da celulose em meio ácido produzindo glicose.

Tabela 3. Massa média de polpa de celulose (MPC) usada na reação de hidrólise ácida, concentração média teórica de açúcares redutores totais (ART) produzidos (g L⁻¹), concentração média de ART produzidos, determinada pela metodologia de Fehling adaptada (g L⁻¹), e rendimento médio da reação de hidrólise ácida.

MPC (mg)	Concentração média de ART estimada (g L ⁻¹) $\frac{MPC \times \left[\frac{100\% - (U + C)}{100\%} \right] \times 180}{12 \times 162}$	Concentração média de ART determinada pela metodologia de Fehling adaptada (g L ⁻¹)	Rendimento das médias da reação de hidrólise (%)
15,0	1,30	1,21	92,7
20,3	1,76	1,60	90,2
29,9	2,60	2,38	91,4
39,5	3,44	3,04	88,2
50,0	4,34	3,87	85,7
60,3	5,24	4,85	85,7

U = porcentagem de umidade e C = porcentagem de cinzas

Os resultados de hidrólise em meio ácido da madeira seca de *Pinus taeda* na forma de serragem e microtomizada indicam que a proporção média de açúcares redutores totais é de 61,3% ± 3,0% e 55,8% ± 8,0%, respectivamente (Tabela 4).

Pode-se observar na Tabela 4 que o rendimento da hidrólise ácida da madeira na forma de microtomizada tem uma tendência de diminuir com o aumento da massa utilizada no processo. Este fato é observado em menor proporção quando é utilizada a madeira na forma de serragem.

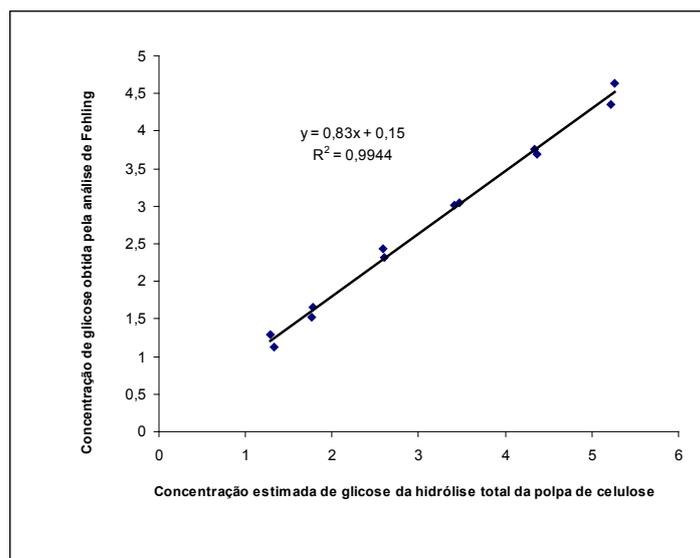


Figura 4. Gráfico das concentrações de açúcares redutores totais da duplicata experimental obtidas pelas análises de Fehling e as concentrações estimadas das hidrólises totais da polpa de celulose, expressas em g L⁻¹.

Tabela 4. Massas médias de madeira microtomizada ($M_{\text{mad}_{\text{microt}}}$) e na forma de serragem ($M_{\text{mad}_{\text{ser}}}$) usadas nas reações de hidrólise (mg), concentrações médias de açúcares redutores totais no hidrolisado da madeira microtomizada (CAR_{microt}) e na forma de serragem (CAR_{ser}) determinadas pela metodologia de Fehling adaptada (g L⁻¹) e as proporções de açúcares redutores totais na madeira na forma microtomizada em relação a massa total usada na hidrólise ($\%AR_{\text{microt}}$) e as proporções de açúcares redutores totais na madeira na forma de serragem em relação a massa total usada na hidrólise ($\%AR_{\text{ser}}$).

$M_{\text{mad}_{\text{microt}}}$ (mg)	$M_{\text{mad}_{\text{ser}}}$ (mg)	CAR_{microt} (g L ⁻¹)	CAR_{ser} (g L ⁻¹)	$\%AR_{\text{microt}}$	$\%AR_{\text{ser}}$
20,0	20,3	1,12	0,97	67,2%	57,2%
30,4	30,0	1,48	1,63	58,3%	65,2%
40,3	40,1	1,68	2,09	50,1%	62,4%
50,2	49,9	2,39	2,57	57,1%	61,8%
60,0	60,1	2,33	3,00	46,5%	59,9%

Observa-se (Figura 5) que o método de determinação de açúcares redutores totais da madeira na forma microtomizada com o procedimento de reação de hidrólise ácida não apresenta uma boa correlação, onde o R^2 tem um valor de 0,8709. Isto pode ser devido ao processo de preparo da matriz, no qual a madeira não sofre o processo de desagregação tão intenso quanto na forma de serragem. Esta falta de desagregação da matriz também influencia na produção de açúcares redutores totais, através da hidrólise ácida usada neste trabalho. Pode-se observar a tendência de diminuição do rendimento com o aumento da massa utilizada no processo

para madeira na forma microtomizada (tangente da melhor curva de correlação de 0,03), quando comparada com o material na forma de serragem (tangente da melhor curva de correlação de 0,05), (Figura 5).

Observa-se na Figura 5, que o método de determinação de açúcares redutores totais da madeira na forma de serragem, com o procedimento de reação de hidrólise ácida, onde o R^2 tem um valor de 0,9666, é mais confiável comparado ao procedimento usado para a madeira na forma microtomizada, na faixa de concentração testada.

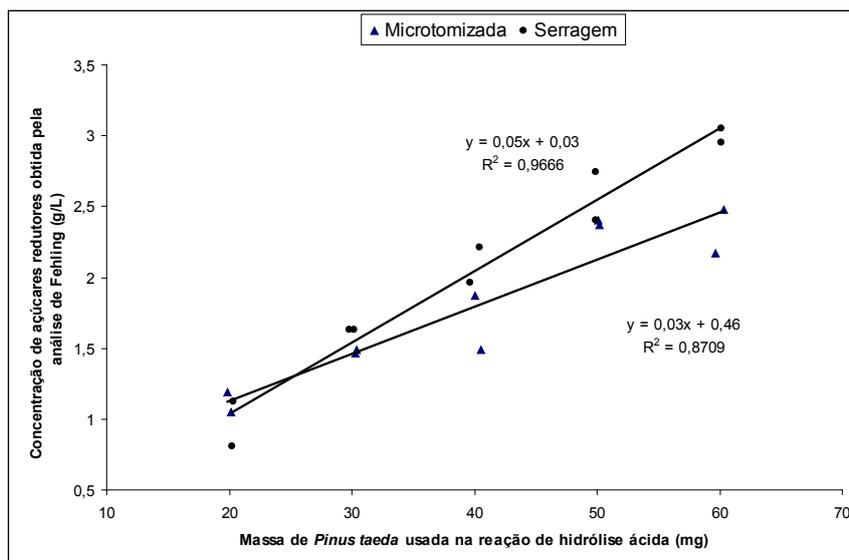


Figura 5. Concentrações de açúcares redutores totais da duplicata experimental obtidas pelas análises de Fehling e as massas de *Pinus taeda*, na forma microtomizada e de serragem usadas nas reações de hidrólise ácida, em mg.

Conclusões

O método adaptado de Fehling é adequado para quantificação dos açúcares totais, provenientes de soluções padrão ou de reações de hidrólise ácida total. A combinação do método de hidrólise ácida total, para a polpa de celulose, com a quantificação através do método adaptado de Fehling proporciona um resultado de rendimento médio de 89,0% de açúcares redutores totais em relação ao estimado, os quais consistem de glicose para o caso da polpa de celulose. Comparando os resultados de açúcares redutores totais para as hidrólises das madeiras nas formas de serragem e microtomizada, observa-se que o material na forma de serragem proporciona um maior rendimento médio de açúcares redutores totais, considerando a faixa de 20 mg a 60 mg de madeira no processo de análise.

Referências

CANETTIERI, E. V.; ROCHA, G. J. de M.; CARVALHO, J. A. de; SILVA, J. B. de A. e. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 422–428, 2007.

CANO, C. B.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análise de padrões de carboidratos normalmente encontrados no mel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - parte I. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Alimento, população e desenvolvimento**: anais. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.

CASTRICINI, A.; OLIVEIRA, P. M. de; RODRIGUES, M. G. V.; SOARES, A. G.; FONSECA, M. J. de O.; JESUS, A. M. S. **Extração de açúcares redutores em mandioca**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2010. 4 p. (EPAMIG. Circular técnica, 80).

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, p. 384–410, 2005.

LANE, J. H.; EYNON, L. Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator. **Journal of the Society of Chemistry Industry**, London, v. 42, p. 32-37, 1923.

MATISSEK, R.; SCHNEPEL, F. M.; STEINER, G. **Análisis de los alimentos**: fundamentos, metodos, aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1998. 416 p.

MEYER, C. R.; LEYGUE-ALBA, N. M. R. **Manual de métodos analíticos enológicos**. Caxias do Sul: UCS, 1991.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

SPENCER, G. L.; MEADE, G. P. Special reagentes. In: _____. **Cane sugar handbook**. New York: Wiley, 1945. p. 674-680.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552 p.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. **Energy & Fuels**, Washington, US, v. 22, p. 46-60, 2008.

Comunicado Técnico, 311

Embrapa Florestas
Endereço: Estrada da Ribeira Km 111, CP 319
Colombo, PR, CEP 83411-000
Fone / Fax: (0**) 41 3675-5600
E-mail: cnpf.sac@embrapa.br



1ª edição
Versão eletrônica (2012)

Comitê de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Secretária-Executiva: *Elisabete Marques Oaida*
Membros: *Álvaro Figueredo dos Santos, Antonio Aparecido Carpanezi, Claudia Maria Branco de Freitas Maia, Dalva Luiz de Queiroz, Guilherme Schnell e Schuhli, Luís Cláudio Maranhão Froufe, Marilice Cordeiro Garrastazu, Sérgio Gaiad*

Expediente

Supervisão editorial: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Revisão de texto: *Patrícia Póvoa de Mattos*
Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*
Editoração eletrônica: *Rafaele Crisostomo Pereira*