



Cláudia Sofia Vicente Guimas Esteves

Efeito da aplicação de xilanases na redução do consumo de reagentes no branqueamento de pastas *kraft* de eucalipto

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Fevereiro, 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cláudia Sofia Vicente Guimas Esteves

Efeito da aplicação de xilanases na redução do consumo de reagentes no branqueamento de pastas *kraft* de eucalipto

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada pelas Professoras Doutoradas M. da Graça Carvalho e Margarida Figueiredo e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Instituições:

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

CIEPQPF — Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta

Financiamento:

FCT — Fundação para a Ciência e Tecnologia e UE - FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional), através do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE): Projecto PTDC / EQU-EQU / 113547/2009.

Dissertação de Mestrado

Fevereiro, 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem o apoio de diversas pessoas e instituições, a todas elas quero transmitir o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras Professoras Doutoras Maria da Graça Carvalho e Margarida Figueiredo. Especialmente à professora Graça Carvalho pelo tempo disponibilizado e todo o apoio prestado apesar dos diversos contratemplos que se verificaram.

À Joana Ferraz, companheira de laboratório, pelo apoio e boa disposição durante os meses que partilhamos bons e maus momentos apoiando-nos mutuamente. Sem ela teria sido muito mais difícil e desgastante esta etapa que concretizámos. Às Engenheiras Ana Moura e Eva Domingues, por toda a ajuda prestada, companheirismo, incentivo e boa disposição proporcionada. Pelas inúmeras viagens ao RAIZ, para determinações de brancuras, pela ajuda na determinação de viscosidades, preparação de folhas bem como em outras actividades que se revelaram uma mais-valia para a concretização deste trabalho. À Engenheira Joana Sousa, que mesmo por pouco tempo foi uma grande ajuda nas determinações de actividades enzimáticas e na preparação de folhas.

À minha família por todo o apoio e carinho que sempre demonstraram para comigo, durante todas as etapas por que passei até chegar à concretização deste trabalho. Um especial obrigada à minha mãe, pela compreensão por todos os meses de ausências em que me vi obrigada a permanecer em Coimbra e que me impediram de acompanhá-la nos momentos menos positivos da sua vida. Gostaria igualmente de demonstrar o meu agradecimento à minha avó que sempre acreditou em mim, me apoiou incondicionalmente, mostrando-se presente em todos os momentos marcantes deste percurso académico, a elas o meu mais sincero e sentido, obrigada. Agradeço também aos meus padrinhos e tios que foram de extrema importância na concretização desta jornada.

Ao RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel, pela disponibilização dos equipamentos utilizados nas determinações de brancuras e reversão de brancura. Agradeço especialmente ao Sr. Martins, ao Sr. Carlos Teixeira e ao Sr. Sousa Pinto, por toda a ajuda prestada, simpatia e boa disposição que nos proporcionaram.

De igual modo gostaria de demonstrar o meu agradecimento ao grupo Portucel Soporcel pelo fornecimento das pastas de eucalipto utilizadas nos ensaios, à Novozymes e à BIM Kemi Portugal Lda pelo fornecimento das amostras de soluções enzimáticas usadas nos ensaios.

À FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia e UE – FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional através do COMPETE - Programa Operacional Factores de Competitividade (POFC) pelo apoio financeiro deste trabalho no âmbito do Projecto PTDC / EQU-EQU / 113547/2009 (COMPETE, ref. FCOMP-01-0124-FEDER-015254).

Por último, mas não menos importantes, agradeço a todos os meus amigos e colegas que me apoiaram em tudo o que precisei e por todo o apoio e amizade demonstrados. A todos os meus amigos de faculdade, que se mantiveram comigo apoiando-me sempre que precisei. Um especial obrigada à minha companheira e amiga desta jornada, Joana Salgado que esteve sempre presente, apoiando-me e ajudando-me nos momentos mais difíceis. A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Nomeadamente à Ana Chegão pela sua amizade e por toda a ajuda prestada e ao Hugo Silva por todos os esclarecimentos disponibilizados. Agradeço especialmente à Michelle, que sempre se mostrou presente nas minhas alegrias e tristezas durante o percurso académico e pessoal, sendo o meu maior pilar.

A todos eles o meu mais sincero e profundo obrigada.

RESUMO

A indústria papelreira apresenta um grande contributo para a economia do País, exibindo um enorme potencial na produção de pasta e papel de elevada qualidade. O *Eucalyptus globulus* é a matéria-prima nacional mais utilizada uma vez que confere óptimas propriedades finais no papel, nomeadamente nos de impressão e escrita. No processo de produção de pasta promove-se o aumento da brancura final, sendo necessário a sua optimização, de modo a preservar as fibras e a minimizar os impactos nefastos no ambiente. Em trabalhos recentes foi demonstrada a contribuição das xilanas constituintes das pastas no desenvolvimento da brancura e da sua estabilidade. A biotecnologia pode ser usada como coadjuvante e/ou uma das possíveis alternativas aos processos químicos usados actualmente no sentido de melhorar as características finais não só das pastas mas também dos efluentes através da redução de consumos de reagentes.

O objectivo do presente trabalho consistiu no estudo da aplicação de um tratamento enzimático com xilanases seguido de um branqueamento químico, em duas pastas obtidas a partir de sequências de branqueamento distintas (DE e DED), com o intuito de avaliar a brancura e estabilidade da pasta final bem como a poupança de reagentes que se consegue obter. A matéria-prima utilizada foi pasta *kraft* industrial de *E. globulus*, branqueada com uma sequência DE (~76% ISO) e DED (~86 e 88% ISO). A xilanase estudada, denominada por EII, possuía uma actividade de ~ 47500 U/mL utilizando-se nos ensaios finais uma carga enzimática de ~ 5 U/g o.d.p.

A xilanase foi aplicada nos últimos estágios de branqueamento de uma sequência DEDX, em diversas condições operatórias (pH, temperatura, tempo e dosagem de solução enzimática por unidade de massa de pasta). Deste estudo foram encontradas as condições de operação óptimas para o tratamento enzimático, no que respeita à evolução da brancura e da sua estabilidade, sendo estas condições posteriormente aplicadas às pastas DE e DED. Após o tratamento enzimático, branquearam-se ambas as pastas resultantes com dióxido de cloro, obtendo-se as sequências DEXD e DEDXD e branqueou-se a pasta DED com peróxido de hidrogénio, obtendo-se a sequência DEDXP. Nestes branqueamentos finais avaliaram-se também os desempenhos de mais duas xilanases (denominadas EN4 e EN5), cujas condições foram estudadas noutra trabalho de dissertação. Pretendeu-se com isto avaliar também o potencial económico de cada uma delas.

Concluiu-se que as condições óptimas de operação no tratamento com a xilanase EII eram de 60°C, a pH 6, com um tempo de reacção de 1 h e com uma dosagem de 100 g/tAD (~ 5 U/g). Para atingir brancuras próximo de 91% ISO na pasta DED, branquearam-se as pastas pré-tratadas com as três xilanases com uma carga de 0,15% de dióxido de cloro (como cloro activo) e uma carga de 0,5% de peróxido de hidrogénio. Assim, obteve-se uma poupança de 50% em dióxido de cloro e 58% em peróxido de hidrogénio, na sequência DEDXD e DEDXP em comparação com DEDD e DEDP. Relativamente às pastas DE, com a excepção do uso da xilanase EN4, o tratamento enzimático também permite uma poupança de 50% em dióxido de cloro, embora num nível de brancura inferior (~89 – 90%, pastas DEXD e DEDD).

Tendo como objectivo a supressão de um estágio de dióxido de cloro por aplicação de um tratamento enzimático na pasta DE (sequência **DEXD**), verificou-se que se consegue atingir valores de brancura próximos de 90% e uma redução da reversão usando nesse tratamento as xilanases EI1 e EN5.

Entre as três xilanases, verificou-se que a EI1 (~5 U/g o.d.p) foi a mais eficiente no que respeita à brancura final e análise económica, conseguindo uma poupança de 1,13 €/t no branqueamento com dióxido de cloro (**DEDXD** vs **DEDD**) e 3,11 €/t com peróxido de hidrogénio (**DEDXP** vs **DEDP**). A xilanase EN5 (~5 U/g o.d.p) mostrou também ser bastante eficiente, atingindo os mesmos níveis de brancura da EI1 dando origem, no entanto, à obtenção de um custo superior no caso do branqueamento final com dióxido de cloro e um aumento de custo insignificante no caso da sequência **DEDXP**. A utilização da xilanase EN4 (4,5 U/g o.d.p) levou a um custo final superior à sequência convencional.

Concluiu-se portanto que o tratamento enzimático com xilanase melhora a eficiência dos estágios seguintes de branqueamento impulsionando o ganho de brancura final alcançada, melhorando a estabilidade da pasta e conseguindo um menor gasto de reagentes químicos. Comprovou-se igualmente que o branqueamento deve ser feito preferencialmente por multi estágios, conseguindo obter-se maiores brancuras, com melhores propriedades finais da pasta.

ABSTRACT

The paper industry shows a high contribution to the economy of the country, showing a high potential for the production of pulp and paper with high quality. The *Eucalyptus globulus* is the national most used raw material since it gives excellent final properties in the paper, namely in printing and writing. In the pulp production process the increase in final brightness is promoted, being necessary its optimization in order to preserve the fibres and to minimize the adverse environment impacts. On recent works it was demonstrated the contribution of xylans constituents on the pulp brightness development and their stability. The biotechnology can be used as adjuvant and/or as a possible alternative to the chemical processes, to improve the final characteristics, not only of the pulps but also of the effluents, trough the reduction of reagents consumption.

The purpose of this work consisted in the study of the application of an enzymatic treatment with xylanases following by a chemical bleaching, in two distinct pulps (DE and DED), to evaluate the brightness and stability of the final pulp as well as the savings of reagents. The raw material used was industrial *E. globulus kraft* pulps, bleached with sequences DE (~76% ISO) and DED (~86 e 88% ISO). The studied xylanase named EI1 had an activity of ~ 47500 U/mL and an enzymatic charge of ~ 5 U/g o.d.p was used in the final tests.

The xylanase was applied in the final bleaching stages (sequence **DEDX**), in several operating conditions (pH, temperature, time and dosage of enzyme per mass unity of pulp). From this study the optimal operating conditions for the enzymatic treatment was found, regarding the brightness evolution and its stability. These conditions were then used in two different pulps, DE and DED. After the enzymatic treatment (**DEX** and **DEDX** pulps) were bleached with chlorine dioxide, obtaining the pulps **DEXD** and **DEDXD**. The pulp **DEDX** was bleached with hydrogen peroxide, obtaining the pulp **DEDXP**. In these final bleaching stages the performance of two more xylanases, named EN4 and EN5, were also evaluated (the corresponding operating conditions were studied in other thesis dissertation). The aim of this methodology was to evaluate the economic potential of each enzyme.

It was concluded that the optimal operating conditions for the treatment with the xylanase EI1 were: 60°C, pH 6, reaction time of 1h and a dosage of 100 g/tAD (~ 5 U/g). In order to obtain brightness values of about 91% ISO in the DED pulp, the pre-treated pulps with the three xylanases were bleached with a chlorine dioxide charge of 0,15% (as active chlorine) and with a hydrogen peroxide charge of 0,5%. It was possible to achieve a chlorine dioxide saving of 50% and 58% saving of hydrogen peroxide, in **DEDXD** and **DEDXP** sequences in comparison with **DEDD** and **DEDP** sequences. Except for EN4 xylanase, the enzymatic treatment of DE pulps, also allows achieving 50% savings in chlorine dioxide, although with a lower brightness level (~89 – 90%, **DEXD** and **DEDD** pulps).

The removal of a chlorine dioxide stage by using an enzymatic treatment with xylanases EI1 and EN5, applied to the DE pulp (**DEXD** sequence) allows attaining brightness values ~90% and an increase in the brightness stability.

Among the three xylanases, it observed that the EI1 (~5 U/g o.d.p) was the most efficient regarding the final brightness and the economic analysis, achieving a saving of 1,13 €/t in chlorine dioxide bleaching (DED**XD** vs DEDD) and 3,11 €/t hydrogen peroxide bleaching (DED**XP** vs DEDP). Xylanase EN5 (~5 U/g o.d.p) also proved to be very efficient, achieving the same levels of brightness as EI1 leading to however a much higher cost for chlorine dioxide bleaching and an insignificant cost increase in the DED**XP** sequence. EN4 xylanase (4,5 U/g o.d.p) had led to a higher final cost in comparison with the conventional sequence.

Therefore, it was concluded that the enzymatic treatment with xylanase improves the efficiency of the following bleaching stages increasing the final brightness gain, the pulp stability and decreasing the chemical reagents consumption. It was also confirmed that the bleaching process should be done by multi-stages for obtaining higher brightness levels with better final pulp properties.

NOMENCLATURA

AOX – *Adsorbable organic halogens* (compostos organo-halogenados adsorvíveis)

C – Estágio com cloro

CED – Solução de cupri – etilenodiamina

D – Estágio com dióxido de cloro

E – Estágio de extracção alcalina

ECF – *Elemental Chlorine Free*

GlcP A – Acido glucurónico

HexA – Ácido hexenurónico

ISO – *International Organization for Standardization*

IK – Índice *kappa*

k - coeficiente de absorção

LCC – *Lignin - carbohydrate complex* (Complexo lenhina-carbohidratos)

Me – grupos metilo

odp – *oven dry pulp* (pasta absolutamente seca)

P – Estágio com peróxido de oxigénio

PC number – *Post Color Number*

R_{∞} - reflectância

s - coeficiente de dispersão

T – temperatura (°C)

t – tempo

TCF – *Totally Chlorine Free*

X – Estágio com enzima

Xylp - xilose

λ – Comprimento de onda (nm)

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. COMPOSIÇÃO DA MADEIRA	6
2.1 CELULOSE	7
2.2 HEMICELULOSES.....	7
2.3 LENHINA	9
3. PROCESSO DE COZIMENTO <i>KRAFT</i>.....	11
3.1 REACÇÕES COM A LENHINA	12
3.2 REACÇÕES COM OS POLISSACARÍDEOS.....	13
3.3 ETAPAS DO PROCESSO DE COZIMENTO.....	15
4. BRANQUEAMENTO DE PASTAS <i>KRAFT</i>	17
4.1 REAGENTES QUÍMICOS	18
4.1.1 PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	21
4.1.2 DIÓXIDO DE CLORO	22
4.2 ENZIMAS	24
4.2.1 FACTORES QUE INFLUENCIAM A ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	28
4.2.2 XILANASES.....	29
4.2.3 LACASES.....	33
4.3 CONDIÇÕES OPERATÓRIAS ADEQUADAS	34
4.4 REVERSÃO DA BRANCURA	35
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
5.1 ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	40
5.2 TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA PASTA DED.....	41
5.2.1 TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM ENZIMA EI1.....	41
5.3 BRANQUEAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	41
5.4 BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO.....	42
5.5 TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS COM APLICAÇÃO POSTERIOR DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO E DIÓXIDO	43
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PASTAS	43
5.6.1 VISCOSIDADE	44
5.6.2 BRANCURA ISO	44
5.6.3 REVERSÃO DA BRANCURA	44
6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	46
6.1 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	47
6.2 BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO E PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	49
6.2.1 PASTA DED	49
6.2.2 PASTA DE.....	51
6.3 ANÁLISE DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO	53
6.3.1 EFEITO DO TEMPO	54

6.3.2	EFEITO DA CARGA	55
6.4	BRANQUEAMENTOS FINAIS.....	57
6.4.1	PASTA DEDX	58
6.4.2	PASTA DEX.....	62
6.5	POUPANÇA DE REAGENTES.....	66
6.6	ANÁLISE ECONÓMICA	67

7. CONCLUSÕES **69**

BIBLIOGRAFIA..... **71**

ANEXOS..... **79**

I – ACTIVIDADE ENZIMÁTICA	80
I 1 – DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA.....	80
I 2 – CÁLCULOS DE CONVERSÕES.....	82
II – APRESENTAÇÃO DAS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS	84
II 1 – CONDIÇÕES DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO	84
II 2 – RESULTADOS DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	85
II 3 – CONDIÇÕES DO BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO	86
II 4 – RESULTADOS DO BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO	86
II 5 – CONDIÇÕES DO BRANQUEAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	86
II 6 – RESULTADOS DO BRANQUEAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO	87
II 7 – CONDIÇÕES DE BRANQUEAMENTO FINAIS	87
II 8 – RESULTADOS DOS BRANQUEAMENTOS FINAIS.....	88
III – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	89
III 1 – DETERMINAÇÃO TEOR DE SECURA	89
III 2 – PREPARAÇÃO DA ENZIMA	89
III 3 – CONDIÇÕES GERAIS DOS ENSAIOS	89
III 4 – ACERTO DO PH.....	90
III 5 – DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILANASE	90
III 6 – BRANQUEAMENTOS	92
III 7 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO CONCENTRADO.....	93
III 8 – PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO DE NAOH E SUA PADRONIZAÇÃO	95
III 9 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO RESIDUAL.....	96
III 10 – NAOH RESIDUAL NOS FILTRADOS DOS ESTÁGIOS DE OXIGÉNIO OU DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO	98
III 11 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO DIÓXIDO DE CLORO CONCENTRADO E RESIDUAL	100
III 12 – VISCOSIDADE INTRÍNSECA.....	102
III 13 – PREPARAÇÃO DE FOLHAS PARA A MEDIÇÃO DA BRANCURA ISO	106
IV – AUTORIZAÇÃO IMAGEM	107

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1: CONSTITUIÇÃO DA MADEIRA (ADAPTADO DE FENGEL & WEGENER, 1984).....	6
FIGURA 2: UNIDADE DE REPETIÇÃO DA CELULOSE E SEUS GRUPOS TERMINAIS (ADAPTADO DE SMOOK, 2002).....	7
FIGURA 3: ESTRUTURA DA O-ACETIL-4-O-METILGLUCURONOXILANA	8
FIGURA 4: MODELO ESTRUTURAL DA GLUCUROXILANA DO E. GLOBULUS (AUTORIZADO POR EVTUGUIN ET AL., 2003) .	9
FIGURA 5: ESTRUTURA DA GLUCOMANANA	9
FIGURA 6: PRECURSORES DA LENHINA	9
FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMPOSIÇÃO DA MADEIRA ANTES E APÓS O COZIMENTO KRAFT (CONSIDERANDO APENAS VALORES APROXIMADOS E SIMPLISTAS).....	11
FIGURA 8: REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES ÉTER B-O-4 E A-O-4 NA LENHINA	12
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES CARBONO – CARBONO B – 5', B – B E B – 1'	13
FIGURA 10: EXEMPLO DE LIGAÇÃO DO TIPO ÉSTER BENZÍLICO ENTRE LENHINA E XILANA (ADAPTADO DE KIRK ET AL., 2004)	13
FIGURA 11: ESQUEMATIZAÇÃO DA REACÇÃO DE PEELING NA CADEIA DE CELULOSE.....	14
FIGURA 12: ESQUEMATIZAÇÃO DA REDUÇÃO DO TAMANHO ALEATÓRIO NA CADEIA DE CELULOSE	14
FIGURA 13: FORMAÇÃO DO ÁCIDO HEXENURÓNICO DURANTE O COZIMENTO, A PARTIR DO ÁCIDO METILGLUCURÓNICO LIGADO AO POLÍMERO DE XILOSE (ADAPTADO DE JIANG ET AL., 2000)	15
FIGURA 14: ETAPAS DO COZIMENTO E RESPECTIVAS RUPTURAS DE LIGAÇÕES QUÍMICAS NA LENHINA (ADAPTADO DE CARVALHO, 1999; LOUREIRO, 2012)	16
FIGURA 15: A) BRANCURA HIPOTETICAMENTE ATINGIDA VS CONSUMO DE REAGENTES; B) EFICIÊNCIA NO BRANQUEAMENTO DA PASTA; C) VISCOSIDADE DA PASTA EM FUNÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS (ADAPTADAS DE BIERMANN, 1996; DENCE & REEVE, 1996)	18
FIGURA 16: MECANISMO POSSÍVEL DE FORMAÇÃO DE QUINONAS PELO DIÓXIDO DE CLORO E A SUA REACÇÃO COM O PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO (ADAPTADO DE SUESS ET AL., 2004).....	22
FIGURA 17: EXEMPLOS DE POSSÍVEIS REACÇÕES DE OXIDAÇÃO DAS ESTRUTURAS FENÓLICAS DA LENHINA RESIDUAL COM O DIÓXIDO DE CLORO (ADAPTADO DE FENGEL & WEGENER, 1984).....	23
FIGURA 18: MODELO CHAVE – FECHADURA	25
FIGURA 19: A) CURVA DE MICHAELIS-MENTEN; B) CORRELAÇÃO ENTRE A SOLUBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA NA PASTA E O EFEITO DA ENZIMA NO BRANQUEAMENTO DA PASTA (ADAPTADO DE ERIKSSON ET AL., 1997).....	29
FIGURA 20: ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE XILANA E RESPECTIVA ACÇÃO DAS XILANASES (ADAPTADO DE GOMES ET AL., 2007)	30
FIGURA 21: A) ACÇÃO DAS XILANASES NA REMOÇÃO DE CROMÓFOROS DERIVADOS DAS XILANAS (ADAPTADO DE JONG ET AL., 1997)	31
FIGURA 22: EXEMPLO DO ENVELHECIMENTO NATURAL DO PAPEL.....	36
FIGURA 23: MECANISMO DE PRODUÇÃO DOS CROMÓFOROS E DEGRADAÇÃO DA LENHINA DURANTE O AMARELECIMENTO DO PAPEL (ADAPTADO DE CARTER, 1996)	37
FIGURA 24: MODELO PROPOSTO PARA A ESTABILIDADE DA BRANCURA COM TRATAMENTO COM XILANAS (ADAPTADO DE SIMEONOVA ET AL., 2007).....	38
FIGURA 25: METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	39
FIGURA 26: METODOLOGIA DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM PASTA DED1 E METODOLOGIA DO BRANQUEAMENTO FINAL COM PASTA DED2.....	47
FIGURA 27: ESTRUTURA DE UMA ARABINOGLUCURONOXILANA EXISTENTE NA MADEIRA DE RESINOSAS OU EM ALGUMAS GRAMÍNEAS COMO A AVEIA OU O TRIGO (EBRINGEROVÁ, 2006).....	48

FIGURA 28: EVOLUÇÃO DA BRANCURA ISO EM FUNÇÃO DA CARGA APLICADA DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) E PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO (MASSA DE REAGENTE/MASSA DE PASTA SECA, EM PERCENTAGEM) – PASTA DED2	50
FIGURA 29: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER EM FUNÇÃO DA CARGA APLICADA DE DIÓXIDO DE CLORO (EM CLORO ACTIVO) E DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO – PASTA DED2	50
FIGURA 30: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA CARGA APLICADA DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) E DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO – PASTA DED2	51
FIGURA 31: EVOLUÇÃO DA BRANCURA ISO EM FUNÇÃO DA CARGA DE DIÓXIDO DE CLORO APLICADO (COMO CLORO ACTIVO) – PASTA DE	52
FIGURA 32: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER EM FUNÇÃO DA CARGA DE DIÓXIDO DE CLORO APLICADO (COMO CLORO ACTIVO) – PASTA DE	52
FIGURA 33: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA CARGA DE DIÓXIDO DE CLORO APLICADO (COMO CLORO ACTIVO) – PASTA DE	53
FIGURA 34: EVOLUÇÃO DA BRANCURA ISO (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REACÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM EI1 – PASTA DED1 (PH 6, 60°C, 0,01% OU 4,9 U/G)	54
FIGURA 35: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REACÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM EI1 – PASTA DED1 (PH 6, 60°C, 0,01% OU 4,9 U/G)	55
FIGURA 36: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE REACÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM EI1 – PASTA DED1 (PH 6, 60°C, 0,01% OU 4,9 U/G)	55
FIGURA 37: ESTUDO DA CARGA DA ENZIMA EI (MASSA DE SOLUÇÃO DE ENZIMA/MASSA DE PASTA SECA, %) NA EVOLUÇÃO DA BRANCURA. ENTRE PARÊNTESES ENCONTRAM-SE OS VALORES DA DOSAGEM EM UNIDADES DE ACTIVIDADE DE XILANASE POR GRAMA DE PASTA SECA (PH 6, 60°Ce 60MIN).....	56
FIGURA 38: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER COM A CARGA DE ENZIMA EI1 – PASTA DED1 (PH 6, 60°Ce 60MIN)	56
FIGURA 39: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA CARGA DE ENZIMA EI1 – PASTA DED1 (PH 6, 60°Ce 60MIN)	57
FIGURA 40: EVOLUÇÃO DA BRANCURA DEPOIS DA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	58
FIGURA 41: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER DEPOIS DA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	59
FIGURA 42: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA CARGA APLICADA DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G.....	60
FIGURA 43: EVOLUÇÃO DA BRANCURA DEPOIS DA APLICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	61
FIGURA 44: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER DEPOIS DA APLICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	61
FIGURA 45: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE DEPOIS DA APLICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO À PASTA DED2 OU ÀS PASTAS DEDX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G)	62
FIGURA 46: EVOLUÇÃO DA BRANCURA DEPOIS DA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DE OU PASTAS DEX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G)	63
FIGURA 47: EVOLUÇÃO DO PC NUMBER DEPOIS DA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DE OU PASTAS DEX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	64
FIGURA 48: EVOLUÇÃO DA VISCOSIDADE DEPOIS DA APLICAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO (COMO CLORO ACTIVO) À PASTA DE OU PASTAS DEX PRÉ-TRATADAS COM X: EI1 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G	64

FIGURA 49: COMPARAÇÃO DOS GANHOS DE BRANCURA NAS PASTAS DE E DED2 COM APLICAÇÃO DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO COM X: E11 – 4,9 U/G, EN4 – 4,5 U/G E EN5 – 4,9 U/G. BR – BRANCURA ATINGIDA APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO.....	65
FIGURA I: RECTA DE CALIBRAÇÃO.....	81
FIGURA II: CURVA DA ACTIVIDADE DA XILANASE PADRÃO	81

ÍNDICE TABELAS

TABELA 1: CARACTERÍSTICAS E EXEMPLOS DE DIFERENTES TIPOS DE ÁRVORES (ADAPTADO DE SJÖSTRÖM, 1981)	6
TABELA 2: CONSTITUIÇÃO DAS HEMICELULOSES DE CADA CLASSE (ADAPTADO DE SJÖSTRÖM, 1981)	8
TABELA 3: PROPORÇÃO DE H:G:S NAS ÁRVORES RESINOSAS E FOLHOSAS (PINTO, 2005)	10
TABELA 4: COMPOSIÇÃO QUÍMICA (ADAPTADO DE SJÖSTRÖM, 1981).....	10
TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE BRANQUEAMENTO ADAPTADO DE (SJÖSTRÖM, 1981).....	19
TABELA 6: DIFERENTES SEQUÊNCIAS DE BRANQUEAMENTO (ADAPTADO DE SOUSA, 2012)	20
TABELA 7: DIFERENTES REAGENTES USADOS NO BRANQUEAMENTO (ADAPTADO DE (DENCE & REEVE, 1996)	20
TABELA 8: CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE ENZIMAS (ADAPTADO DE NOVOZYMES®).....	24
TABELA 9: CRONOLOGIA DA UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NAS INDÚSTRIAS DE PASTA E PAPEL.....	26
TABELA 10: SEQUÊNCIAS DE BRANQUEAMENTO COM TRATAMENTO ENZIMÁTICO (ADAPTADO DE DENCE & REEVE, 1996); VANTAGENS NO PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO (ADAPTADO DE ERIKSSON ET AL., 1997)	28
TABELA 11: RESUMO DE CONDIÇÕES, ACÇÃO E RESULTADOS ESPERADOS DO ClO_2 , H_2O_2 E XILANASE (ADAPTADO DE SUESS ET AL., 2004; BAJPAI, 1999)	34
TABELA 12: EXEMPLOS DE CONDIÇÕES DE APLICAÇÃO DE TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS	35
TABELA 13: CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO PARA A ENZIMA E11	41
TABELA 14: CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DOS ENSAIOS COM PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO	42
TABELA 15: CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DOS ENSAIOS COM DIÓXIDO DE CLORO.....	42
TABELA 16: CONDIÇÕES FINAIS DE OPERAÇÃO	43
TABELA 17: CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES PASTAS INDUSTRIAIS UTILIZADAS NOS ENSAIOS	46
TABELA 18: ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS (MÉTODO DESCRITO POR GHOSE & BISARIA, 1987)	47
TABELA 19: ACTIVIDADE ENZIMÁTICA (U/ML) USANDO XILANAS DE DIFERENTES ORIGENS	48
TABELA 20: DIFERENTES CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NOS BRANQUEAMENTOS COM DIÓXIDO DE CLORO* E PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO	49
TABELA 21: CONDIÇÕES OPERATÓRIAS DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA PASTA DED COM A XILANASE E11.....	53
TABELA 22: CONDIÇÕES DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO APLICADO ÀS PASTAS DED E DE.....	57
TABELA 23: CONDIÇÕES DOS BRANQUEAMENTOS COM DIÓXIDO DE CLORO E PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO PARA AS DIFERENTES PASTAS PRÉ-TRATADAS COM XILANASES	58
TABELA 24: RESULTADO DO RENDIMENTO OBTIDO COM DIÓXIDO DE CLORO E COM APLICAÇÃO DA ENZIMA E11 SEGUIDA DO BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO	60
TABELA 25: CARACTERÍSTICAS DAS PASTAS APÓS BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO COM OU SEM PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO X, USANDO A MESMA CARGA DE ENZIMA (VER FIG. 49) E UMA CARGA DE DIÓXIDO DE CLORO DE FORMA A OBTER IDÊNTICA BRANCURA FINAL.....	65
TABELA 26: RESULTADOS DOS DIFERENTES TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS E BRANQUEAMENTOS QUÍMICOS	66
TABELA 27: ANÁLISE DA POUPANÇA DE REAGENTES NO BRANQUEAMENTO DA PASTA DED PARA UMA BRANCURA ISO FINAL DE ~91%.	67
TABELA 28: PREÇO DE CADA REAGENTE (€/T).....	67
TABELA 30: RESULTADOS DA ANÁLISE ECONÓMICA.....	68
TABELA I: RESULTADOS OBTIDOS DA ABSORVÂNCIA EM FUNÇÃO DA XILOSE LIBERTADA	80
TABELA II: DADOS PARA AS CONVERSÕES	82
TABELA III: CONDIÇÕES DE TRATAMENTO COM A XILANASE E11	84
TABELA IV: RESULTADOS OBTIDOS NO TRATAMENTO COM A XILANASE E11.....	85
TABELA V: CONDIÇÕES DE BRANQUEAMENTO PARA O DIÓXIDO DE CLORO (CARGA DE CLORO ACTIVO).....	86
TABELA VI: RESULTADOS OBTIDOS NO BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO (CARGA DE CLORO ACTIVO)	86
TABELA VII: CONDIÇÕES DE BRANQUEAMENTO PARA O PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO.....	86

TABELA VIII: RESULTADOS OBTIDOS NO BRANQUEAMENTO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO	87
TABELA IX: CONDIÇÕES DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO E BRANQUEAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO E PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO FINAIS NAS PASTAS PRÉ-TRATADAS COM AS XILANASES EI1, EN4 E EN5.....	87
TABELA X: CONDIÇÕES DE BRANQUEAMENTO FINAL COM DIÓXIDO NA PASTA DE.....	88
TABELA XI: RESULTADOS DOS BRANQUEAMENTOS FINAIS.....	88
TABELA XII: VOLUME A INTRODUIZIR.....	91
TABELA XIII: MASSA DE PASTA A PESAR, ADEQUADA AOS VALORES PREVISTOS PARA A VISCOSIDADE DA PASTA.....	104
TABELA XIV: VALORES DE $[H] \times C$ CORRESPONDENTES AOS DIFERENTES VALORES DO RÁCIO DE VISCOSIDADE, HRATIO (H/H0).....	105

1. INTRODUÇÃO

A indústria de produção de pasta e papel tem uma grande importância para a economia do País e tem vindo a crescer continuamente, tendo um volume de vendas anual superior a 3 mil milhões de euros, representando cerca de 51% das exportações (INE, 2012). Portugal usa maioritariamente como matéria-prima o eucalipto, sendo o maior produtor de pastas kraft¹ branqueadas de *Eucalyptus globulus* na Europa (Celpa, 2012). Segundo os dados do Inventário Florestal Nacional (IFN5), a floresta Portuguesa ocupa cerca de 3,5 milhões de hectares (38,8% do território nacional), apresentando-se o Pinheiro Bravo em maior quantidade (27% da área florestal) seguido do eucalipto (23%) e do sobreiro (23%) (Florestal, 2010). Contudo, os dados mais recentes do inventário florestal nacional, ainda não totalmente concluídos, apontam já o eucalipto como a espécie dominante (Carvalho, 2013).

A espécie usada no território nacional é essencialmente *E. globulus*, sendo esta considerada como ideal para a produção de papéis de alta qualidade de impressão e escrita (Pinho, 2010; Soporcel, 2012). As boas propriedades finais no papel proveniente desta matéria-prima são atribuídas fundamentalmente às dimensões da sua fibra e à sua composição química (elevado teor de celulose e baixo teor de lenhina em comparação com outras espécies). A fibra, apesar de ser curta, é bastante robusta, isto é, tem uma parede espessa comparativamente ao seu comprimento. A fibra do *E. globulus* confere por isso uma melhor formação da folha de papel, proporcionando um elevado índice de mão, com boas propriedades ópticas, mecânicas e de resistência (Ferreira, 2000; Kibblewhite et al., 1991). O eucalipto prima também por ter um crescimento rápido, evidenciando igualmente um bom rendimento quando sujeito ao processo de cozimento kraft, com menores consumos de químicos.

A produção de pasta e papel envolve numerosas etapas, cujo principal objectivo é extrair as fibras naturais de celulose existentes na madeira, para posterior fabrico do papel. O papel teve início com o papiro à 3000 A.C no Egipto, feito através dos caules das plantas, que posteriormente foi substituído pelo pergaminho, produzido através de peles de animais (Celpa, 2012). O fabrico do papel foi sendo então aperfeiçoado durante vários anos até que em 1854 foram patenteadas as primeiras produções de pastas mecânicas e químicas, pelo alemão Keller. Actualmente, o papel é produzido a partir de dois tipos de madeira - as gimnospérmicas e as angiospérmicas. Cada uma destas madeiras produz papéis com características e propriedades específicas, sendo por isso usados consoante a finalidade desejada.

O primeiro passo para transformar a madeira em papel é individualizar as fibras celulósicas da madeira, por um processo mecânico ou químico, de forma a produzir um entrelaçado de fibras, com ligações estáveis entre si, formando assim um suporte à escrita. As pastas mecânicas sofrem um processo físico de individualização das fibras, através de tensões de corte intensas de forma a destruir as ligações entre fibras. Este tipo de processo conduz a um

¹ Pasta kraft, pasta forte, resistente, em Alemão

elevado rendimento (até 95%), uma vez que não há degradação da lenhina. As pastas provenientes deste processo têm como destino final papéis de pouca resistência, como o jornal e apresentam um processo de amarelecimento bastante mais rápido em comparação com as pastas químicas (Holik, 2006).

As pastas químicas sofrem um processo de cozimento, no qual se utilizam reagentes com o objectivo de degradar e eliminar a lenhina. O processo mais conhecido e utilizado designa-se por processo *kraft*, que permite uma recuperação eficiente dos reagentes usados no cozimento e resulta em pastas de grande qualidade e resistência (Biermann, 1996; Sixta, 2006). Após este cozimento, obtém-se uma pasta crua de cor acastanhada que pode conter diversas impurezas, tais como incozidos, casca ou areia que tenham entrado no processo de forma não desejada. Deste modo, verifica-se a necessidade de alguns processos de lavagem e crivagem da pasta, de forma a minimizar as impurezas que seguem no mesmo, evitando-se assim um consumo desnecessário de reagentes (Sixta, 2006). Após este processo, a pasta, segue para o branqueamento onde o objectivo final é obter um elevado nível de brancura, removendo a lenhina residual que ainda se encontra na pasta. Aqui deseja-se essencialmente promover a brancura da pasta sem degradação dos polissacarídeos, de modo a não prejudicar a resistência final no papel. Nesta etapa é também de extrema importância promover a estabilidade da pasta, eliminando os compostos cromóforos e prejudiciais da mesma, minimizando a reversão da brancura no papel. O branqueamento é um processo de multi estágios, que requer reagentes muito mais selectivos e específicos do que aqueles usados no cozimento (Dence & Reeve, 1996; Suess, 2010). Os reagentes químicos usados nesta etapa, podem ser à base de cloro, mas isentos de cloro elementar como o dióxido de cloro, denominando-se assim por branqueamento ECF (*Elemental Chlorine Free*). Ao optar-se por reagentes completamente livres de cloro, como oxigénio, ozono ou o peróxido de hidrogénio, denomina-se branqueamento TCF (*Totally Chlorine Free*) (Dence & Reeve, 1996; Sixta, 2006; Suess, 2010). Estas pastas químicas destinam-se à produção de papéis de elevada resistência e brancura, como no caso dos papéis de impressão e escrita. Este processo tem um rendimento menor do que o mecânico, cerca de 45 a 55%, uma vez que ocorre degradação da lenhina e de alguns polissacarídeos (Holik, 2006).

No processo de produção de papel, a pasta sofre uma série de acções mecânicas, como por exemplo a refinação. Nesta etapa, as fibras são sujeitas a fortes acções de compressão, tracção e fricção, que proporcionam uma diminuição da sua rigidez para uma melhor conformabilidade entre elas. O objectivo principal deste processo é aumentar o potencial de ligação entre as fibras, aumentando a sua área superficial, permitindo assim uma melhor formação do papel. Esta etapa é de grande importância nas propriedades finais do papel, como as propriedades ópticas, mecânicas e estruturais (Biermann, 1996; Holik, 2006). No final da refinação é necessário drenar água para dar origem à formação das folhas de papel, sendo depois dirigidas para a secagem. As propriedades finais do papel dependem de uma infinidade de variáveis, entre as quais, as principais são o tipo de fibras usadas (fibra curta ou fibra longa), o seu processo de obtenção (mecânico, químico ou semi-químico), e o seu processo de branqueamento.

Apesar destes processos serem actualmente bem implementados e bem sucedidos, existem no entanto diversas etapas que devem ser melhoradas e aperfeiçoadas, tal como a minimização do uso de reagentes prejudiciais ao meio ambiente nos processos de branqueamento, bem como a minimização da degradação das fibras. Nos processos de cozimento químico e branqueamento os reagentes usados não atacam apenas a lenhina (que se pretende remover), mas também afectam os polissacarídeos como a celulose e as hemiceluloses. Estes são de grande importância para as qualidades finais do papel, sendo por isso necessário protegê-los destes ataques químicos (Sjöström, 1981). A degradação da celulose provoca perda de resistência da folha, enquanto a degradação das hemiceluloses afecta o processo de refinação, uma vez que estas ajudam a absorção de água pela pasta. Devido aos seus distintos graus de polimerização as hemiceluloses são mais afectadas nestes processos, existindo por isso cada vez mais estudos direccionados para a preservação destes polissacarídeos. Ainda no processo de branqueamento, há a necessidade de encontrar técnicas mais eficientes no que diz respeito à reversão da brancura na pasta e na poupança de reagentes químicos, levando a uma diminuição dos problemas ambientais. Este processo de reversão consiste na perda de brancura do papel ao longo do tempo, tornando-se amarelado, quando sujeito a certas condições ambientais. Este é um fenómeno que ocorre devido aos grupos cromóforos ou potenciais cromóforos que a pasta contém e que resultam de reacções de foto-oxidação, causando o amarelecimento do papel (Suess, 2010). Por estas razões existem numerosas pesquisas no sentido de melhorar as lacunas existentes. As hemiceluloses mais abundantes nas árvores do tipo *hardwoods*, como o eucalipto, são as xilanas. As xilanas são os componentes da pasta, após o cozimento, mais susceptíveis à oxidação pelos reagentes de branqueamento. Recentemente foi estudado o papel que as xilanas apresentam na instabilidade da brancura causado pelas suas ligações covalentes à lenhina residual, provocando não só o consumo adicional de reagentes como também um entrave ao ganho de brancura (Loureiro, 2012).

A aplicação da biotecnologia na produção de pasta e papel tem sido cada vez mais investigada neste ramo, havendo uma forte tendência para promover uma simbiose dos processos químicos com os processos biotecnológicos, como é o caso do uso de enzimas (Senior et al., 1992; Valls et al., 2011). Estas ajudam nos processos de branqueamento, proporcionando a quebra de ligações entre a lenhina residual e os polissacarídeos. Isto só é possível devido à sua elevada selectividade, fazendo com que se a enzima se ligue apenas a um substrato em particular (Pedersen et al., 1992). No entanto, estes processos enzimáticos provocam uma ligeira diminuição do rendimento, devido à perda de hemiceluloses (Sjöström, 1981). O uso de enzimas nos processos de branqueamento teve inicialmente o intuito de simular a degradação natural da madeira através de fungos, como os *Basidiomycetes* (Dence & Reeve, 1996; Eriksson et al., 1990). Actualmente há diversos tipos de enzimas que podem ser introduzidas nos processos industriais, de modo a promover o decréscimo de consumo de reagentes químicos nos processos de branqueamento tornando-os mais eco amigáveis (Fillat et al., 2012). As xilanases são as enzimas que mais têm sido estudadas e com maior aplicação nestes processos, tendo-se revelado como as mais eficazes (Beg et al., 2001). Estas hidrolisam a cadeia das xilanas, promovendo a remoção da lenhina residual e a acessibilidade dos químicos do branqueamento às fibras. As xilanases não só contribuem para a degradação

selectiva dos polissacarídeos, como também provocam uma diminuição do consumo dos reagentes usados, atingindo igualmente valores de brancura desejados, tornando o processo de branqueamento mais eco - eficiente (Dhiman et al., 2008).

Actualmente existem diversos estudos com aplicação de tratamento enzimático no branqueamento de pastas químicas. A maioria destes estudos aplica o tratamento enzimático no início da sequência de branqueamento, avaliando o potencial que apresentam na poupança dos reagentes seguintes. As xilanas, após o cozimento, são compostas por grande parte dos grupos oxidados na pasta, estando estes mais susceptíveis à oxidação dos reagentes de branqueamento. No presente trabalho pretende-se estudar também a aplicação de um tratamento enzimático com xilanases no final da sequência de branqueamento, apresentando-se como uma alternativa mais selectiva à degradação dos compostos cromóforos ligados às xilanas que se encontram mais vulneráveis nos estágios finais de branqueamento (Loureiro et al., 2010). Além do desenvolvimento da brancura e da estabilidade da brancura, as xilanases apresentam um grande potencial na poupança de reagentes como já foi mencionado, levando a uma possível vantagem económica. Desta forma o objectivo desta dissertação é o de complementar os estudos realizados neste âmbito, averiguando o diferente comportamento de xilanases distintas aplicadas no final e no meio da sequência de branqueamento – pastas DE e DED.

Foram disponibilizadas cinco enzimas para este estudo, pela Novozymes e pela BIM Kemi Portugal. Devido ao elevado número de ensaios associados a cada uma delas, foi necessário dividir o trabalho por duas dissertações, sendo por isso, esta dissertação, complementada pela “Avaliação de tratamentos enzimáticos na estabilidade da brancura de pastas *kraft* de eucalipto” elaborada por Joana Ferraz (Ferraz, 2013). Assim, no presente trabalho foi estudado o desempenho da xilanase denominada EI1 aplicada a uma pasta *kraft* industrial de *Eucalyptus globulus* proveniente de duas torres de branqueamento: pastas DE e DED. Posteriormente foi efectuado um branqueamento final com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio. Nestes branqueamentos finais foram incluídas mais duas xilanases (EN5 e EN4), estudadas por (Ferraz, 2013), com o objectivo de comparar os seus diferentes desempenhos.

Esta tese de dissertação divide-se em sete capítulos, onde no presente capítulo se contextualiza o problema tratado, explicando de forma sumariada cada um dos processos e etapas nos processos de pasta e papel. No capítulo 2 faz-se uma breve explicação da composição da madeira, evidenciando-se os constituintes em maior quantidade.

Os capítulos 3 e 4 abordam duas etapas de extrema importância nos processos de produção pasta e papel, ilustrando-se de forma simplificada o processo de cozimento *kraft* com as suas principais reacções e explicando-se o processo de branqueamento abordando os principais reagentes usados actualmente, as perspectivas futuras de alternativas a estes e a questão da reversão da brancura. Neste capítulo evidenciam-se as vantagens e desvantagens de cada reagente, apresentam-se as enzimas como potenciais alternativas aos reagentes químicos e referem-se as principais causas da instabilidade da brancura.

A metodologia experimental e os respectivos resultados são apresentados no capítulo 5 e 6, onde se explicam os diversos ensaios realizados, com respectivas condições e posterior

discussão dos resultados obtidos. Neste capítulo faz-se ainda um breve estudo da viabilidade económica do processo, comparando as diferentes sequências de branqueamento.

No capítulo 7 apresentam-se as conclusões resultantes deste trabalho bem como a proposta de outros estudos possíveis de se concretizar, de modo a complementar os estudos que se têm vindo a realizar nestes processos. Finalmente apresentam-se as referências bibliográficas utilizadas para a realização da presente dissertação.

Existe ainda no final do trabalho uma secção de anexos onde se apresentam os inúmeros resultados obtidos, bem como os procedimentos experimentais detalhados e cálculos efectuados.

2. COMPOSIÇÃO DA MADEIRA

Como já foi referido, a principal matéria-prima para a produção de pasta e papel é a madeira, sendo esta constituída essencialmente por substâncias de elevado peso molecular, como celulose, hemiceluloses e lenhina, complementada por compostos inorgânicos (como as cinzas) e por compostos orgânicos de baixo peso molecular designados por extractáveis, (Figura 1). É um material de origem biológica, higroscópico, resistente, biodegradável e anisotrópico (Sjöström, 1981). A sua constituição depende muito da espécie, da sua localização geográfica, da sua idade, entre outros factores.

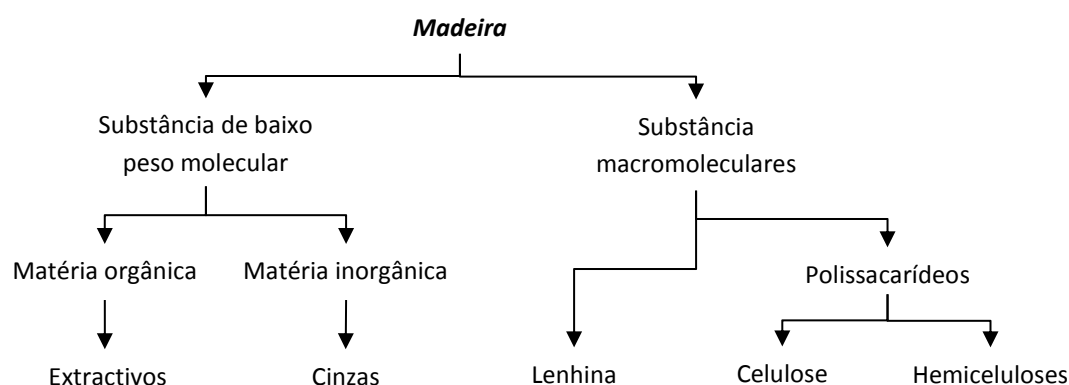


Figura 1: Constituição da madeira (adaptado de Fengel & Wegener, 1984)

Na Tabela 1 encontram-se as divisões de diferentes árvores por grupo e classe. As árvores do tipo folhosas são constituídas por fibras libriformes, parênquima axial e radial e distinguem-se principalmente das resinosas, pela existência de vasos, que transportam a matéria orgânica, proporcionando uma maior porosidade. As folhosas possuem fibras de dimensões menores do que as resinosas, proporcionando assim papéis com melhor formação e maior conformidade das fibras, enquanto as fibras longas proporcionam papéis de elevada resistência (Holik, 2006). Para além da sua composição química, as suas diferenças morfológicas vão determinar as características finais do papel.

Tabela 1: Características e exemplos de diferentes tipos de árvores (adaptado de Sjöström, 1981)

<i>Árvores</i>		
Grupo	Angiospérmicas	Gimnospérmicas
Classe	Dicotiledóneas ou Folhosas (<i>Hardwood</i>)	Coníferas ou Resinosas (<i>Softwood</i>)
Fibra	Curta (0,5 e < 2mm)	Longa (> 2 – 5 mm)
	Têm vasos	Não têm vasos
Exemplos	Eucalipto, Bétula, Acácia	Pinheiro, Abeto, Cipreste

Na presente dissertação irão ser focados apenas os três constituintes presentes em maior percentagem na madeira, a celulose, as hemiceluloses e a lenhina.

2.1 Celulose

A celulose é um polímero linear, incolor, de elevada massa molecular, composto por muitos monómeros de D-glucose, que lhe conferem um elevado grau de polimerização, até 10000, fazendo com que seja o polissacarídeo menos degradado nos processos de cozimento e de branqueamento (Roberts, 1996). Este é insolúvel em água e em soluções alcalinas e é o constituinte maioritário da madeira, ocupando cerca de 30 a 50% da massa seca total (Sjöström, 1981). Na Figura 2 encontra-se representada a estrutura molecular da celulose, constituída pelos monómeros de β -D-glucose ligados por ligações (1 \rightarrow 4) – glicosídicas, sendo a unidade estrutural repetida a celobiose (Sixta, 2006; Sjöström, 1981). Os grupos hidroxilos nas extremidades da cadeia têm comportamentos diferentes, sendo que numa extremidade o grupo tem caracter redutor e noutra extremidade tem caracter não redutor (Kirk et al., 2004). Devido aos grupos hidroxilo existentes nos monómeros de glucose, ocorre a tendência a formarem-se pontes de hidrogénio intra e intermoleculares que resultam numa organização complexa, conferindo às fibras uma grande resistência e estabilidade (Kirk et al., 2004; Klemm et al., 1998).

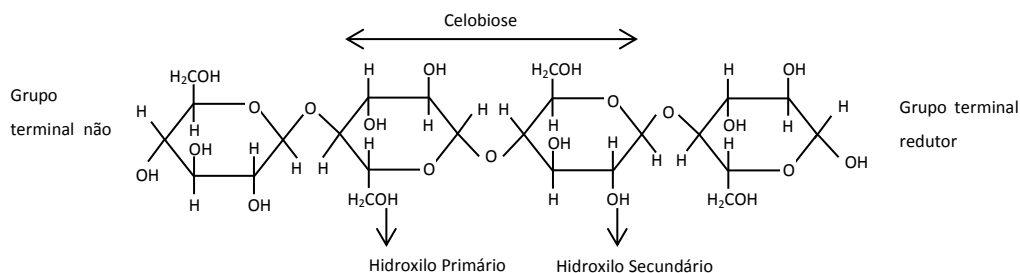


Figura 2: Unidade de repetição da celulose e seus grupos terminais (adaptado de Smook, 2002)

A fibra de celulose é constituída pelo agrupamento de duas regiões distintas, a região amorfa e a região cristalina, formando fibrilas que agrupadas dão origem a microfibrilas. Pode dizer-se que a celulose representa o esqueleto da célula vegetal, encontrando-se rodeada de hemiceluloses e por material incrustante como a lenhina (Sjöström, 1981). Estas duas regiões distintas conferem características importantes à celulose, tal como a sua capacidade hidrofílica e a sua capacidade de intumescência inter e intra fibrilar. Estas propriedades são responsáveis pelo aumento de volume da fibra, retendo as moléculas de água no seu interior (Sjöström, 1981).

2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos de configuração irregular, hidrofílico, amorfo e de menor peso molecular que a celulose, presente na madeira num teor entre 15 a 30% (Sjöström, 1981). O grau de polimerização é mais baixo do que o da celulose, cerca de 200 e tem um arranjo estrutural mais desorganizado. Têm um elevado potencial de ligação à água devido à sua estrutura amorfa, deixando os seus grupos OH mais acessíveis o que as torna mais facilmente solúveis e degradáveis. Por este motivo as hemiceluloses são bastante afectadas nas operações de cozimento e branqueamento, sofrendo uma maior degradação do que a celulose.

Os principais monómeros dos componentes hemicelulósicos são as hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), as pentoses (D-xilose, L-arabinose) e pequenas quantidades de ácidos glucurónicos como os ácidos 4-O-metil-D-glucurónico (Sjöström, 1981). As hemiceluloses têm diferentes designações consoante o monómero que se encontra presente em maior quantidade: as galactoglucomananas, arabinoglucuronoxilanas, arabinogalactanas, glucuronoxilanas e as glucomananas são as mais importantes (Rowell, 2012). A sua constituição e quantificação diferem de espécie para espécie: no caso das resinosas as galactoglucomananas predominam e nas folhosas são as glucuronoxilanas, designadas habitualmente por xilanas, que se encontram em maior quantidade. Na Tabela 2, encontram-se as diferentes constituições das árvores resinosas e folhosas.

Tabela 2: Constituição das hemiceluloses de cada classe (adaptado de Sjöström, 1981)

	<i>Hemiceluloses</i>	<i>Percentagem</i>
<i>Resinosas</i>	Galactoglucomanana (O-acetil-galactoglucomanana)	20%
	Arabinoglucuronoxilana (arabino-4-O-metilglucuroxilana)	5 – 10%
<i>Folhosas</i>	Glucuronoxilana (O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana)	15 – 30%
	Glucomananas	2 – 5%

Como a matéria-prima estudada nesta dissertação é o eucalipto, apenas se irão detalhar as hemiceluloses que constituem as árvores do tipo folhosas.

A glucuronoxilana, O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana, ou simplesmente xilana, é constituída por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) e ramificada por ácidos metilglucurónicos e grupos acetilo, como se pode ver na Figura 3. Em média, estão presentes sete grupos acetilo por cada dez unidades de xilose e por cada dez unidades de xilose existe uma ligação 1 \rightarrow 2 com uma unidade de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico (Kirk et al., 2004). Como nas árvores do tipo folhosa existe uma maior percentagem de xilanas, estas vão ser mais ricas nestes ácidos do que as resinosas.

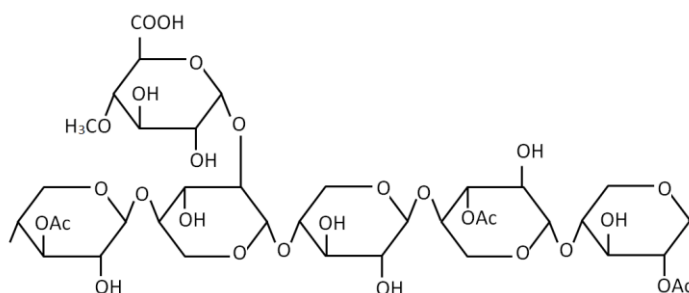


Figura 3: Estrutura da O-acetil-4-O-metilglucuronoxilana

No *Eucalyptus globulus* a estrutura da glucuronoxilana é um pouco mais complexa do que a encontrada noutras folhosas, como mostra a Figura 4, apresentando diferentes ramificações com galactose e glucose na sua composição (Evtugin et al., 2003).

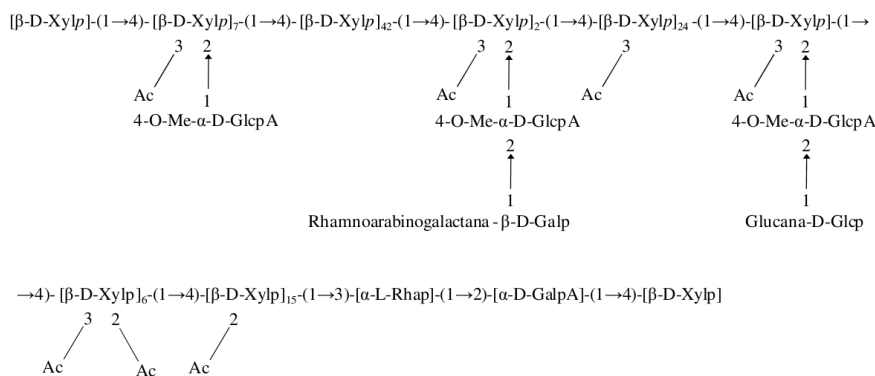


Figura 4: Modelo estrutural da glucuroxilana do *E. globulus* (autorizado por Evtuguin et al., 2003)

Na Figura 5 apresenta-se a estrutura das glucomananas. Estas estão presentes em muito menor quantidade nas *hardwoods*. Possuem uma estrutura linear, com poucas ramificações e são compostas por unidades de β – D – glucopirranose e de β – D – manopirranose ligadas também por ligações β (1→4).

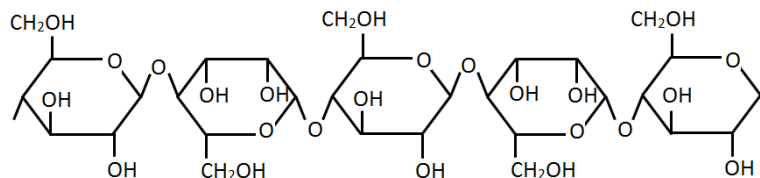


Figura 5: Estrutura da glucomanana

2.3 Lenhina

A lenhina é uma macromolécula aromática, cromófora, de elevada rigidez, com uma estrutura bastante complexa, formada a partir de reacções de acoplamento aleatório de unidades de fenilpropano. Este polímero fenólico é amorfo e grande parte está concentrada na lamela média, sendo esta a responsável por unir as fibras entre si. É constituída por ligações duplas insaturadas e de estrutura reticulada. Esta é formada por reacções de acoplamento, por precursores biossintéticos, como os álcoois *p*-cumarílico, *p*-coniferílico e *p*-sinapílico, apresentados na Figura 6 (Fengel & Wegener, 1984; Sjöström, 1981). Conforme ela possua dois, um ou nenhum grupo metoxilo, assim a lenhina terá a designação do tipo seringilo (S), guaiacilo (G) ou *p* – hidroxifenilo (H), respectivamente.

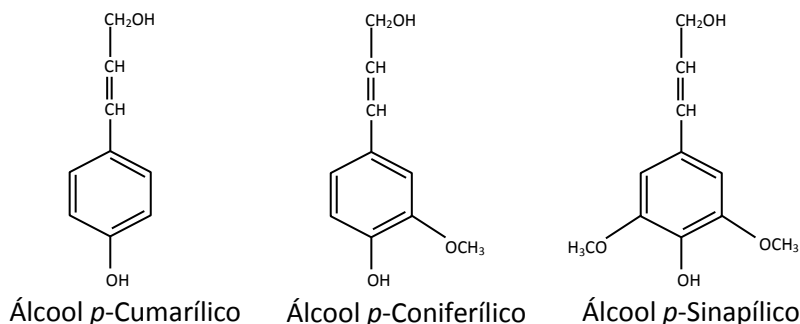


Figura 6: Precursores da lenhina

A lenhina é o principal constituinte que se pretende extrair nos processos de cozimento e de branqueamento. A sua presença torna a estrutura fibrosa coesa e a sua remoção é bastante complexa. É um composto muito instável que sofre processos de oxidação, tornando-se escura e provocando o amarelecimento do papel, prejudicando as suas propriedades finais (Sixta, 2006). A lenhina varia consoante a espécie da madeira em causa, sendo a madeira das resinosas constituída maioritariamente por unidades de *guaiacilo* (G) e as folhosas por unidades de *guaiacilo* (G) e *siringilo* (S) em porções variáveis (Dence & Reeve, 1996).

A ligação entre as unidades aromáticas determina a facilidade da deslenhificação: quando existem ligações do tipo éter, a estrutura da lenhina é mais aberta sendo por isso as ligações mais fáceis de quebrar; por outro lado, as ligações carbono-carbono aproximam mais os monómeros entre si, tornando a lenhina mais condensada e dificultando assim o processo de cozimento. No caso do *Eucalyptus globulus* a razão de *siringilo* e *guaiacilo* (S/G) é bastante elevada comparativamente às outras espécies de folhosas, o que se traduz em lenhinas menos condensadas e numa maior reactividade durante o cozimento (Carvalho, 1999). Na Tabela 3 apresentam-se as diferentes proporções nas diferentes espécies.

Tabela 3: Proporção de H:G:S nas árvores resinosas e folhosas (Pinto, 2005)

<i>Resinosas</i>		<i>Folhosas</i>	
<i>Picea glauca</i>	1:99:0	<i>Eucalyptus globulus</i>	2:14:84
<i>Sequoia sempervirens</i>	5:95:0	<i>Eucalyptus urograndis</i>	4:30:66

Na Tabela 4, são apresentadas gamas de variação de composições químicas das classes distintas de madeira e em particular para o *Eucalyptus globulus*. Há que referir que existe uma grande variabilidade entre as árvores da mesma espécie, sendo que os valores apresentados são a título ilustrativo. No caso do eucalipto existe uma enorme complexidade e variabilidade inter e intra-específica, sendo que os valores apresentados para o *E. globulus* podem variar bastante (Ferreira, 2000). Contudo, é evidente o seu elevado teor em celulose e baixo teor em lenhina dentro das *hardwoods*.

Tabela 4: Composição química (adaptado de Sjöström, 1981)

Constituintes (w/w %)	<i>Softwoods</i>	<i>Hardwoods</i>	<i>E. globulus</i>
Celulose	33 - 42	38 - 51	51
Hemiceluloses			
Glucuronoxilanas	-	20 - 30	20
Galactoglucomana	14 - 20	-	-
Glucomanana	-	2 - 3	1
Arabinogluconoxilana	7 - 11	-	-
Lenhina	27 - 32	21 - 31	21
Extractáveis	2 - 5	1 - 5	3

3. PROCESSO DE COZIMENTO KRAFT

O presente trabalho baseia-se em pastas químicas provenientes de *Eucalyptus globulus*. Importa fazer então uma breve referência às reacções mais relevantes e ao principal objectivo deste processo de cozimento. O cozimento consiste num processo químico que visa transformar as aparas de madeira em pasta, pela degradação e solubilização da lenhina, conseguindo a individualização das fibras. Aqui pretende-se remover a maior parte da lenhina sem haver uma grande degradação dos polissacarídeos, podendo isto se traduzir como a selectividade do cozimento.

Existem diferentes tipos de processos químicos para a produção de pasta, entre os quais, os processos alcalinos e os processos ácidos. A sua diferença está no tipo de reagente químico activo durante o cozimento. Todos estes cozimentos químicos, como foi referido anteriormente, têm um baixo rendimento, à volta dos 45 – 55%, devido à remoção da maior parte da lenhina, como se pode ver ilustrado na Figura 7. Os valores apresentados são meramente a título ilustrativo.

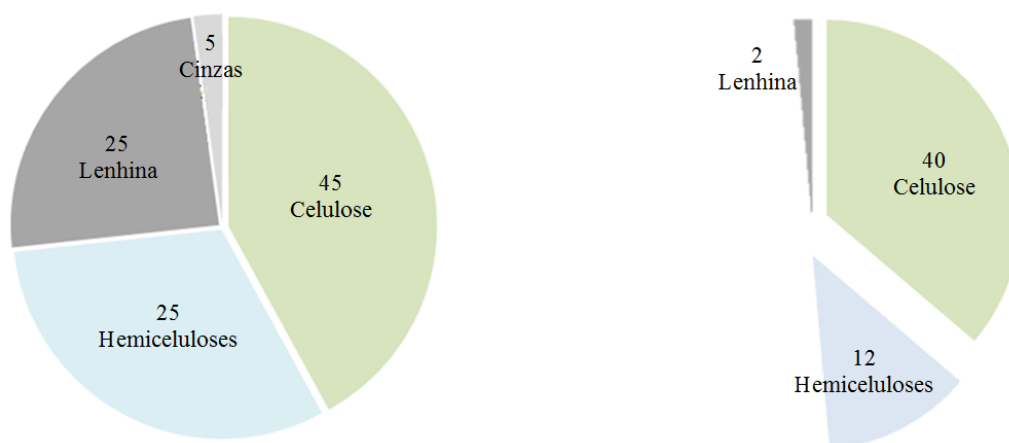


Figura 7: Representação esquemática da composição da madeira antes e após o cozimento kraft (considerando apenas valores aproximados e simplistas)

Globalmente o processo de cozimento dominante é o cozimento *kraft*, também conhecido como processo ao sulfato, correspondendo este último aproximadamente a cerca de 80% da produção mundial de pasta celulósica (Kirk et al., 2004). É um processo alcalino que pode ser aplicado a uma extensa variedade de espécies de madeira, independentemente das suas propriedades físico-químicas. Este processo apresenta vantagens, tais como: boa qualidade da pasta produzida, a simplicidade, menor tempo de cozimento em comparação aos outros processos existentes e a auto-suficiência, conseguindo recuperar e reutilizar os produtos químicos utilizados no cozimento, o que o torna mais viável a nível económico e mais competitivo. No entanto também é detentor de desvantagens, como a libertação de odores desagradáveis e rendimentos baixos causados pelas perdas dos polissacarídeos.

Sumariamente, o processo de produção de pasta *kraft* inicia-se com o descasque e o corte dos troncos de madeira em aparas com dimensões adequadas ao cozimento de forma a uma

melhor penetração e difusão dos reagentes. As aparas são enviadas para um digestor, juntamente com uma solução rica em hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S), designada por licor branco, onde se dá o cozimento à volta dos 150 – 175 °C, por um período de 1 a 3 horas. Nesta etapa é onde se degrada a maior parte da lenhina das fibras de celulose, dissolvendo-se esta no licor. Daqui resulta uma pasta designada por pasta *kraft*, já livre da maioria da lenhina e uma solução denominada por licor negro. Esta designação resulta da sua cor escura provocada pela dissolução da lenhina. Por fim o licor negro segue para uma bateria de evaporadores onde depois é enviado para a caldeira de recuperação, onde vai ser usado para a produção de energia. Na caldeira queima-se o material orgânico, recuperando-se energia e os inorgânicos originam o *smelt*², que vai ser usado nos processos posteriores de caustificação para a recuperação dos químicos nele contidos. Por outro lado, a pasta segue para o estágio de lavagem e crivagem de modo a remover impurezas nela contidas sendo por fim encaminhada para o processo de branqueamento.

3.1 Reacções com a lenhina

A remoção e solubilização da lenhina são conseguidas através da fragmentação das suas macromoléculas durante o cozimento. O processo de desfragmentação é bastante complexo e pouco compreendido devido à complexa estrutura da lenhina. Esta fragmentação dá-se pela quebra das ligações éter e ligações carbono – carbono, representadas nas Figuras 8 e 9. As mais fáceis de quebrar são as ligações éter, nomeadamente as α e β – arílica; as outras ligações são mais estáveis e por isso mais difíceis de quebrar. Neste processo de deslenhificação o peso molecular da lenhina é reduzido tornando-se mais hidrofílica, sendo os seus fragmentos solubilizados no licor negro.

As quebras das ligações éter são causadas pelas espécies activas do cozimento, provenientes do licor branco, como os iões hidróxido (OH⁻) e hidrossulfureto (HS⁻). O ião OH⁻ ajuda na quebra das ligações, através da ionização dos grupos fenólicos, favorecendo a eliminação do substituinte na posição α ou em estruturas com ligações duplas conjugadas com o anel, do substituinte na posição γ . As ligações éter α – arilo são facilmente separáveis, enquanto as éter β – arilo necessitam de condições operatórias mais drásticas e necessitam inclusive da presença do ião HS⁻ que actua como catalisador da reacção.

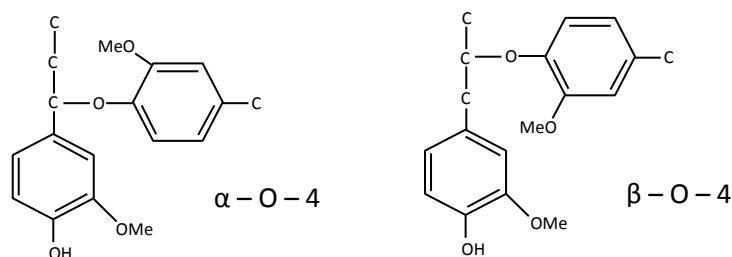


Figura 8: Representação das ligações éter β -O-4 e α -O-4 na lenhina

² *Smelt* – resíduo inorgânico fundido formado após a queima do licor negro.

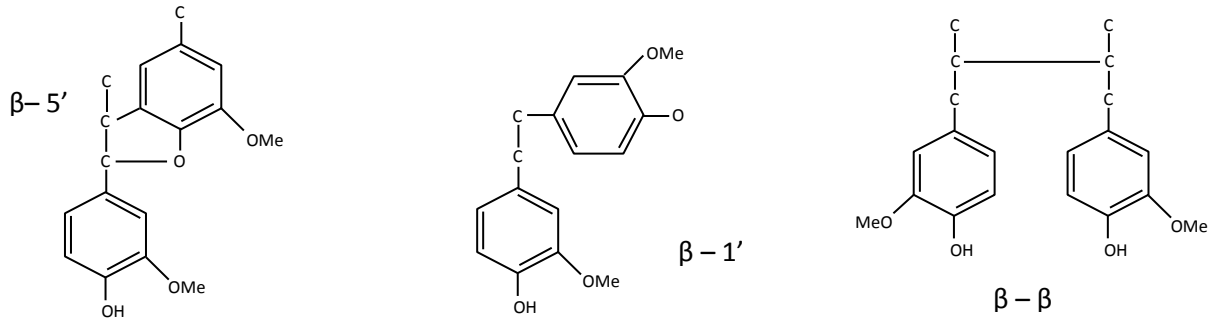


Figura 9: Representação das ligações carbono – carbono β – 5', β – β e β – 1'

Provenientes da madeira nativa ou formadas durante o cozimento encontram-se as ligações entre os polissacarídeos e a lenhina na parede da fibra, denominadas por complexos LCC, como representado na Figura 10 (Kirk et al., 2004). Estas ligações covalentes entre as hemiceluloses (glucomanana e xilana) e a lenhina prejudicam o processo de branqueamento consumindo reagentes e promovendo a instabilidade da brancura. Têm sido propostas diversas ligações possíveis, sendo as mais comuns e referenciadas as ligações do tipo éster e as ligações do tipo éter. Como mostra a Figura 10 a ligação éster envolve a ligação da lenhina a um grupo carboxilo do ácido glucurónico da xilana sendo estas ligações facilmente hidrolisáveis em meio alcalino (Carvalho, 1999; Loureiro, 2012). Por outro lado, as ligações éter são estáveis em meio alcalino não sofrendo grande degradação durante o cozimento *kraft*.

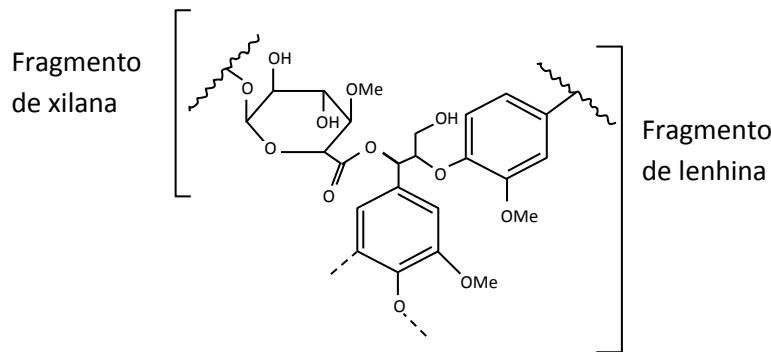


Figura 10: Exemplo de ligação do tipo éster benzílico entre lenhina e xilana (adaptado de Kirk et al., 2004)

3.2 Reações com os polissacarídeos

A lenhina não é o único polímero a ser degradado no processo de cozimento, sofrendo os polissacarídeos também alguma degradação. A sua reactividade no processo depende essencialmente da sua estrutura e da acessibilidade que o licor do cozimento tem ao interior das fibras. Além disto, depende também do pH, temperatura e concentração dos reagentes durante o cozimento. A celulose, devido ao seu elevado grau de polimerização e à sua estrutura cristalina, é a menos atingida. As hemiceluloses por sua vez são as mais atacadas devido ao seu grau de polimerização ser inferior e pelo seu amorfismo.

No início do cozimento, as perdas dos polissacarídeos são mais evidentes quando comparadas com a lenhina. Aqui ocorre a desacetilação e a dissolução das hemiceluloses juntamente com as reacções de *peeling*. As reacções de *peeling* consistem na remoção gradual de monómeros

redutores da cadeia, como se exemplifica na Figura 11. O polímero de celulose pode perder cerca de 50 a 60 unidades terminais nestas reacções e são estas as grandes responsáveis pela perda de rendimento.

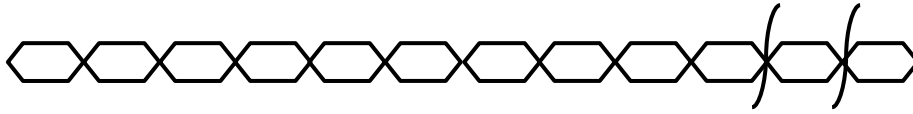


Figura 11: Esquemática da reacção de *peeling* na cadeia de celulose

Estas reacções são interrompidas pelas reacções de estabilização, denominadas por reacções de *stopping*, que consistem em converter o grupo terminal redutor em ácido carboxílico, estável em meio alcalino. Estas são favorecidas por altas temperaturas e impedem a eliminação dos monómeros terminais da cadeia de celulose.

Por fim, com temperaturas superiores a 150°C ocorre a hidrólise alcalina aleatória, das ligações glicosídicas, como esquematizado na Figura 12. Esta hidrólise faz com que a cadeia de celulose seja quebrada aleatoriamente em qualquer ponto da ligação, contribuindo assim para a diminuição do seu tamanho e conseqüente diminuição do grau de polimerização. Estas proporcionam reacções de *peeling* secundário, uma vez que a quebra da cadeia leva a que novos pontos redutores fiquem susceptíveis de serem degradados. Ocorre nesta fase uma diminuição no rendimento, devido à solubilização dos fragmentos mais pequenos dos polissacarídeos, provocando ainda uma diminuição na viscosidade da solução polimérica.

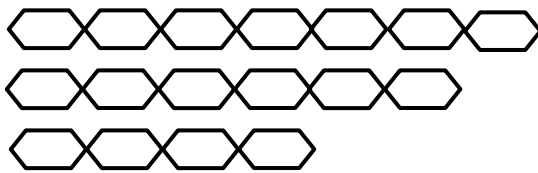


Figura 12: Esquemática da redução do tamanho aleatório na cadeia de celulose

As hemiceluloses como já se referiu, são mais susceptíveis de serem degradadas no cozimento. No caso particular das *hardwoods* consideram-se as xilanas e as glucomananas, sendo as últimas degradadas e dissolvidas, quase na totalidade, no licor de cozimento. As xilanas, no entanto, são mais resistentes ao cozimento alcalino, conservando-se à volta dos 50% o teor da sua quantidade inicial. É durante a fase principal do cozimento, com temperatura e alcali elevado, que a maioria das xilanas é degradada e/ou dissolvida no licor de cozimento. Para além da hidrólise aleatória das cadeias e das reacções de *peeling* referidas acima para a celulose, ocorrem reacções de desacetilação e formação de unidades insaturadas, como os ácidos hexenurónicos (HexA) (Buchert et al., 1995). Os HexA formam-se a partir dos ácidos 4-O-metilglucurónicos presentes nas xilanas, através da perda do grupo metilo, como mostra a Figura 13 (Buchert et al., 1997; Dhiman et al., 2008; Sixta, 2006; Valls et al., 2011). A sua formação é influenciada pelas condições em que ocorre o cozimento, como a quantidade de alcali activo, índice sulfidez e temperatura e a sua quantidade é dependente da espécie de madeira em causa, sendo que as *hardwoods* vão ser mais ricas nestes ácidos insaturados do que as resinosas pois a madeira contém uma maior quantidade de ácidos 4-O-

metilglucurónicos do que as *softwoods* (Buchert et al., 1995; Sixta, 2006). No entanto, no decorrer do cozimento cerca de 60% dos HexA são degradados (Sixta, 2006).

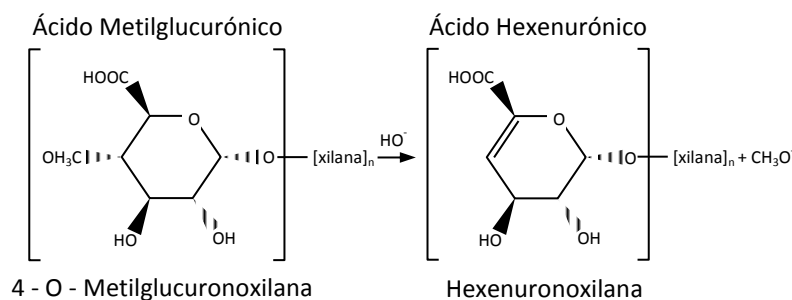


Figura 13: Formação do ácido hexenurónico durante o cozimento, a partir do ácido metilglucurónico ligado ao polímero de xilose (adaptado de Jiang et al., 2000)

Apesar de serem compostos incolores a presença dos HexA é muito problemática podendo ser a causa da formação de estruturas coradas presentes na pasta (Simeonova et al., 2007). São compostos com ligações duplas conjugadas, que lhe conferem uma grande afinidade para iões na pasta, tornando-se muito reactivos com os reagentes de branqueamento electrofílicos. Os HexA são indesejáveis, na medida em que incitam o consumo dos reagentes de branqueamento, como é o caso do dióxido de cloro e são apontados como um dos responsáveis pela reversão da brancura, levando a uma maior instabilidade da pasta (Sixta, 2006). Estes facilitam a formação de ácido oxálico, causando também um aumento no índice kappa³ (IK) devido à sobrevalorização da lenhina (Fillat et al., 2012). Por todos estes factores torna-se de elevada importância a remoção destes compostos da pasta antes do processo de branqueamento. Sendo a formação dos HexA inevitável no cozimento alcalino e a sua degradação em condições drásticas não ser aconselhada durante este processo (devido à consequente degradação da celulose), a sua remoção tem sido conseguida por utilização de reagentes de branqueamento que promovam ataques electrofílicos, como o dióxido de cloro, ozono ou cloro (aumento o seu consumo) ou por estágios de hidrólise ácida, os quais provocam uma maior perda de rendimento (Ventorim et al., 2009).

3.3 Etapas do Processo de Cozimento

O cozimento apresenta três etapas distintas: a inicial, a principal e a residual. Na Figura 14 é possível ilustrar um resumo das reacções que ocorrem durante o cozimento *kraft*. A primeira fase do cozimento, designada por etapa inicial, ocorre a temperaturas inferiores a 140°C, é controlada pela difusão dos reagentes. Parte dos polissacarídeos são aqui degradados e apenas 20% da lenhina é afectada. É na etapa principal onde se consegue uma maior selectividade do cozimento, isto é, uma maior degradação da lenhina, sem uma degradação muito acentuada dos polissacarídeos. Esta etapa ocorre a temperaturas superiores a 140°C, removendo-se cerca de 90% da lenhina. Por fim na última etapa, denominada por etapa residual, as reacções de deslenhificação ficam muito lentas, levando a uma remoção muito baixa de lenhina. Aqui é aconselhável parar o cozimento uma vez que a degradação dos polissacarídeos continua, sem

³ Índice kappa indica o valor do teor de lenhina residual

haver uma remoção correspondente da lenhina. Em seguida, apresentam-se as reacções mais pormenorizadas da lenhina e dos polissacarídeos no cozimento.

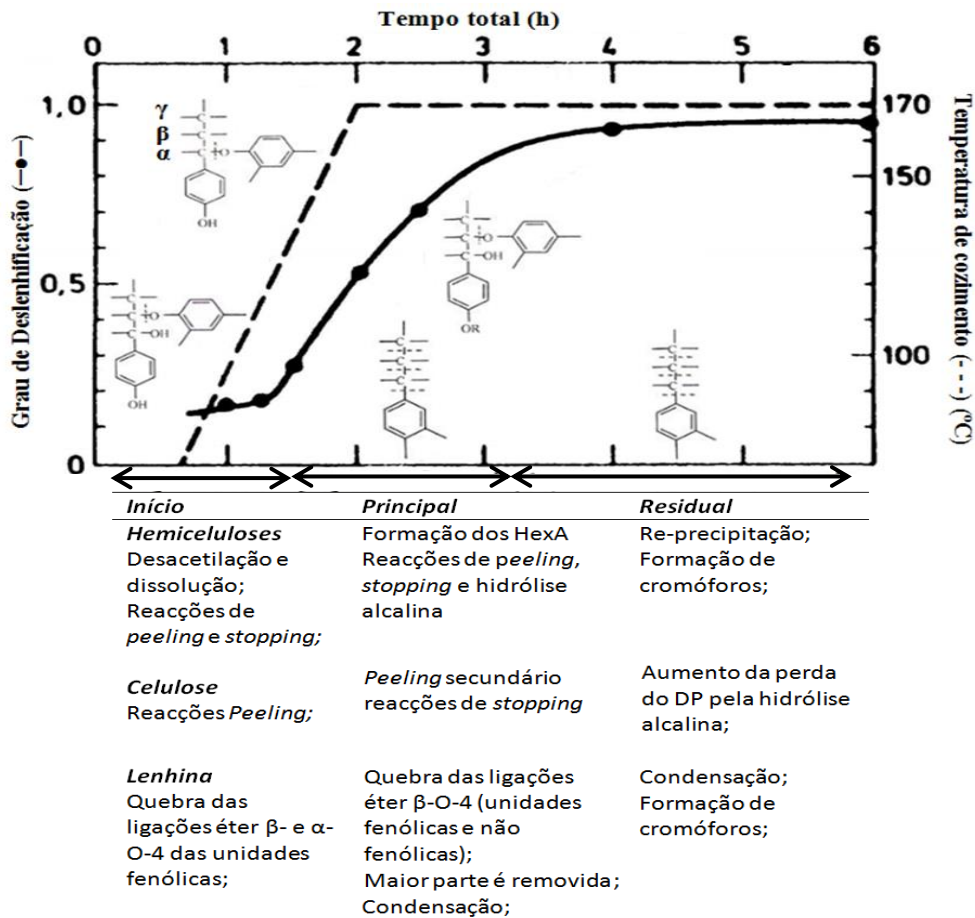


Figura 14: Etapas do cozimento e respectivas rupturas de ligações químicas na lenhina (adaptado de Carvalho, 1999; Loureiro, 2012)

4. BRANQUEAMENTO DE PASTAS KRAFT

Os papéis que se destinam à impressão e escrita de elevada qualidade carecem de um processo de branqueamento das fibras após o cozimento. Este processo consiste em reduzir a concentração de compostos absorventes de luz, tal como a lenhina residual (Dence & Reeve, 1996). Apesar do objectivo do cozimento ser igualmente a remoção da lenhina, na etapa residual há uma diminuição da selectividade, levando a uma contínua degradação dos polissacarídeos, sem uma remoção significativa da lenhina (Sixta, 2006). Por esta razão é necessário um processo mais selectivo para remover as pequenas quantidades de lenhina residual que a pasta ainda contém após o cozimento (“pasta crua”). Para isso recorre-se ao branqueamento, onde se consegue a sua remoção, sem haver um ataque tão intenso aos polissacarídeos, preservando as propriedades de resistência e o rendimento do processo, obtendo-se “pasta branqueada” (Sjöström, 1981).

A brancura de folhas de pasta ou do papel mede-se através da definição implementada pela *International Organisation for Standardisation*, que se designa como Brancura ISO, sendo a medida da reflectância da luz visível quando se incide sobre a pasta um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm (Sixta, 2006). A lenhina e os seus compostos cromóforos são os principais responsáveis pela absorção de luz na pasta crua (~40% de brancura ISO), sendo por isso necessário a sua remoção, tornando a pasta menos absorvedora de luz. Os principais objectivos nos processos industriais de produção de papel de impressão e escrita passam por atingir um nível de brancura adequado às exigências do mercado (cerca de 90 - 92% ISO), proporcionando simultaneamente uma elevada estabilidade na brancura conseguida. Estes objectivos devem ser conseguidos sem comprometer as propriedades de resistência do produto final (Dence & Reeve, 1996).

O processo de branqueamento de modo a atingir um grau de brancura superior a 88% ISO, não pode ser realizado num único estágio, devido à incapacidade de combinar simultaneamente o ganho de brancura com a eficiência de remoção do material oxidado (Sixta, 2006; Suess, 2010). Deste modo é pertinente recorrer-se a vários estágios, sendo por isso designado por um processo de multi estágios, como se ilustra na Figura 15 a). Entre cada estágio de tratamento, a lenhina degrada é extraída através de uma lavagem alcalina. São estes multi estágios que determinam a sequência de branqueamento, sendo que o primeiro é classificado como etapa de deslenhificação e os últimos são classificados como estágios de branqueamento (Sixta, 2006). À medida que o processo de branqueamento progride, a sua eficiência vai diminuindo, como se pode ver na Figura 15 b). A eficiência do branqueamento está relacionada com a quantidade de químicos consumidos por unidade de lenhina removida. A sua diminuição ocorre devido à dificuldade em se conseguir um ganho de brancura sem prejudicar demasiado a resistência da pasta. Outro parâmetro relacionado com a eficiência de branqueamento é a sua selectividade, isto é, o ganho de brancura que se consegue com a mínima degradação dos polissacarídeos (Dence & Reeve, 1996). Este parâmetro relaciona-se com a viscosidade de soluções de pasta, como se pode observar na Figura 15 c), quanto maior

for a degradação dos polissacarídeos menor será a sua viscosidade, derivada à quebra da cadeia do polímero presente em maior quantidade, ou seja, a celulose.

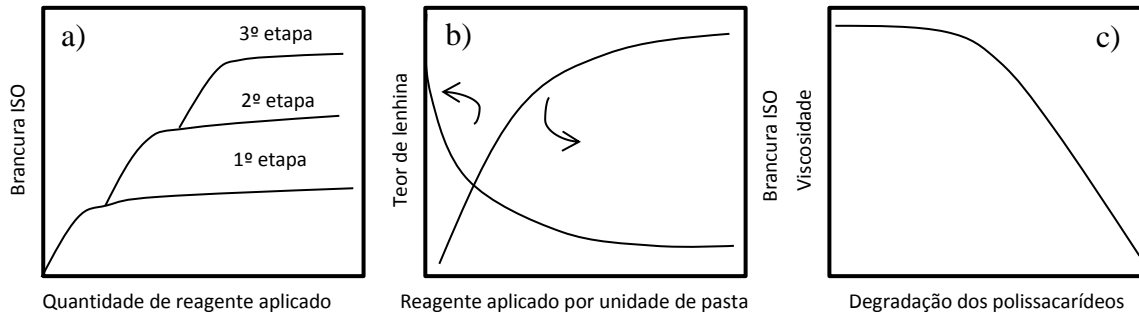


Figura 15: a) Brancura hipoteticamente atingida vs consumo de reagentes; b) Eficiência no branqueamento da pasta; c) Viscosidade da pasta em função dos polissacarídeos (adaptadas de Biermann, 1996; Dence & Reeve, 1996)

A remoção da lenhina proporciona uma melhor ligação entre as fibras reflectindo-se numa melhor resistência do papel. No entanto os químicos usados para esta remoção provocam a diminuição da cadeia de celulose, resultando assim numa menor resistência final do papel. Posto isto, uma eficiência de branqueamento óptima seria a remoção completa da lenhina residual com uma brancura irreversível, sem comprometer demasiado a degradação dos polissacarídeos (Loureiro, 2010). A maior ou menor facilidade de branqueamento depende do teor de lenhina e da sua natureza na pasta que se pretende branquear, da espécie da madeira, e da sequência de branqueamento.

4.1 Reagentes Químicos

No passado, o processo de branqueamento de pasta tinha como principal objectivo a eliminação da maior parte da lenhina, utilizando para isso reagentes eficazes nessa remoção, sem preocupações secundárias como a deterioração químico-mecânica das fibras ou os danos no meio ambiente. Este processo teve início por volta da segunda metade do século 19, onde o primeiro reagente usado foi o hipoclorito (H, NaOCl). Porém, causava demasiados danos na resistência final da pasta e não promovia uma brancura adequada. Desta forma, houve a necessidade de procurar outras alternativas, surgindo então por volta de 1930 o branqueamento com cloro elementar (C). Este provocava uma despolimerização mais selectiva da lenhina atingindo níveis de brancura elevados, dando origem contudo a compostos prejudiciais ao meio ambiente (Biermann, 1996). O dióxido de cloro (D) foi aplicado pela primeira vez em 1946 no branqueamento, mostrando ser extremamente mais selectivo comparativamente aos usados até então (Dence & Reeve, 1996). Era porém, bastante mais dispendioso, sendo por isso apenas utilizado nos últimos estágios de branqueamento, onde a concentração da lenhina era baixa. Uma vez que produz compostos organoclorados em muito reduzida quantidade (comparativamente ao cloro) a sua utilização foi intensificada ao longo dos anos não só por razões ambientais mas também técnicas. Com este agente consegue-se uma elevada brancura, sem uma degradação acentuada dos polissacarídeos, contribuindo assim para uma pasta de grande resistência. O oxigénio (O) como aplicação industrial em processos de branqueamento de pasta teve início nos finais de 1960 e tem vindo a ser reconhecido como um agente de pré-branqueamento bastante útil quando colocado entre

o final do cozimento e o início de branqueamento, permitindo uma diminuição no consumo dos reagentes posteriores. Este é uma alternativa mais económica e menos prejudicial ao meio ambiente, conseguindo remoções de lenhina à volta dos 35 a 70%, consoante o teor e natureza da lenhina residual. No entanto, em Portugal este não é muito utilizado, uma vez que os custos de implementação são demasiado elevados não compensando a preservação que se consegue dos polissacarídeos, quando se usa dióxido de cloro (Loureiro et al., 2011). Quanto ao peróxido de hidrogénio, teve a sua primeira aplicação em 1940 nas pastas mecânicas e por volta de 1960 em pastas químicas (Dence & Reeve, 1996).

Além destes reagentes usa-se o hidróxido de sódio para extracção alcalina (E), servindo para neutralizar os ácidos do estágio de branqueamento anterior, hidrolisando e solubilizando a lenhina. Este estágio é necessário a fim de remover os grupos carboxílicos e a lenhina degradada. Não havendo esta extracção a lenhina não seria removida, causando um maior consumo dos reagentes dos estágios posteriores e contribuindo para uma maior instabilidade na brancura (Biermann, 1996; Holik, 2006). Esta extracção alcalina pode ser reforçada com oxigénio, (EO) ou E_O, e/ou com peróxido de hidrogénio, (EOP) ou E_{OP}.

Os reagentes apresentados acima são usados sequencialmente, sendo definida a sequência de branqueamento segundo a ordem em que são usados, tal como mostra a Tabela 5. A sua sequência depende do grau de deslenhificação de que se deseja obter, tal como a brancura final e a preservação dos polissacarídeos.

Tabela 5: Sequências de branqueamento adaptado de (Sjöström, 1981)

	<i>Sequência*</i>	<i>Cronologia</i>
<i>Sequências convencionais</i>	H	1800
	HEH	1900
	CEH, CEHEH	1930
	CEDED, CEHDED	1950
	(CD) EHDED	1960
	(CD)(EP)HD(EP)D, OCEDED	1970
	O(CD)(EP)D(EP)D	1980
	O(DC)(EO)D(EP)D	1985
	O(DC)(EPO)D(EP)D	1990

* Os parêntesis indicam que os reagentes são adicionados simultaneamente no mesmo estágio,

Na década de 80 introduziu-se a sequência ECF que não continha cloro elementar na sua composição e rapidamente se tornou o processo dominante de branqueamento (Sixta, 2006). Posteriormente introduziram-se as sequências TCF, que não continham qualquer composto de cloro evitando assim a formação de compostos organoclorados (AOX). Esta sequência inclui, oxigénio (O), peróxido de hidrogénio (P) e ozono (Z) (Sixta, 2006; Valls & Roncero, 2009). Actualmente é considerada a tecnologia ECF – *light* como a melhor técnica disponível, pretendendo a máxima substituição possível do dióxido de cloro pelo peróxido de hidrogénio (Germer et al., 2012). As diferentes combinações de estágios de branqueamento mais recentes encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Diferentes sequências de branqueamento (adaptado de Sousa, 2012)

<i>ECF</i>	<i>ECF - light</i>	<i>TCF</i>
OEDDD ou ODEDP	OQ(PO)(DQ)(PO)	O(ZQ)(PO)
DEDD, DEDP	O(Z(EO))DD	Q(PO)(ZQ)(PO)
DEDED	OQ(PO)DD	OZEqPP
ODED, ODEDED	OD(OP)D(PO)	O(ZQ)(PO)
D(EOP)DD, D(EOP)DP	ODQ(PO)D	E(O)P-EP
D(EOP)PD	OD(EOP)D(PO)	
OD(EOP)DED		
O(DQ)PO		

Na Tabela 7 resumem-se as vantagens e desvantagens de cada um destes reagentes.

Tabela 7: Diferentes Reagentes usados no branqueamento (adaptado de (Dence & Reeve, 1996)

<i>Reagente de Branqueamento que contém Cloro</i>			
	<i>Hipoclorito (NaOCl) - (H)</i>	<i>Cloro (Cl₂) - (C)</i>	<i>Dióxido de cloro (ClO₂) - D</i>
Função	Oxidação, descolorização e solubilização da lenhina	Oxidação e cloração da lenhina	Oxidação, descolorização e solubilização da lenhina
Vantagens	Fácil produção e utilização; baixo custo.	Deslenhificação eficiente e económica.	Atinge brancuras elevadas sem perda de resistência.
Desvantagens	Perda da resistência da pasta	Formação de compostos organoclorados, muito corrosivo	Formação de alguns AOX; muito corrosivo; deve ser preparado no local.
Tipo de Reacção	Nucleofílica	Electrofílica	Electrofílica
<i>Reagente de Branqueamento que não contém Cloro</i>			
	<i>Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) - P</i>	<i>Ozono (O₃) - Z</i>	<i>Oxigénio (O₂) - O</i>
Função	Oxidação e descoloração da lenhina	Oxidação, descolorização e solubilização da lenhina	Oxidação e solubilização da lenhina
Vantagens	Fácil utilização; baixo custo de capital.	Eficiente; produção de efluente livre de cloretos	Baixo custo; efluente livre de cloretos.
Desvantagens	Perda da resistência da pasta quando usado na presença de metais; caro	Caro, provoca degradação da pasta e não é selectivo	Alto custo de capital, perda de resistência se houver presença de metais.
Tipo de reacção	Nucleofílica	Electrofílica	Electrofílica

No desenvolver deste trabalho a pasta usada teve uma sequência de branqueamento de dois e três estágios: DE e DED. Na parte experimental foram usados estágios com peróxido de

hidrogénio (P), dióxido de cloro (D) e finalmente com xilanases (X), sendo por isso aqui referidos em maior detalhe.

4.1.1 Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é um agente oxidativo, usado nos processos de branqueamento em condições alcalinas. Este reagente é bastante versátil, sendo possível usá-lo em qualquer estágio de branqueamento isoladamente (estágio P), bem como reforço na extracção alcalina (E_P ou E_{OP}). O seu objectivo passa por oxidar a lenhina e remover os grupos cromóforos responsáveis pela coloração do papel.

Durante o branqueamento com peróxido de hidrogénio, a principal espécie reactiva é o ião hidroperóxido (HOO^-), formado a partir da reacção apresentada na Equação 1, ($pK_a = 11,6$ a $25^\circ C$) (Dence & Reeve, 1996). Este é extremamente selectivo, capaz de preservar as propriedades físicas da celulose e remover as estruturas cromóforas da lenhina residual, constituídas por quinonas e alfa-carbonilos. Assim, a sua velocidade de branqueamento aumenta com o aumento de pH, levando a que o branqueamento deva ser realizado em condições alcalinas de modo a favorecer a sua formação, como mostra a Equação 1.



Uma das grandes desvantagens do uso de peróxido de hidrogénio no branqueamento é a sua rápida decomposição, como apresentada na Equação 2, acelerada pelos metais de transição (Mn, Fe, Cu).



Por outro lado, em condições alcalinas o peróxido de hidrogénio pode reagir com o ião hidroperóxido provocando a formação de radicais, com se mostra na Equação 3. Estes radicais podem ter um efeito positivo no branqueamento uma vez que são muito reactivos, podendo reagir com a lenhina, mas não são selectivos levando a uma degradação acentuada dos polissacarídeos (Valls et al., 2011).



O peróxido é um composto bastante instável, fazendo com que na presença de metais ele se decomponha rapidamente, levando a perda de viscosidade e brancura da pasta, necessitando assim de uma remoção prévia de metais e impurezas nela contidos, para que o seu uso seja mais eficaz e bem-sucedido. Para evitar ou limitar esta decomposição, o branqueamento deve ser feito sob condições controladas, usando agentes estabilizantes e sequestrantes (Sjöström, 1981). Por isso, o estágio com peróxido de hidrogénio é normalmente aplicado posteriormente a estágios quelantes (Q) ou de lavagens ácidas (A), cujo seu objectivo é a remoção de metais contaminantes da pasta. Nos estágios quelantes são usados normalmente agentes como o EDTA (ácido etilenodiaminatetra-acético) ou o DTPA (ácido dietilenotriaminapenta-acético), que promovem a reacção com os metais incorporando-os nas suas matrizes polidentadas e removendo-os.

O peróxido de hidrogénio pode ser usado em qualquer estágio de branqueamento, pois este reagente tem a capacidade de poder agir como agente deslenhificador ou agir como branqueador da pasta. No entanto, há estudos que mostram que, quando aplicado num estágio final, obtém-se melhores resultados no que diz respeito à estabilidade da brancura (Loureiro, 2010). Como agente deslenhificador, o oxigénio é mais bem sucedido, uma vez que tem maior selectividade e um custo menor associado. Sendo assim, em sequências TCF ou ECF-*light* é comum optar-se por um estágio de pré-deslenhificação com oxigénio e um estágio final de peróxido de hidrogénio. O uso de peróxido nos últimos estágios favorece a estabilidade da brancura e favorece o inchamento da fibra, provocando uma maior facilidade na refinação final da pasta (Loureiro et al., 2011). Foi comprovado que o peróxido tem uma maior eficácia na remoção de grupos quinonas, permitindo assim uma melhor estabilidade na brancura da pasta. A Figura 16 mostra a capacidade que o peróxido de hidrogénio tem na abertura do anel das quinonas, conseguindo as remover facilmente. Este reagente, no entanto não remove os ácidos hexenurónicos, que são, segundo alguns autores, co-responsáveis pela instabilidade da brancura da pasta.

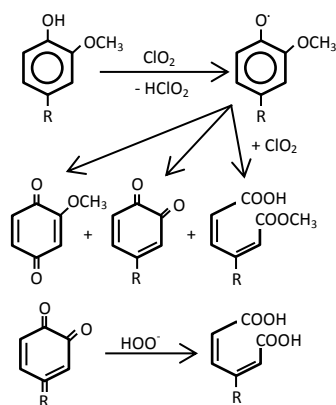


Figura 16: Mecanismo possível de formação de quinonas pelo dióxido de cloro e a sua reacção com o peróxido de hidrogénio (adaptado de Suess et al., 2004)

4.1.2 Dióxido de cloro

O dióxido de cloro é um composto de elevado poder oxidante e de elevada selectividade, sendo considerado entre os reagentes de branqueamento, como o mais selectivo para com a lenhina, reagindo muito pouco com os polissacarídeos (Sevastyanova et al., 2011; Sjöström, 1981). O dióxido de cloro sendo um electrófilo ataca predominantemente os anéis aromáticos da lenhina com grupos hidroxilos fenólicos livres (Chandranupap & Nguyen, 1998).

No processo de branqueamento o dióxido de cloro reage com a pasta sofrendo diferentes estágios de oxidação, decompondo-se em outros compostos de cloro, que podem ou não ser favoráveis ao processo.

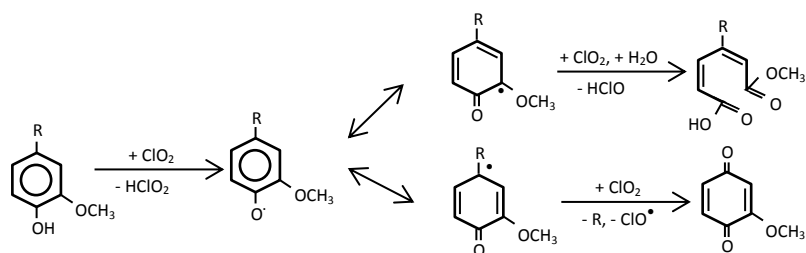


Figura 17: Exemplos de possíveis reacções de oxidação das estruturas fenólicas da lenhina residual com o dióxido de cloro (adaptado de Fengel & Wegener, 1984)

Na Figura 17 é possível observar a oxidação das unidades aromáticas da lenhina pelo dióxido de cloro. A oxidação da lenhina leva à formação do ião clorito (ClO₂⁻) e do ácido hipocloroso (HClO), que quando combinados vão dar origem à formação de cloretos (Cl⁻) e cloratos (ClO₃⁻), como se pode ver apresentada na Equação 4 (Sjöström, 1981). Estes aniões não participam na deslenhificação levando a uma perda de eficiência (Dence & Reeve, 1996).



Em condições ácidas (pH≈2), a reacção é favorecida no sentido inverso, ou seja, no sentido da formação de ácido hipocloroso (HClO) e do ião clorito (ClO₂⁻). Com a reacção neste sentido (Equação 5 e 6) consegue-se um aumento de eficiência do branqueamento (Sixta, 2006):



O ácido hipocloroso encontra-se também em equilíbrio com o cloro (equação 7) e em condições ácidas a reacção desloca-se para a esquerda, promovendo a formação de cloro elementar. Este tem a vantagem de ser um agente despolimerizador da lenhina, mas a desvantagem de provocar a formação de compostos organoclorados.



Em condições alcalinas não ocorre formação de cloratos nem reacções de cloração, no entanto o dióxido de cloro não tem grande acção de deslenhificação. As reacções mais favoráveis ao branqueamento passam por minimizar a formação de cloratos e oxidar o dióxido de cloro em cloretos.

A acção do dióxido de cloro é assim altamente dependente do pH, sendo a sua gama de operação determinante na formação das espécies reactivas do branqueamento (Sevastyanova et al., 2011). É por isso importante promover um pH ácido (2 – 4) durante o branqueamento com dióxido de modo a maximizar a brancura atingida.

O dióxido de cloro, tal como se referiu inicialmente é bastante selectivo, capaz de degradar a lenhina, sem uma degradação acentuada dos polissacarídeos, proporcionando uma maior conservação da viscosidade final da pasta (Sixta, 2006; Sjöström, 1981). Este consegue ainda reagir com os HexA tão ou mais rapidamente do que com a lenhina, promovendo uma remoção eficaz destes compostos. No entanto, apesar da sua selectividade, o dióxido de cloro não consegue uma remoção completa da lenhina, especialmente quando esta se encontra

ligada aos hidratos de carbono, nem consegue uma remoção das quinonas produzidas durante as reacções do dióxido de cloro com a pasta (Sevastyanova et al., 2011). Ao contrário do peróxido de hidrogénio, o dióxido de cloro reage preferencialmente com os grupos fenóis em detrimento das quinonas, provocando uma remoção incompleta destas estruturas e promovendo a formação de estruturas insaturadas nas xilanas. Por isto, o dióxido é muitas vezes considerado como inadequado num último estágio de branqueamento, uma vez que provoca uma maior instabilidade da brancura da pasta (Loureiro, 2012; Suess et al., 2004).

4.2 Enzimas

O branqueamento é uma das etapas do processo de produção de pasta, que mais tem sofrido alterações ao longo do tempo. A optimização do processo, a redução de custos, a qualidade do papel ou o cumprimento de normas ambientais leva a indústria a procurar alternativas tecnológicas. Sendo a madeira um material biodegradável, a aplicação de processos biológicos surge como alternativa aos processos químicos convencionalmente usados (Jurasek & Paice, 1986). Estes processos tecnológicos promovem a aplicação da biotecnologia, fazendo uso de enzimas com o objectivo de diminuir a utilização dos reagentes de branqueamento, tornando o processo mais económico, limpo e ecológico (Fillat et al., 2012; Kirk et al., 2004; Thakur et al., 2012; Valls et al., 2010).

As enzimas são proteínas, produzidas por todos os seres vivos, capazes de participarem em numerosas reacções químicas como catalisadores biológicos (Beg et al., 2001; Dence & Reeve, 1996; Pedersen et al., 1992). Diversas vantagens estão associadas à sua aplicação, tal como a sua elevada selectividade, elevada velocidade de reacção e condições amenas de reacção (Call & Mücke, 1997; Wong & Mansfield, 1999). As enzimas são classificadas pelas reacções que catalisam e são denominadas pelo sufixo ‘-ase’ acrescentado ao nome do seu substrato que descreve a sua actividade. Encontram-se divididas em seis classes, segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Classificação Internacional de enzimas (adaptado de Novozymes®)

<i>Classe</i>	<i>Função</i>	<i>Enzimas Industriais</i>
<i>Oxidoredutases</i>	Reacções de oxidação – redução	Lacases
		Glicose oxidase
		Catalases
<i>Transferases</i>	Transferência de grupos funcionais	Frutossiltransferase
<i>Hidrolases</i>	Reacções de hidrólise	Amilases
		Celulases
		Manases
		Lipases
		Pectinases
<i>Liases</i>	Adição de grupos às duplas ligações duplas ou vice-versa	Xilanases
		Pectase liase
<i>Isomerases</i>	Reacções de isomerização	α -acetolactato decarboxilase
<i>Ligases</i>	Formação de novas moléculas a partir da ligação de duas pré-existentes	Glucose isomerases
		Não existem presentemente.

A maior característica das enzimas é a sua extrema selectividade para o substrato, apenas interagindo com um especificamente e não se ligando nem interferindo com outros (Pedersen et al., 1992). Esta selectividade foi exemplificada pelo modelo chave – fechadura, proposto por Emil Fischer, em 1894 (Nelson & Cox, 2004). Na Figura 18, encontra-se esquematizado o modelo que ilustra a interacção entre a enzima e o substrato. O substrato liga-se apenas a um local específico da enzima, denominado por, centro activo, e esta ligação vai causar modificações no substrato. Sendo as enzimas catalisadores biológicos, estas não são consumidas durante a reacção, libertando os produtos formados e ficando livres para um novo ciclo de reacção (Wong & Mansfield, 1999). Contudo, vão perdendo a sua actividade ao longo do tempo, ou quando sujeitas a condições desfavoráveis.

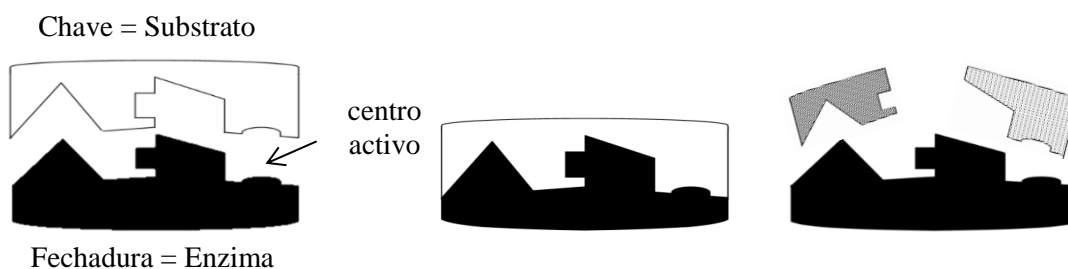


Figura 18: Modelo chave – fechadura

Actualmente as enzimas têm um papel activo nas indústrias de pasta e papel, trazendo vantagens aos processos convencionais, devido à sua biodegradabilidade, não prejudicando o ambiente nem contribuindo para a formação de compostos organoclorados. A preferência pelas enzimas, passa pelo alcance de um desenvolvimento mais sustentável por parte das indústrias, uma vez que provêm de sistemas biológicos, contribuindo para processos menos dispendiosos e menos poluentes, atingindo uma maior eficiência e maior qualidade (Novozymes®, 2010).

Os primeiros estudos realizados com enzimas tiveram como objectivo imitar o processo de decomposição da madeira por fungos de podridão branca (*white-rot fungi*), sendo o *Basidiomycetes* a classe de fungos mais conhecido e mais bem estudada. Estes decompõem especificamente a lenhina não só na madeira como também na pasta (Dence & Reeve, 1996; Eriksson et al., 1990; Sixta, 2006). Além destes organismos, existem os fungos de podridão parda (*brown-rot fungi*), capazes de atacar os polissacarídeos na madeira (Call & Mücke, 1997). Na área da pasta e papel existem essencialmente dois grupos de enzimas: as do tipo oxidativas, como as lenhinases, e as do tipo hemicelulíticas, como as xilanases (Aleksandrova et al., 1998). As enzimas como as celulasas e lipases tem uma aplicação mais direccionada para a produção do papel, enquanto as xilanases e lacases são mais específicas para os processos de branqueamento e deslenhificação (Demuner et al., 2011). Na Tabela 9 encontram-se relatadas as descobertas realizadas com enzimas na área de produção da pasta e papel.

Tabela 9: Cronologia da utilização das enzimas nas indústrias de pasta e papel

<i>Ano</i>	<i>Descoberta</i>	<i>Referência</i>
1942	Uso de hemicelulases (<i>Bacillus</i> e <i>Aspergillus</i>) ajuda na refinação e hidratação das fibras;	(Diehm, 1942)
1959	Uso de celulases (<i>Aspergillus niger</i>) no pré-tratamento de pastas químicas melhoram as propriedades de resistência e diminuem energia de refinação;	(Bolaski, 1959)
1971	Uso de fungos (<i>Fomes Ulmarius</i>) na refinação de pastas mecânicas.	(Trotter, 1990)
1979	Tratamento de pasta crua <i>kraft</i> por culturas de <i>P. Chrysosporium</i> provocava uma deslenhificação parcial. Não ocorria branqueamento, mas provocava uma diminuição de cloro requerido.	(Kirk & Yang, 1979)
1983	Descoberta das lenhinases	(Glenn et al., 1983; Tien & Kirk, 1983)
1986	Pré-branqueamento com xilanases	(Viikari et al., 1986)
1988	O uso de celulosas melhora a drenabilidade e a diminuição de <i>vessel picking</i>	(Fuentes and Roberts, 1988; Uchimoto et al., 1988)
1989	As lipases ajudam a evitar problemas com extractáveis.	(Irie et al., 1993)
1991	Destintagem com celulases e xilanases	(Kim et al., 1991)
1993	Deslenhificação da pasta com lacases	(Call & Mücke, 1997)
1996	Branqueamento com manganês peroxidase	(Harazono et al., 1996)

As celulases são enzimas que hidrolisam a cadeia de celulose, encontrando-se divididas em três grupos: endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) e as β -glucosidases (ou celobiasas, E.C. 3.2.1.21). As duas primeiras enzimas actuam directamente sobre a celulose, originando fundamentalmente glucose e celobiose como produtos de reacção. A celobiose formada é por sua vez hidrolisada em glucose por acção da β -glucosidase. O grupo de celulases estudado mais extensivamente é originário dos *Trichoderma reesei* (Eriksson, 1990). Estas são empregues na indústria de pasta e papel com o objectivo de promoverem modificações na superfície da fibra, de modo a melhorarem a sua refinabilidade, melhorando deste modo as suas propriedades e diminuindo a energia requerida (Bajpai, 1999; Gil et al., 2009). Quando usadas após os processos de refinação, promovem melhorias na drenabilidade da pasta, na máquina de produção de papel e também conduzem a uma melhor *runnability*⁴ do papel. Podem também ser usadas em processos de fibra reciclada ajudando no destintagem pois promovem modificações na superfície da fibra aumentando a afinidade com a água (Gil et al., 2009; Pommier et al., 1989).

⁴ Propriedade de impressão do papel, que traduz a velocidade com que é impresso, sem haver perturbações na máquina.

As lípases (EC 3.1.1.3) são usadas para resolver os problemas com extractáveis existentes, provenientes na pasta, constituídos por ácidos gordos, resinas, entre outros (Mustranta et al., 1995). Estes são problemáticos no processo de cozimento e branqueamento causando o consumo de reagentes e prejudicando a qualidade da pasta. Também podem ser usadas nos processos de destintagem de fibra reciclada, aumentando a limpeza e brancura da pasta e diminuindo o uso de químicos (Hasan et al., 2006).

As hemicelulases são um grupo de enzimas essencialmente constituídas pelas xilanases e as manases. Estas são as enzimas com maior aplicação nos processos de branqueamento. Em 1986, Viikari e seus colaboradores foram os primeiros a verificar que as xilanases melhoravam os processos de branqueamento de pastas *kraft*, e actualmente estas são mesmo consideradas como as enzimas mais eficazes nestes processos (Bajpai, 1999; Viikari et al., 1986). As manases hidrolisam a cadeia de glucomananas, mas são normalmente maiores do que as xilanases, sendo por isso menos eficazes. As xilanases têm-se mostrado eficientes na maioria dos processos e na maioria das pastas, enquanto as manases apenas mostram ser eficazes em pasta de resinosas (Clark et al., 1990). Nas pastas *kraft* de resinosas a proporção de xilanas e glucomananas é semelhante, uma vez que durante o cozimento grande parte das glucomananas foram degradadas e por isso a aplicação destas duas enzimas em conjunto, mostra um aumento na eficiência de branqueamento (Eriksson et al., 1997; Montiel et al., 1999). Além do branqueamento as xilanases ajudam no processo de refinação e retenção de água (Beg et al., 2001).

Além das enzimas referidas nos processos mencionados, a sua aplicação é muito vasta, tendo também vantagens em processos de descascamento, problemas de deposição de lodo nas máquinas de formação de papel, na redução do *vessel picking*, entre outros. A aplicação de enzimas em pastas mecânicas ou em pastas químicas tem consequências diferentes. Quando aplicadas em pastas mecânicas, estas promovem apenas de alterações na parte exterior da fibra, uma vez que a parede é pouco porosa e as enzimas não conseguem penetrar no seu interior. Nas pastas químicas, como já sofreram processos químicos de remoção da lenhina, a parede encontra-se mais porosa, facilitando a entrada das enzimas e permitindo que estas actuem tanto no exterior como no interior da fibra (Suurnäkki et al., 1997).

A aplicação de enzimas nos processos de branqueamento tem vindo a ser exaustivamente investigada. O principal objectivo desta aplicação, como já mencionado, é a diminuição de consumo de reagentes químicos, nos estágios de branqueamento seguintes, conseguindo atingir o mesmo nível de brancura e libertando menos compostos prejudiciais ao ambiente (Bajpai, 2005).

O desempenho enzimático vai depender de diversos factores, que irão ser mencionados no subcapítulo seguinte, bem como da sequência de branqueamento, onde vai ser introduzida (Eriksson et al., 1997; Shatalov & Pereira, 2008). Actualmente há estudos com tratamentos enzimáticos em diversas sequências de branqueamento. Os mais relatados consistem na aplicação de enzimas como pré-tratamento enzimático, promovendo a diminuição dos reagentes usados (Beg et al., 2001). Esta aplicação é denominada por *bleach boosting*, que

significa que o seu efeito de branqueamento só é visível após aplicação do agente químico, onde a enzima apenas promove e facilita o acesso dos reagentes posteriormente aplicados (Garg et al., 2011; Hart, 2012). Esta aplicação provoca uma maior facilidade no branqueamento, sem provocar um branqueamento directo. No caso de haver ganho de brancura imediatamente após o tratamento enzimático denomina-se por branqueamento directo (Wong et al., 1997). Este caso é usualmente típico em aplicações de tratamento enzimático após estágios de branqueamento, denominando-se por pós tratamento.

Na Tabela 10 apresentam-se diferentes sequências onde actualmente se aplicam tratamentos enzimáticos. As sequências assinaladas são as sequências tratadas ao longo desta dissertação.

Tabela 10: Sequências de branqueamento com tratamento enzimático (adaptado de Dence & Reeve, 1996); Vantagens no pré-tratamento enzimático (adaptado de Eriksson et al., 1997)

<i>Convencional</i>	<i>ECF</i>	<i>TCF</i>
XCEDED	XDED	X(EP)P
X(CD)EDED	OXDED	ZX(EP)
OX(CD)ED	X(EOP)D(EOP)D	XZ(EP)
	OXDP	OXQPZP
	DEXD	OXZP
	DEDXD e DEDXP	OX(EP)ZP
<i>Vantagens</i>		
Redução no consumo de Cl ₂ e redução nas emissões de AOX	Redução no consumo de ClO ₂ , redução nas emissões de AOX e aumento de produtividade	Aumento na brancura, redução no consumo de reagentes e conservação das propriedades de resistência

4.2.1 Factores que influenciam a actividade enzimática

A aplicação de enzimas nas indústrias é cada vez mais uma alternativa aos processos químicos, derivado das vantagens mencionadas anteriormente. Porém as enzimas são extremamente sensíveis, sendo necessário ter cuidados redobrados e condições de operação bastante controladas. As enzimas caracterizam-se pela sua actividade para com o substrato, isto é, em determinadas condições as enzimas atingem um máximo da sua actividade, conseguindo-se a sua maior eficiência de tratamento. A actividade da enzima está fortemente relacionada com o pH e a temperatura em que actuam, pois só conseguem atingir o seu máximo de actividade quando aplicadas nas suas condições óptimas (Nelson & Cox, 2004; Viikari et al., 1986). A natureza do substrato também é um factor importante para a sua eficácia, por isso a sua actividade deve ser determinada com um substrato da mesma natureza do que se pretende catalisar, neste caso em particular, a pasta celulósica. O substrato é, porém, muito variável, sendo necessário determinar sempre as suas condições óptimas de tratamento para novos substratos (Eriksson et al., 1997). Além destes, o tempo de reacção, dispersão da enzima no substrato e dosagem aplicada é determinante para a eficiência do tratamento (Bajpai, 1999; Beg et al., 2001; Daneault et al., 1994; Eriksson et al., 1997). Na Figura 19 b) é possível observar que a aplicação de uma dose exagerada de enzima não vai provocar um aumento de brancura na mesma proporção, havendo um estagnamento desta propriedade e um aumento contínuo da perda de rendimento em consequência da acção enzimática. É também

importante referir a curva de *Michaelis-Menten*, onde é possível perceber que a dosagem de substrato deve ser correctamente optimizada. Esta curva expressa a relação entre a concentração de substrato e a velocidade da reacção, ocorrendo saturação de enzima pelo substrato e não havendo aumento da velocidade de reacção. A curva de *Michaelis-Menten*, apresentada na Figura 19 a), assume que o passo limitante da velocidade das reacções enzimáticas é a quebra do complexo enzima-substrato para originar o produto e a enzima livre.

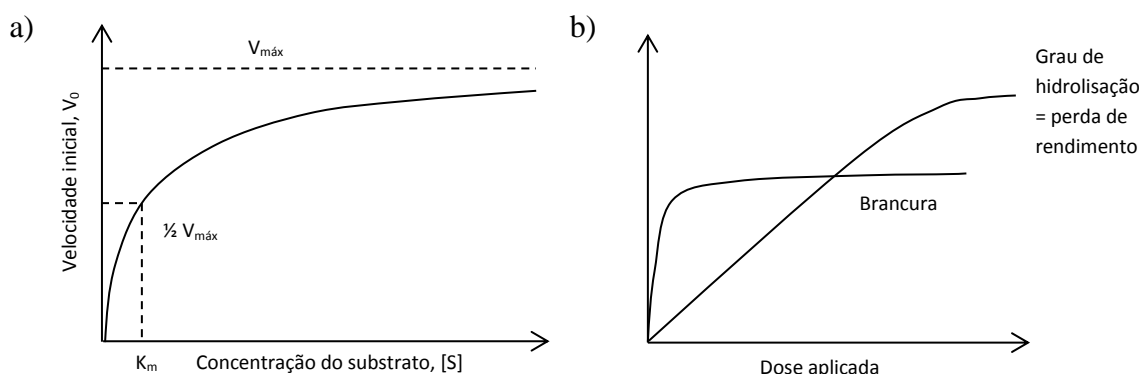


Figura 19: a) Curva de *Michaelis-Menten*; b) Correlação entre a solubilização enzimática na pasta e o efeito da enzima no branqueamento da pasta (adaptado de Eriksson et al., 1997)

As condições de operação das enzimas variam consoante a sua origem, bacteriana ou fúngica. Enzimas de origem bacteriana mostram-se mais eficientes numa gama de pH entre 6 e 9, enquanto enzimas de origem fúngica são mais eficientes num pH de 4 a 6. No que diz respeito à temperatura ambas actuam entre 35 a 60°C (Bajpai, 1999; Beg et al., 2001; Daneault et al., 1994). O tempo de reacção e dosagem aplicada necessitam de ser optimizados, tendo em conta o custo da enzima e perda de rendimento, como se ilustra na Figura 19 b) (Eriksson et al., 1997). A dose ideal de enzima encontra-se numa gama de 2-5 IU/g⁵ e o tempo de residência entre 1-2 h (Beg et al., 2001). É portanto imprescindível encontrar as condições óptimas de operação para cada enzima, pois estas diferem devido à sua origem, pureza e actividade (Saake et al., 1995).

O tamanho das enzimas também influencia a eficiência de tratamento, uma vez que as paredes das fibras são poucos porosas, dificultando a passagem das enzimas de maiores dimensões. Há estudos que mostram as diferenças entre duas xilanases de origens diferentes na solubilização das xilanas, dependendo do seu tamanho (Saake et al., 1995).

4.2.2 Xilanases

A xilanase é uma enzima hidrolítica que actua na cadeia da xilana, despolimerizando-a em unidades de xilose (Dhiman et al., 2008). A sua origem pode ser bacteriana ou fúngica e pode actuar de diferentes formas, como se pode ver pela Figura 20. As endoxilanases, ou endo-1,4-

⁵ Unidades Internacionais por grama de pasta seca

β -D-xilanase (EC 3.2.1.8), quebram as ligações glicosídicas β -1,4 ao longo da cadeia de xilana. As exoxilanasas, ou 1,4- β -D-xilosidases (EC 3.2.1.37), atacam a extremidade não redutora da xilana, libertando unidades de xilose (Polizeli et al., 2005). Há ainda uma variedade de xilanasas que podem ser classificadas como desramificadoras caso ataquem preferencialmente os substituintes da cadeia de xilanas (parte ramificada), como os resíduos de arabinose, ácidos glucurónicos, ácidos acetilo, entre outros (Ghatora et al., 2006; Silva et al., 2000): são as α -L-arabinofuranosidases, α -glucuronidases e acetilesterases. As endoxilanasas estão consideradas como as ideais para o pré tratamento no branqueamento (Beg et al., 2001).

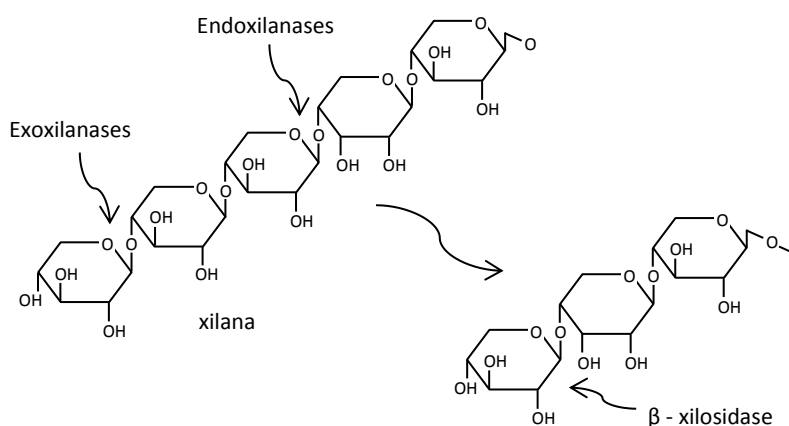


Figura 20: Estrutura da molécula de xilana e respectiva acção das xilanasas (adaptado de Gomes et al., 2007)

A actuação das xilanasas nas cadeias de xilanas depende de vários factores, como a natureza enzimática, o pH, a temperatura e dosagem e vão determinar a sua habilidade de penetração na cadeia de xilana (Fillat et al., 2012). Além destes factores também a actuação da xilanase vai depender dos substituintes que constituem a cadeia de xilana. Como se sabe, as hemiceluloses são polímeros cuja constituição difere substancialmente de espécie para espécie. A actividade enzimática da xilanase pode estar por isso dependente do tipo de substrato aplicado, como comprovado em alguns estudos (Ghatora et al., 2006). A actividade das xilanasas podem depender dos substituintes da cadeia de xilanas (parte ramificada) ou podem ser indiferentes aos substituintes hidrolisando aleatoriamente as ligações entre os monómeros de xilose não substituídos.

O uso das xilanasas surgiu como uma alternativa aos reagentes químicos usados convencionalmente no processo de branqueamento, cujo objectivo é degradar e remover a maior parte da lenhina. Em determinadas condições a acção das xilanasas não é de branqueamento nem de deslenhificação, alterando apenas alteram a superfície da fibra de modo a promover o alcance dos reagentes de branqueamento (Beg et al., 2001; Dhiman et al., 2008; Eriksson et al., 1997; Tolan et al., 1995). Isto conduz a uma maior eficácia no branqueamento, reduzindo o consumo de reagentes e reduzindo a produção de compostos tóxicos para o meio ambiente (Dence & Reeve, 1996; Valls & Roncero, 2009).

Existem vários mecanismos de acção propostos para actuação das xilanases nos processos de pasta e papel como se exemplifica na Figura 21 (Beg et al., 2001). Durante o cozimento, a xilana sofre alterações na sua conformação, podendo levar à formação de ligações com estruturas parcialmente aromáticas e cromóforas (como os HexA). A xilanase, ao hidrolisar a xilana, vai libertar estes compostos, proporcionando uma maior estabilidade na pasta (Figura 21 a).

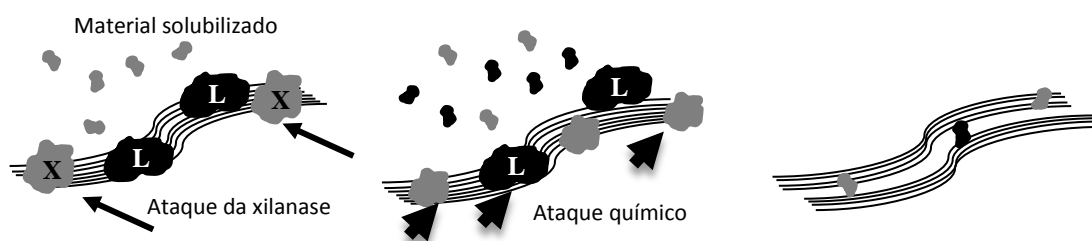


Figura 21: a) Acção das xilanases na remoção de cromóforos derivados das xilanas (adaptado de Jong et al., 1997)

A lenhina tem a capacidade de formar complexos com os polissacarídeos, criando ligações denominadas por complexos lenhina-xilana (LCC) – Figura 21 b). Tal como no mecanismo anterior, a xilanase provoca uma despolimerização parcial da xilana, libertando os fragmentos de lenhina residual (Buchert et al., 1992; Simeonova et al., 2007). Como consequência desta acção, também a remoção dos ácidos hexenurónicos é favorecida com a aplicação de xilanase, devido à libertação das xilanas sobre a superfície das fibras que contêm estes ácidos (Valls et al., 2011).

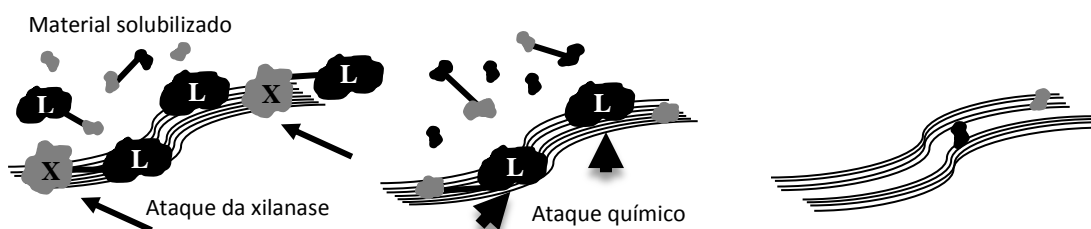


Figura 21: b) Acção das xilanases na remoção de complexos xilana-lenhina (LCC) (adaptado de Jong et al., 1997)

A despolimerização da xilana leva à hidrólise de compostos ligados a ela, provocando um aumento na porosidade da fibra (Figura 21 c). Este aumento de porosidade vai facilitar a difusão da lenhina residual, tornando-a mais susceptível a reagir com os agentes de branqueamento (Eriksson et al., 1997).

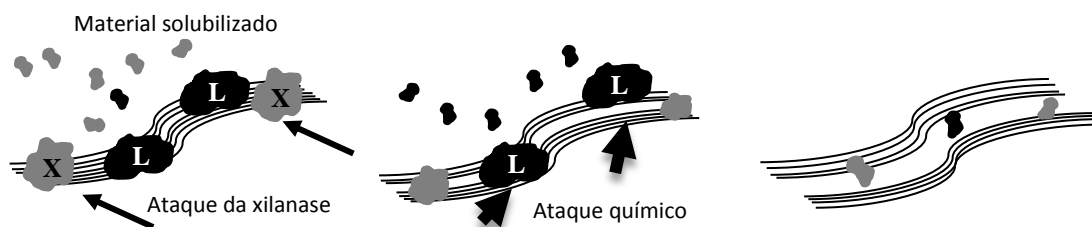


Figura 21: c) Acção das xilanases no aumento da porosidade da fibra de celulose (adaptado de Jong et al., 1997)

No final do cozimento, o pH diminui fazendo com que as xilanas que se encontravam solubilizadas no licor de cozimento sejam reprecipitadas na fibra (Figura 21 d). Estas vão formar uma barreira à saída da lenhina residual da fibra (Kantelinen et al., 1993). A xilanase actua na xilana, que se encontra precipitada na superfície da fibra, hidrolisando-a e deixando a lenhina residual mais exposta e mais facilmente removível pelos reagentes químicos seguintes (Beg et al., 2001; Eriksson et al., 1997; Roncero et al., 2005).

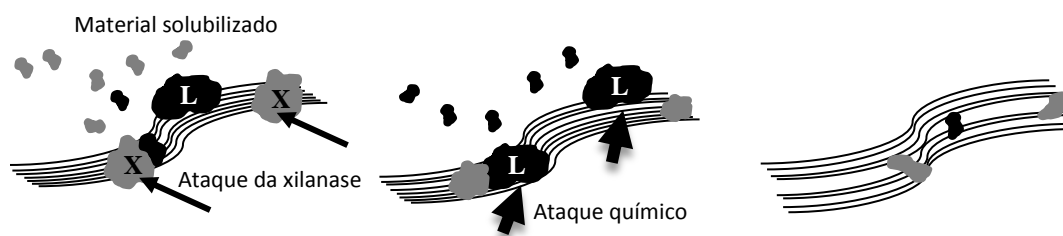


Figura 21: d) Acção das xilanas na remoção de xilana precipitada e posterior libertação da lenhina aprisionada na fibra (adaptado de Jong et al., 1997)

Estes mecanismos apenas são possíveis devido ao ataque selectivo da xilanase, ou seja, a xilanase não tem uma acção directa sobre a lenhina, ela apenas ataca os componentes ligados a xilana, como os complexos LCC, causando a sua dissociação e reduzindo, assim, indirectamente o teor de lenhina (Fillat et al., 2012). O resultado final destas acções é promover a acessibilidade da lenhina residual aos químicos de branqueamento dos estágios seguintes, fazendo com que seja mais facilmente removida. Está também comprovado que um decréscimo no teor de xilanas reduz a reversão da brancura, proporcionando uma maior estabilidade e menor tendência para o amarelecimento (Buchert et al., 1997).

Com aplicação das xilanas, ocorre um aumento na viscosidade da pasta e perda no rendimento, explicado pela remoção das xilanas. A viscosidade da pasta é uma medida de degradação dos polissacarídeos. Uma vez que as xilanas se encontram em menor percentagem e possuem um peso molecular inferior à celulose, a sua hidrólise leva a um aumento na viscosidade. No entanto as xilanas podem conter alguma actividade celulolítica para além da actividade xilolítica, o que é extremamente prejudicial uma vez que degrada a cadeia de celulose, causando perda de rendimento, de viscosidade e prejudicando as propriedades de resistência da pasta (Beg et al., 2001; Eriksson et al., 1997). Com as xilanas é possível obter ataques menores aos polissacarídeos e controlar a quantidade de hemiceluloses a remover através da carga da enzima, tempo de hidrólise, entre outros.

Os pré tratamentos com xilanas são os que mais têm sido estudados e considerados como a aplicação mais eficiente nos processos de branqueamento (Beg et al., 2001). Estes pré-tratamentos consistem em aplicar a xilanase antes dos estágios de branqueamento, ou a seguir a uma pré deslenhificação com oxigénio. Esta aplicação promove a acessibilidade das fibras aos químicos e uma redução no seu consumo, proporcionando também uma diminuição da reversão da brancura (Thakur et al., 2012). Quando aplicada numa sequência ECF, este pré tratamento leva a reduções no consumo de cloro activo de 10 a 20% nas pastas de resinosas podendo atingir reduções de 35 a 41% nas folhosas (Bajpai, 1999; Eriksson et al., 1997). Esta redução de cloro activo comprova as vantagens a nível ambiental e a nível económico,

conseguindo-se aumentar também a capacidade de produção (Beg et al., 2001; Eriksson et al., 1997). O pré-branqueamento com xilanases é actualmente usado industrialmente na América do Norte e no Canada. Em 1999 havia cerca de nove fábricas a operarem com xilanases na Escandinávia e em 2002 operavam cerca de vinte indústrias na América do Norte (Demuner et al., 2011).

A xilanase pode também ser aplicada no final da sequência de branqueamento, classificando-se como um pós tratamento e tem como principal objectivo diminuir a reversão da brancura nas pastas. Simeonova e colaboradores concluíram que a xilanase quando aplicada no final do branqueamento, remove preferencialmente os HexA presentes na superfície da fibra, sem atacar e remover a xilana (Simeonova et al., 2007).

4.2.3 Lacases

As lacases fazem parte do grupo de lenhinas, constituído por três tipos de enzimas, manganês peroxidase (MnP), lenhina peroxidase (LiP) e as lacases. Este grupo foi descoberto em 1983, identificado como enzimas capazes de degradar a lenhina (Glenn et al., 1983; Tien & Kirk, 1983). Os fungos *white-rot*, como *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* são os maiores produtores de enzimas lenholíticas.

A lacase é uma enzima oxidativa, actuando directamente sobre a lenhina, capaz de oxidar os seus grupos fenólicos. Porém, é uma macromolécula de elevado tamanho incapaz de penetrar na fibra da pasta sem um mediador, tornando-se ineficaz quando usada isoladamente (Sixta, 2006). Esta é considerada uma das enzimas mais promissoras no ataque directo aos compostos produtores de cor da lenhina (Thakur et al., 2012). No entanto apenas consegue oxidar as partes fenólicas da lenhina e, uma vez que a lenhina na madeira contém cerca de 10 – 20% de partes fenólicas e cerca 80 – 90% de não fenólicas, esta quebra torna-se insuficiente para a sua degradação. É por isso necessária a presença de um mediador que possibilite a quebra das ligações não fenólicas (Moldes et al., 2008). Porém, actualmente, ainda se procuram mediadores eficazes, de baixo peso molecular, não tóxicos e que sejam economicamente suportáveis para o tratamento com lacases (Thakur et al., 2012).

Hoje em dia o mediador considerado como o mais eficiente e mais usado é o 1-*hydroxybenzotriazol* (HBT), que é bastante eficiente, capaz de reagir com os grupos fenólicos e não fenólicos deslenhificando a pasta (Moldes et al., 2008; Valls & Roncero, 2009). Porém este sistema ainda tem muitos aspectos a serem melhorados, com o objectivo de diminuir o consumo do HBT e da enzima. Outro mediador utilizado é o ABTS (ácido 2,2'-*azinobis*-(3-*etilbenzotiazolina*-6)-sulfónico), sendo este, no entanto este é significativamente tóxico e de custo elevado (Aguiar & Ferraz, 2011).

Ao contrário das xilanases, o uso das lacases não tem sido muito extensivo uma vez que têm uma disponibilidade limitada. Contudo, existem diversos estudos com a aplicação simultânea destas duas enzimas no branqueamento. Em alguns destes estudos, conclui-se que o pré tratamento com a xilanase facilita o acesso do sistema lacase – mediador à lenhina e aos ácidos hexenurónicos, provocando assim uma oxidação da lenhina inacessível resultando num

índice *kappa* mais baixo (Valls & Roncero, 2009; Valls et al., 2010). Este efeito favorável da xilanase tem sido atribuído à remoção das xilanas da superfície das fibras, através da quebra entre a celulose e a lenhina e assim ser mais fácil o acesso dos reagentes de branqueamento (Valls et al., 2010).

4.3 Condições operatórias adequadas

Sumariando, apresenta-se na Tabela 11 as diferentes condições operatórias, utilizadas normalmente no branqueamento industrial, na utilização de peróxido de hidrogénio, dióxido de cloro e xilanases.

Tabela 11: Resumo de condições, acção e resultados esperados do ClO_2 , H_2O_2 e xilanase (adaptado de Sues et al., 2004; Bajpai, 1999)

	<i>Condições de branqueamento</i>	<i>Acção no branqueamento</i>	<i>Resultados esperados</i>
<i>Peróxido de hidrogénio (H_2O_2)</i>	pH \approx 11 T < 90°C	Reage com: ➤ Grupos quinonas;	<ul style="list-style-type: none"> • Maior estabilidade na brancura; • Diminuição da viscosidade;
<i>Dióxido de cloro (ClO_2)</i>	$D_0 < 3 - 2,7$ pH; $D_1 < 4$ pH; $D_2 \sim 5$ pH; T $\sim 70^\circ\text{C}$	Reage com: ➤ Grupos fenóis; ➤ HexA;	<ul style="list-style-type: none"> • Menor estabilidade na brancura; • Maior ganho de brancura; • Maior estabilidade na brancura;
<i>Xilanase</i>	pH 4 – 6 (fúngicas); pH 6 – 9 (bacterianas); $35 < T (\text{°C}) < 60$	Hidrolisa cadeia de xilana; Remove as LCC;	<ul style="list-style-type: none"> • Maior viscosidade; • Menor consumo de reagentes.

Na Tabela 12 apresentam-se diferentes estudos realizados, com aplicação de tratamentos enzimáticos, no início de sequência de branqueamento e no final da sequência. A Tabela contém diferentes xilanases aplicadas com diferentes condições e cargas.

Tabela 12: Exemplos de condições de aplicação de tratamentos enzimáticos

<i>Referência</i>	<i>Enzima</i>	<i>Condições de operação</i>	<i>Sequência</i>	<i>Observações</i>
<i>Pasta kraft de Bétula</i>				
(Simeonova et al., 2007)	Ecopulp TX-100 Pulpzyme HC	5 XU/ADg T = 60°C; pH = 7; t = 2h	OD(EOP)DX (OO)Q(OP)Q(PO)X	Tratamento enzimático diminui a reversão da brancura.
<i>Pasta crua kraft de E. Globulus</i>				
(Shatalov & Pereira, 2008)	Ecopulp TX-200A Pulpzyme HC	76 TXU/g; T = 65°C; pH = 7; 3h 1 AXU/g; T = 60°C; pH = 7; 3h	XQPPP	Xilanase de <i>Bacillus</i> ; 41,3% ISO (inicial); 86,4% ISO (final) 42% 85,7% 42% ISO (inicial); 85,7% ISO (final)
<i>Pasta kraft de hardwood</i>				
(Senior et al., 1992)	Xilanase	0,012% (85IU/g); T = 50°C; pH = 5,5-6; 2h	(CD)EDEDX	Xilanase de <i>Streptomyces lividans</i>
<i>Pasta kraft de eucalyptus globulus</i>				
(Vicuña et al., 1997)	Pulpzyme HC Cartazyme NS-10	0,5EXU/g; T = 55°C; pH = 8; 2h 0,5mg/g; T = 55°C; pH = 8; 2h	OXDED	
<i>Mistura de Eucalytus. grandis e E. saligna</i>				
(Fillat et al., 2012)	Xilanase	0,3 kg/tAD (0,03% o.d.p); T = 80°C; pH = 9,5; 2 h	OXD	Propriedades iniciais: 55,3 % ISO; IK=11,5 Propriedades finais: ~59% ISO; IK=~8,5
<i>Pasta kraft de Eucalytus globulus</i>				
(Vidal et al., 1997)	Xilanase	550 EXU/kg; T = 45°C; pH = 7-8; 3h	XODPD	Propriedades iniciais: 31,7% ISO; IK = 14,2 Propriedades finais: 88% ISO, com uma redução de 33,4% de ClO ₂ e 47% de H ₂ O ₂

4.4 Reversão da Brancura

Um dos parâmetros de grande importância nas sequências de branqueamento é a estabilidade final da brancura no papel. A estabilidade é definida como a capacidade que a pasta tem de manter a sua brancura ao longo do tempo sem escurecer, como se pode ver na Figura 22. Os

compostos prejudiciais à sua estabilidade são formados durante as numerosas etapas do processo de produção de pasta e papel. Entre estes compostos encontram-se os grupos cromóforos, ditos como os principais causadores da reversão da brancura no papel (Carter, 1996). Os grupos cromóforos são compostos insaturados e altamente conjugados, capazes de absorverem luz na região do ultravioleta ou visível, dando cor a pasta. A lenhina e os ácidos hexenurónicos são exemplos de grupos cromóforos, provocando o amarelecimento das pastas com elevado teor nestes compostos (Carter, 1996). As causas do amarelecimento da pasta têm sido atribuídas especialmente aos próprios constituintes e às condições físicas a que os fardos de pasta ficam sujeitos no seu transporte e armazenamento (Loureiro et al., 2012; Simeonova et al., 2007).



Figura 22: Exemplo do envelhecimento natural do papel.

Constituintes da pasta:

- Lenhina residual
- Extractáveis
- HexA
- Ácidos carboxílicos e carbonilos
- Quinonas

Condições físicas externas:

- Transporte
- Armazenamento
- Secagem
- Temperatura
- Luz

A reversão da brancura é o resultado da absorção de luz por parte das estruturas cromóforas, que se formam através de reacções de foto-oxidação, impulsionadas por diferentes condições ambientais (Carter, 1996; Suess, 2010). A sua análise passa pela comparação da brancura inicial da pasta e a brancura após o processo de reversão. De uma maneira geral, quanto mais lenhina for extraída da pasta maior irá ser a sua estabilidade (Suess et al., 2004). No entanto, isto nem sempre se verifica, fazendo com que o índice *kappa* e a reversão da pasta não tenham uma simples correlação (Suess, 2010). Uma vez que a brancura não reflecte directamente o teor de grupos cromóforos na pasta, uma outra forma de analisar a reversão é através do *Post Color Number* (PC number), exemplificado na Equação 8.

$$PC = 100. \left(\frac{k}{s} \text{ depois da reversão} - \frac{k}{s} \text{ antes da reversão} \right) \quad \text{Equação 8}$$

Onde $\frac{k}{s} = \frac{(1-R_{\infty})^2}{2.R_{\infty}}$ e onde R_{∞} é reflectância obtida de uma folha de papel para $\lambda = 475$ nm, geralmente denominado por Brancura ISO (%), k é o coeficiente de absorção e s é o coeficiente de dispersão.

Este método baseia-se na reflectância e na dispersão de luz antes e depois da reversão da brancura e mostra uma relação directa entre o número de grupos cromóforos existentes na pasta (Dence & Reeve, 1996; Suess et al., 2004). Quando as diferenças na brancura são mínimas, o PC aumenta a visibilidade destas diferenças, sendo que quanto maior o seu valor, maior é a instabilidade da pasta (Suess, 2010). Existem diversos métodos para análise do processo de reversão, como os métodos induzidos por altas temperaturas e humidade (Dence & Reeve, 1996; Loureiro et al., 2012). O método considerado como mais fiável e próximo do envelhecimento real é o método reversão húmido-térmico, com temperatura e humidade controlada de 100°C e 100%, respectivamente (Liitiä & Tamminen, 2007).

Na Figura 23 é descrito o mecanismo proposto para a formação dos cromóforos responsáveis pelo amarelecimento do papel. O mecanismo inicia-se com a incidência de luz, perto do ultra violeta (300 – 400 nm), nos cromóforos primários da lenhina, provocando quebras nas suas ligações e produzindo radicais livres. Estes radicais por sua vez vão reagir com a lenhina, formando radicais fenoxilo e radicais cetilo. Os radicais vão se posteriormente quebrar e formar novos radicais fenoxilo e radicais cetonas, que se vão comportar como cromóforos secundários. Os radicais fenoxilo vão ser oxidados pelo oxigénio, causando a formação de quinonas. Estas vão funcionar também com cromóforos secundários. As quinonas podem absorver luz e o ciclo de fotodegradação da lenhina e amarelecimento do papel continuam (Carter, 1996; Lourenço et al., 2005).

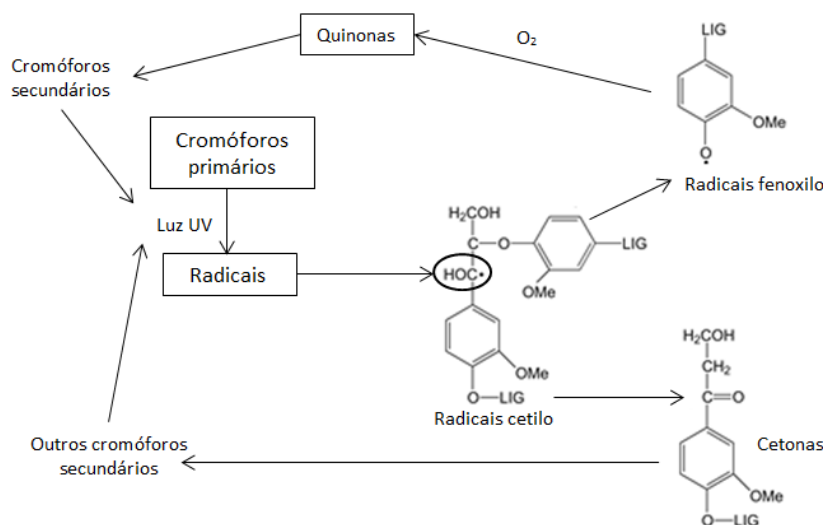


Figura 23: Mecanismo de produção dos cromóforos e degradação da lenhina durante o amarelecimento do papel (adaptado de Carter, 1996)

Os ácidos hexenurónicos têm sido apontados como os grandes causadores para a instabilidade da brancura da pasta (Suess et al., 2004). Estes são constituídos por ligações duplas conjugadas, conferindo à pasta uma maior afinidade aos metais de transição, provocando um maior consumo de reagentes de branqueamento e a formação de novos grupos cromóforos. Há estudos que afirmam que o tratamento enzimático aplicado nos últimos estágios de branqueamento promove uma remoção dos HexA, conseguindo uma maior estabilidade na pasta. A Figura 24 mostra o modelo proposto por Simeonova e seus colaboradores da acção que a xilanase consegue na remoção destes ácidos. Porém, apesar de alguns autores

concluírem que a estabilidade da brancura está directamente ligada à remoção dos ácidos hexenurónicos, existem outros que afirmam que esta reversão não se deve apenas a existência destes ácidos (Loureiro, 2012; Loureiro et al., 2010; Simeonova et al., 2007).

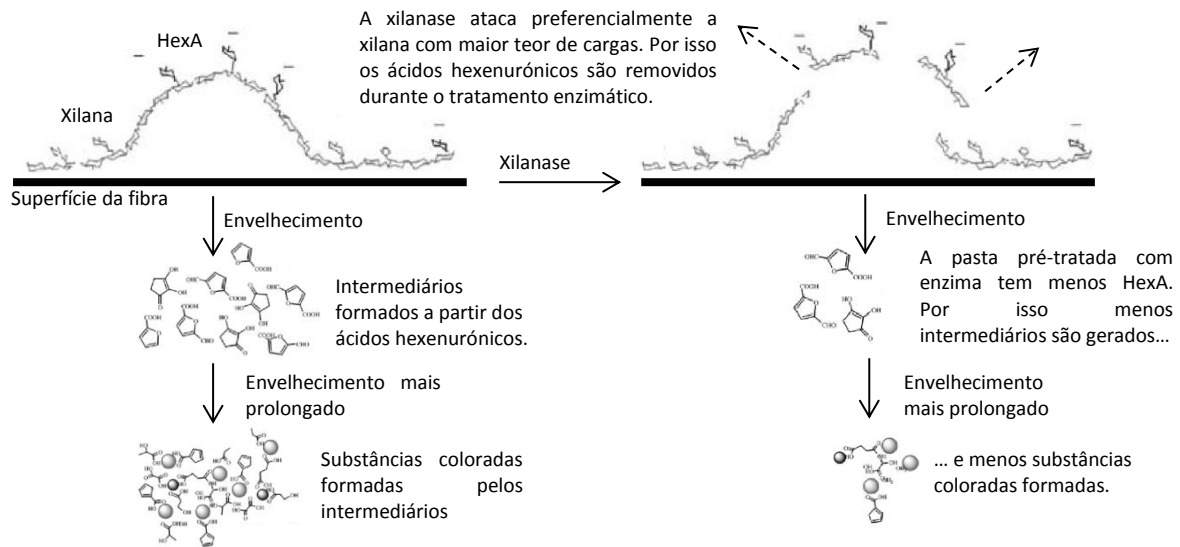


Figura 24: Modelo proposto para a estabilidade da brancura com tratamento com xilanas (adaptado de Simeonova et al., 2007)

As causas da reversão da brancura são diversas e contraditórias para muitos autores (Kirk & Yang, 1979; Loureiro et al., 2011; Suess et al., 2004). Estas incongruências advêm da dificuldade da análise dos grupos cromóforos residuais na pasta, nos últimos estágios de branqueamento, devido ao seu baixo teor e difícil acessibilidade (Sevastyanova et al., 2011).

A sequência de branqueamento é um factor crucial para a estabilidade final da brancura, mais particularmente dos reagentes aplicados como último estágio (Loureiro, 2010). Vários autores mostraram que o peróxido de hidrogénio aplicado como último estágio de branqueamento é mais vantajoso do que a aplicação do dióxido de cloro (Loureiro, 2012; Loureiro et al., 2011; Suess, 2010). No entanto, este estágio com peróxido de hidrogénio apresenta um teor de HexA mais elevado do que nas pastas branqueadas com dióxido de cloro no último estágio (Loureiro, 2010). Esta conclusão vem confirmar que a estabilidade da brancura não está directamente ligada unicamente aos HexA, podendo as pastas com maior teor de HexA exibirem melhores comportamentos na estabilidade da brancura. Este comportamento deve-se à facilidade com que o peróxido de hidrogénio quebra e elimina as estruturas quinónicas que se formam na pasta, enquanto o dióxido de cloro promove a sua formação, não conseguindo uma remoção tão completa destas estruturas na pasta (Suess, 2010).

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O presente trabalho dividiu-se em três fases, onde se realizaram tratamentos enzimáticos, branqueamentos químicos, a junção dos dois e se estuaram diferentes sequências. A primeira etapa teve como objectivo a determinação das condições óptimas de tratamento enzimático, usando uma pasta DED. Para isso procedeu-se a cerca de 44 ensaios com a xilanase EI1, onde se estudou a variação do tempo de reacção, pH, temperatura e carga enzimática. As condições óptimas de operação foram escolhidas com base nos resultados obtidos da análise da brancura ISO (%), perda de brancura ISO (%) após reversão e viscosidade. Depois de escolhidas as condições óptimas de tratamento iniciaram-se os ensaios de branqueamento final com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio, onde o principal objectivo foi estudar a poupança que seria possível obter no consumo dos reagentes. Para ser possível uma análise comparativa viável, realizaram-se duas curvas de consumo de reagente com diferentes cargas, para o dióxido e o peróxido. Finalmente na última fase do estudo, aplicaram-se exactamente as mesmas condições enzimáticas numa pasta DE, variando apenas as cargas aplicadas de dióxido de cloro. Para esta sequência não se aplicou branqueamento com peróxido de hidrogénio, porque não seria possível atingir uma brancura elevada como é habitual nas pastas de mercado de elevada qualidade. A aplicação de um tratamento enzimático em pastas com sequências diferentes teve como objectivo analisar o desempenho no início da sequência e no final da sequência. Todas estas etapas encontram-se resumidas na figura 25.

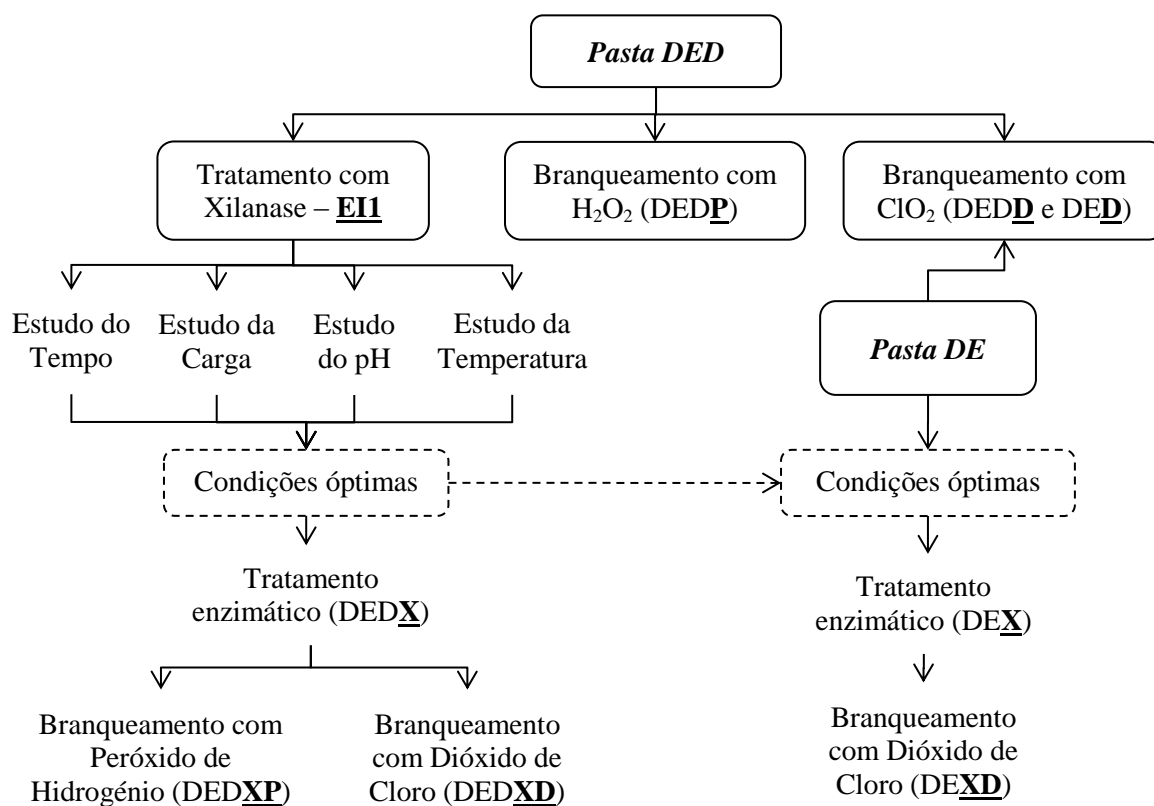


Figura 25: Metodologia Experimental

A matéria-prima utilizada na realização dos ensaios foi atenciosamente cedida por uma unidade industrial do Grupo Portucel – Soporcel, proveniente de um cozimento *kraft* de *Eucalyptus globulus* e branqueada com uma sequência DE e DED.

A pasta fornecida foi lavada nas instalações do RAIZ com água desionizada e armazenada no frigorífico devidamente fechada de modo a não conter ar no interior do saco. Os ensaios de branqueamento e os tratamentos enzimáticos foram efectuados em sacos de polietileno, com 20 g de pasta seca para uma consistência de 10%. Os sacos foram imersos num banho termostático a temperatura controlada, durante o tempo indicado para cada ensaio. Depois, os sacos foram retirados do banho e cobertos de gelo num recipiente, de forma a parar a reacção, durante 15min. Após este tempo a pasta é filtrada numa teia e o seu licor residual é recolhido, sendo depois lavada e filtrada por três vezes com um litro de água destilada de cada vez a uma temperatura de aproximadamente 35°C. No final da terceira lavagem a pasta é prensada manualmente e esfarelada para um outro saco de polietileno e armazenada no frigorífico, devidamente fechada.

Todas as conclusões retiradas de cada um dos ensaios foram obtidas com base na análise das seguintes propriedades finais:

- Determinação da Brancura ISO (%);
- Determinação da Brancura ISO (%) após reversão;
- Determinação da viscosidade intrínseca da pasta.

Antes de se estipularem as condições de tratamento enzimático, foi necessário proceder à determinação da actividade enzimática para a enzima EI1.

Na fase final do trabalho incluíram-se duas outras enzimas (EN4 e EN5) para uma comparação entre a poupança dos reagentes químicos resultantes do tratamento enzimático prévio, bem como análise económica das diferentes sequências. Todas as xilanases encontravam-se na forma de uma suspensão líquida.

5.1 Actividade Enzimática

Para cada uma das soluções enzimáticas foi determinada a sua actividade, pelo método proposto pela Universidade de *New South Wales*, da Austrália (Ghose & Bisaria, 1987). O seu procedimento encontra-se detalhado no Anexo III 5. Os reagentes usados para o procedimento foram: o ácido dinitrosalicílico (DNS), xilose e xilana de aveia (“*oat spelts*”). A solução tampão *Mclivaine* foi preparada para pH = 7,2, assumindo que a enzima tem origem bacteriana.

A actividade enzimática traduz-se na quantidade de açúcares redutores (xilose) que são libertados da cadeia de xilana. Uma unidade de actividade é definida como a quantidade de enzima que liberta 1µmol de açúcares redutores equivalentes por minuto sob as condições descritas no procedimento. Este procedimento tem por base os equivalentes de xilose que se libertam da xilana, como resultado da acção enzimática durante 60 min.

Antes da determinação da actividade enzimática foi necessário encontrar uma recta de calibração para a xilose usando o método colorimétrico com o reagente DNS, de forma a fornecer uma relação entre a absorvância lida e a xilose libertada. Depois procedeu-se à diluição da solução enzimática em diferentes proporções e ao procedimento da actividade enzimática a uma temperatura de 37°C.

5.2 Tratamento enzimático da pasta DED

Os ensaios foram realizados em sacos de polietileno, com adição de pasta, água e solução enzimática. O pH foi acertado em ensaios prévios, adicionando gotas de NaOH ou de HCl consoante o pH desejado. Tendo em conta a sua aplicação industrial, não foi usada uma solução tampão. Após os ensaios, foi registado o pH em que ocorreu a reacção, a partir da sua determinação no líquido residual. Todos estes procedimentos encontram-se pormenorizados no Anexo III 4 e III 6.

As pastas obtidas foram usadas para a formação de folhas, de forma a medir a sua brancura ISO (%) e consequente brancura ISO (%) após reversão. A pasta resultante serviu ainda para determinar os valores de viscosidade.

5.2.1 Tratamento enzimático com Enzima EI1

Os tratamentos enzimáticos com a enzima EI1 foram realizados com base nas condições de operação facultadas pelo fornecedor apresentada na Tabela 13.

Tabela 13: Condições de operação para a enzima EI1

pH	5 – 7,5	pH óptimo: 6
Temperatura (°C)	50 – 80	T óptima: 60
Dosagem (g/tAD)	100	

Os primeiros ensaios tiveram como objectivo encontrar o tempo de operação mais vantajoso, uma vez que não havia informações acerca desta condição operatória. Para isso realizaram-se quatro ensaios com base nas condições óptimas fornecidas e com diferentes tempos de tratamento (30, 60, 120 e 240 min). Após a análise dos resultados obtidos foi estabelecido o tempo de operação, tendo-se depois prosseguido com diversos ensaios para identificar as condições óptimas para o tratamento da pasta.

5.3 Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio

Os ensaios realizaram-se com base nas condições operatórias apresentadas na Tabela 14, variando-se apenas a carga aplicada consoante o estudo em causa. Estas condições foram estabelecidas com base noutros estudos realizados (Sousa, 2012).

Tabela 14: Condições de operação dos ensaios com peróxido de hidrogénio

<i>Variáveis</i>	<i>Condições de operação</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	70
<i>Tempo (min)</i>	60
<i>Cargas (% odp)</i>	
<i>H₂O₂</i>	0,3 – 1,2
<i>NaOH</i>	0,55
<i>MgSO₄.7H₂O</i>	0,2

O uso de hidróxido de sódio serviu para garantir as condições alcalinas necessárias ao branqueamento com peróxido de hidrogénio, promovendo a formação do ião hidroxilo. O sulfato de magnésio heptahidratado por sua vez é um aditivo que actua como inibidor da decomposição do peróxido de hidrogénio.

No licor residual retirado após a filtração é medido o seu pH e determinada a sua concentração de peróxido residual e de hidróxido de sódio residual. A concentração de peróxido de hidrogénio residual é determinada por iodometria e serve para se calcular o consumo deste reagente durante o branqueamento. A concentração de hidróxido de sódio residual é determinada após a adição de cloreto de bário de modo a promover uma precipitação dos produtos formados pela reacção do peróxido com o hidróxido. No filtrado obtido desta precipitação efectua-se uma titulação com ácido clorídrico. Os respectivos procedimentos encontram-se descritos no Anexo III 9 e III 10.

A realização de ensaios com diferentes cargas deste reagente serviu para a construção de uma curva de consumo de peróxido de hidrogénio em função da brancura atingida. Com base nesta curva foram escolhidas as cargas que mais se adequavam ao branqueamento de pastas nas quais se tinha aplicado tratamento enzimático. O seu principal objectivo é a comparação e a determinação da poupança de reagente que se consegue quando ocorre um tratamento enzimático prévio a este estágio.

5.4 Branqueamento com Dióxido de Cloro

Foram aplicadas diferentes cargas de dióxido de cloro nas duas pastas com diferentes sequências (DE e DED). Na Tabela 15 estão apresentadas as condições e cargas aplicadas, com base noutros estudos realizados (Sousa, 2012).

Tabela 15: Condições de operação dos ensaios com dióxido de cloro

<i>Variáveis</i>	<i>Condições de operação</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	70
<i>Tempo (min)</i>	150
<i>Carga em cloro activo (% odp)</i>	
Pasta DE	0,4 – 2
Pasta DED	0,1 – 0,6

Tal como nos branqueamentos com peróxido de hidrogénio, estes serviram para traçar uma curva de consumo em função à brancura atingida.

Nestes ensaios é necessário uma titulação prévia do dióxido de cloro, de forma haver um controlo rigoroso da sua concentração, uma vez que é extremamente volátil (Anexo 11). O dióxido de cloro deve ser armazenado no frigorífico e durante a realização dos ensaios deve estar bem selado e num recipiente envolto de gelo. Nestes branqueamentos a solução de dióxido de cloro é rapidamente adicionada à água e à pasta contida no saco, de forma a minimizar a perda de reagente. Todo este processo deve ser realizado dentro da *Hotte* do laboratório, de forma a minimizar a inalação dos gases provenientes do dióxido.

5.5 Tratamentos enzimáticos com aplicação posterior de peróxido de hidrogénio e dióxido de cloro

No final dos ensaios enzimáticos com base nos melhores resultados de brancura, reversão e viscosidade, escolheram-se as condições de operação finais. Para cada enzima, foi realizado um tratamento enzimático seguido de um branqueamento com peróxido de hidrogénio e com dióxido de cloro. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicado ou quadruplicado de forma a obter quantidade suficiente e uniforme de pasta tratada e retirar 20 g de pasta seca para cada um dos branqueamentos seguintes.

O objectivo principal foi analisar a poupança de reagente que se consegue obter com um tratamento enzimático anterior ao último estágio de branqueamento e a melhoria que se consegue na estabilidade da pasta. Os ensaios com peróxido de hidrogénio e dióxido de cloro realizaram-se sempre a temperatura de 70°C, com um tempo de branqueamento de 60 e 150 min, respectivamente. Na Tabela 16 encontram-se as condições de cada tratamento.

Tabela 16: Condições finais de operação

<i>Tratamento Enzimático</i>			
	<i>EN1</i>	<i>EN4</i>	<i>EN5</i>
pH	6	5	7
Temperatura (°C)	60	50	70
Tempo (min)	60	60	60
Carga (%) [*]	0,011	0,15	0,05
Carga (U/g o.d.p) ^{**}	4,9	4,5	4,9
<i>Branqueamento Químico</i>			
Carga ClO ₂ (Cl ₂ activo) (%)	Pasta DED: 0,1 – 0,3 e DE: 0,4 - 2		
Carga de H ₂ O ₂ (%)	Pasta DED: 0,5		

^{*} massa de solução enzimática em 100g de pasta seca;

^{**} unidades de actividade enzimática por grama de pasta seca;

5.6 Caracterização das Pastas

No final de cada branqueamento, cada pasta foi sujeita a uma caracterização no que diz respeito à sua viscosidade, à sua brancura ISO e a sua brancura ISO após reversão. Todos estes procedimentos são descritos no Anexo III.

5.6.1 Viscosidade

A viscosidade intrínseca da pasta é uma das características que permite prever o grau de degradação que a pasta sofre durante os processos de branqueamento. Esta relaciona-se directamente com o grau de degradação dos polissacarídeos, nomeadamente da celulose, uma vez que esta apresenta-se em maior quantidade e com o maior peso molecular entre os polissacarídeos. Portanto, a viscosidade consegue dar uma ideia da extensão do ataque aos polissacarídeos, traduzindo-se numa baixa resistência final do papel, caso se obtenha uma viscosidade muito baixa.

A sua determinação é feita através da norma ISO 5351, que tem por base a comparação do tempo de escoamento de um volume de solução de pasta celulósica através de um capilar de um viscosímetro com o tempo de escoamento do solvente puro. A celulose é praticamente insolúvel na maioria dos solventes, derivado ao seu elevado peso molecular e às suas propriedades estruturais. A cupri-etilenodiamina (CED) é um complexo de cobre e amina e é dos solventes mais usados para a determinação da viscosidade, capaz de solubilizar a celulose. O procedimento da determinação da celulose encontra-se descrito no Anexo III 12.

5.6.2 Brancura ISO

A brancura da pasta, como já anteriormente referido, corresponde ao factor de reflectância intrínseca de uma folha de pasta, medido para um comprimento de onda de 457 nm. Para a determinação da brancura foi necessário a produção de folhas de pastas resultantes dos ensaios realizados, cujo procedimento se encontra descrito no Anexo III 13. O objectivo é a leitura da brancura inicial e brancura após reversão de cada ensaio e daí se concluir quais as melhores condições operatórias e avaliar o desempenho do tratamento enzimático.

A medição da brancura ISO realizou-se, segundo a norma ISO 3688, duas folhas de pastas, por cada ensaio, com uma gramagem de 200 g/m² cada uma. A sua medição consistiu em quatro leituras efectuadas nas folhas de pasta do mesmo ensaio, usando um espectrofotómetro *Elrepho*, atenciosamente disponibilizado nas instalações do RAIZ, de acordo com a norma ISO 2469.

5.6.3 Reversão da Brancura

O processo de reversão da brancura é o resultado de uma exposição prolongada do papel às diversas condições ambientais. No entanto o envelhecimento natural é bastante moroso e por isso é necessário promover uma aceleração deste processo com métodos de exposição de temperatura, humidade e luz elevados. Desta maneira é possível prever o comportamento das folhas de pasta realizadas no seu processo de envelhecimento natural.

O envelhecimento forçado das folhas realiza-se após a medição da brancura ISO e consiste em colocar as folhas de pasta dispostas numa grelha no interior de uma câmara a 100°C com humidade de 100%, durante uma hora, conforme o procedimento TAPPI 260. No final, as folhas seguem para uma câmara ventilada onde secam à temperatura ambiente durante uma

hora sendo depois prensadas durante trinta segundos. Por fim a leitura da brancura efectua-se novamente da mesma maneira descrita no subcapítulo anterior no espectrofotómetro *Elrepho*.

Após as medições da brancura ISO inicial e brancura ISO após reversão é possível calcular-se a perda de brancura em cada ensaio e o respectivo *PC number* de forma a se concluir qual o desempenho dos diferentes reagentes e metodologias utilizadas.

Porém este método possui algumas desvantagens que devem ser tidas em consideração na análise dos resultados finais: verificou-se que as folhas colocadas na periferia da grelha se apresentavam mais húmidas do que as folhas que se encontram no meio, levando a condições de envelhecimento diferentes e traduzindo-se em variações nos resultados finais. Para minimizar os erros optou-se por colocar uma folha no meio e o seu duplicado na periferia e distribuir as folhas por todas a grelha com a mesma distância entre os pares.

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como mencionado anteriormente, este trabalho teve três objectivos principais:

- Avaliar e otimizar o desempenho de um tratamento enzimático na estabilidade da brancura de uma pasta *kraft* de eucalipto com uma sequência de branqueamento DED;
- Avaliar o potencial de poupança de reagentes com um tratamento enzimático no final do branqueamento, numa sequência DEDXD e DEDXP;
- Avaliar o potencial de poupança de reagentes com um tratamento enzimático no meio do branqueamento, numa sequência DEXD.

A pasta usada nos branqueamentos foi atenciosamente fornecida por uma das fábricas do Grupo Portucel Soporcel, produzida a partir da matéria de *Eucalyptus globulus*, resultante de um cozimento *kraft*. Esta pasta foi retirada em locais diferentes da sequência, sendo uma retirada no final da primeira extracção alcalina (DE) e outra retirada no final do segundo estágio com dióxido de cloro (DED).

Foram realizados no total cerca de 95 ensaios englobando os tratamentos enzimáticos e o branqueamento final com peróxido de hidrogénio ou com dióxido de cloro. Devido ao elevado número de ensaios realizados foi necessário solicitar mais matéria-prima, proveniente da sequência de branqueamento DED, denominando-se por pasta DED1 aquela que foi usada para os tratamentos enzimáticos e por pasta DED2 aquela que se usou para os branqueamentos finais. Como consequência da variabilidade da produção estas pastas apresentam características diferentes como mostra a Tabela 17. É possível verificar que as pastas DED1 e DED2 apresentam uma diferença de cerca de um ponto e meio na brancura, o que vai provocar, obviamente, variações nos ensaios finais, apesar do valor do PC *number* ser semelhante.

Tabela 17: Características das diferentes pastas industriais utilizadas nos ensaios

<i>Pasta</i>	<i>DE</i>	<i>DED1</i>	<i>DED2</i>
<i>Brancura ISO (%)</i>	76,4	88,06	86,60
<i>PC number</i>	1,27	0,46	0,45
<i>Viscosidade</i>	1032	997	1021

A partir da análise da Tabela 17 é possível ainda confirmar que à medida que o branqueamento prossegue, a brancura aumenta e o PC *number* e a viscosidade diminuem. Em relação ao PC *number* é evidente a diferença entre a sequência inicial DE e as outras sequências de três estágios, tendo a primeira um valor muito mais elevado devido ao maior teor de lenhina residual que contribui para uma maior reversão de brancura. A observação dos valores de viscosidade permite comprovar a acção selectiva do segundo estágio de dióxido de cloro (baixa degradação dos polissacarídeos), como referido na secção 4.

A optimização do desempenho da xilanase E11 foi estudada na pasta DED1, enquanto na pasta DED2 foram aplicadas as condições óptimas desta enzima como pré-tratamento prévio a

um estágio de branqueamento final com dióxido de cloro ou peróxido de hidrogénio – Figura 26.

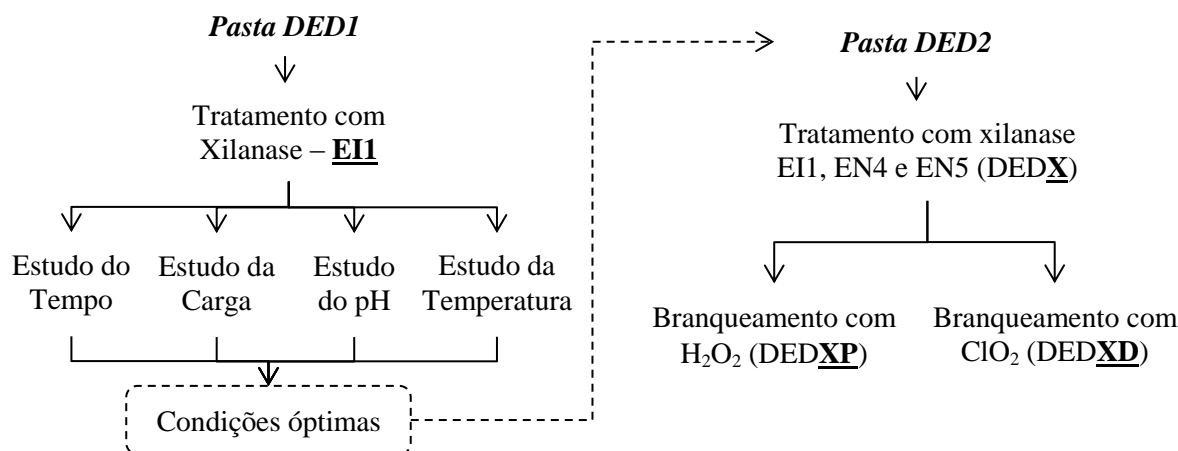


Figura 26: Metodologia do tratamento enzimático com pasta DED1 e metodologia do branqueamento final com pasta DED2.

6.1 Determinação da Actividade Enzimática

Por serem desconhecidas, procedeu-se à determinação das actividades enzimáticas de cada uma das xilanasas. O seu procedimento experimental detalhado encontra-se descrito no Anexo III5. Na Tabela 18 encontram-se as actividades enzimáticas determinadas para as três enzimas estudadas neste trabalho. No decorrer deste trabalho apenas se irá estudar detalhadamente o comportamento da enzima EI1. No entanto apresentam-se os valores das actividades enzimáticas das restantes enzimas, uma vez que se vai estudar o seu desempenho quando aplicadas em duas sequências diferentes de branqueamento.

Tabela 18: Actividades enzimáticas (método descrito por Ghose & Bisaria, 1987)

<i>Enzima</i>	<i>Actividade (U/mL)</i>
<i>EI1</i>	47600
<i>EN4</i>	3200
<i>EN5</i>	10000

Como se pode ver na Tabela 18, a xilanase EI1 é aquela que apresenta maior actividade em relação às outras xilanasas, sendo por isso necessária uma dose bastante inferior nos tratamentos enzimáticos, como se verá mais adiante. É de realçar que a xilanase EI1 provém de um fornecedor diferente das restantes xilanasas e é também de referir que não são conhecidos os microrganismos que as produzem, exceptuando para o caso da EN5, que tem origem bacteriana. Dado que todas as actividades enzimáticas foram determinadas pressupondo origem bacteriana, haverá erros maiores associados se as xilanasas tiverem outra origem. Recorde-se também que as suspensões de xilanasas não contêm uma enzima pura sendo antes um *cocktail* de enzimas xilotíticas (secção 4.2.2) com proporções diferentes consoante o fornecedor, o microrganismo de origem ou o processo de separação e purificação.

Decorridos quatro meses, procedeu-se novamente à determinação da actividade enzimática, para as três enzimas, usando dois substratos distintos: xilanas de *oat spelts* e de *beechwood*. Na Tabela 19 apresentam-se os resultados obtidos para os dois substratos, usando o mesmo método descrito por Ghose & Bisaria, 1987. A xilana de *oat spelts* é uma arabinoglucuronoxilana, enquanto a xilana de *beechwood* é uma glucuronoxilana. Como se pode ver pelas Figuras 3 e 27 as duas diferem entre si na presença de um resíduo lateral de arabinose na primeira enquanto a segunda não apresenta arabinose, tal como as xilanas existentes no *E. globulus*.

Tabela 19: Actividade Enzimática (U/mL) usando xilanas de diferentes origens

<i>Enzima</i>	<i>Substrato</i>	
	<i>Oat spelts</i>	<i>Beechwood</i>
<i>EI1</i>	21200	21100
<i>EN4</i>	1470	2390
<i>EN5</i>	5060	8860

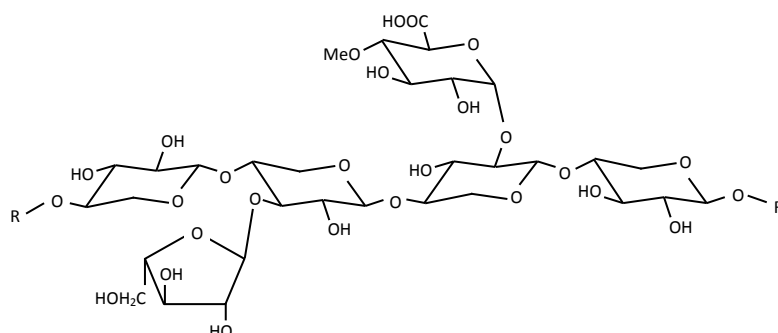


Figura 27: Estrutura de uma arabinoglucuronoxilana existente na madeira de resinosas ou em algumas gramíneas como a aveia ou o trigo (adaptado de Ebringerová, 2006)

Por comparação dos resultados apresentados nas tabelas 18 e 19 pode-se registar a perda de actividade que as enzimas sofreram ao longo do tempo bem como a dependência da actividade em relação ao substrato usado. Ao contrário da EI1, as enzimas EN4 e EN5 apresentaram grandes diferenças nos valores obtidos de actividade enzimática conforme o substrato aplicado. Com isto conclui-se que o seu desempenho vai depender dos substituintes que compõem a xilana, como o facto de apresentarem ou não resíduos de arabinose ou de ácidos glucurónicos. A enzima EI1, por outro lado, apresentou resultados bastante semelhantes mostrando-se ser indiferente aos substituintes da xilana, possivelmente por ter na sua composição uma maior proporção de enzimas que quebram aleatoriamente a cadeia linear compostas pelos monómeros de xilose.

Em suma, uma vez que o substrato utilizado nos tratamentos enzimáticos foi pasta de *E. globulus* e visto a xilana não ser tipicamente uma arabinoglucuronoxilana, os valores de actividade enzimática determinados poderão não ser conclusivos quanto à actividade sobre o substrato real (pasta). Com isto, optou-se ao longo do trabalho por analisar a evolução do desempenho da xilanase na pasta (brancura ISO (%), reversão, etc.) em função da massa de

solução enzimática aplicada ($\text{g}_{\text{solução de enzima}}/\text{g}_{\text{pasta}}$) e quando absolutamente necessário comparar os resultados tendo por base as actividades apresentadas na Tabela 18.

6.2 Branqueamento com Dióxido de Cloro e Peróxido de Hidrogénio

Efectuaram-se branqueamentos com dióxido de cloro e com peróxido de hidrogénio usando diferentes carga, na pasta DED2. Estes branqueamentos tiveram como objectivo encontrar uma curva de branqueamento (brancura e estabilidade) para cada um dos reagentes, para comparar o desempenho não só de cada reagente mas também de uma prévia aplicação de um tratamento enzimático com xilanase. Para a pasta DE apenas se utilizou dióxido de cloro, uma vez que com o peróxido não se conseguiria atingir brancuras muito elevadas.

Na Tabela 20 encontram-se apresentadas as condições de branqueamento de cada reagente.

Tabela 20: Diferentes condições de operação nos branqueamentos com dióxido de cloro* e peróxido de hidrogénio

<i>Variáveis</i>	<i>Pasta DED</i>		<i>Pasta DE</i>
	<i>Branqueamento com Dióxido de Cloro</i>	<i>Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio</i>	<i>Branqueamento com Dióxido de Cloro</i>
Temperatura (°C)	70	70	70
Tempo (min)	150	60	150
Carga de reagente**	0,1 – 0,6	0,3 – 1,2	0,4 – 2
Carga de NaOH (%)	---	0,55	---
Carga de MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	---	0,2	---

* carga de cloro activo

** carga = massa de reagente por unidade de massa de pasta seca, em percentagem;

6.2.1 Pasta DED

Na Figura 28 as diferenças entre o branqueamento com dióxido de cloro e o branqueamento com peróxido de hidrogénio são evidentes. É bastante visível a necessidade de uma carga de peróxido de hidrogénio superior à de dióxido de cloro para se atingir o mesmo nível de brancura. Convertendo a carga de peróxido de hidrogénio em carga de cloro activo (0,3% = 0,6% Cl₂ activo), pode-se observar as diferenças obtidas entre os dois reagentes. Conseguindo o dióxido de cloro, com 0,6% de Cl₂ activo, um aumento de 4,3 unidades de brancura ISO, atingindo 90,9% enquanto o peróxido de hidrogénio com a mesma carga de cloro activo, apenas consegue um aumento de 1,84 unidades, atingindo uma brancura ISO de 88,4%,

Estas conclusões já eram previsíveis, uma vez que o dióxido de cloro é um agente oxidante bastante selectivo e mais poderoso do que o peróxido de hidrogénio. O elevado desempenho no aumento de brancura atingida pelo dióxido justifica-se, como já referido no capítulo 4, pelo seu ataque aos anéis fenólicos e não fenólicos da lenhina (Valls et al., 2011).

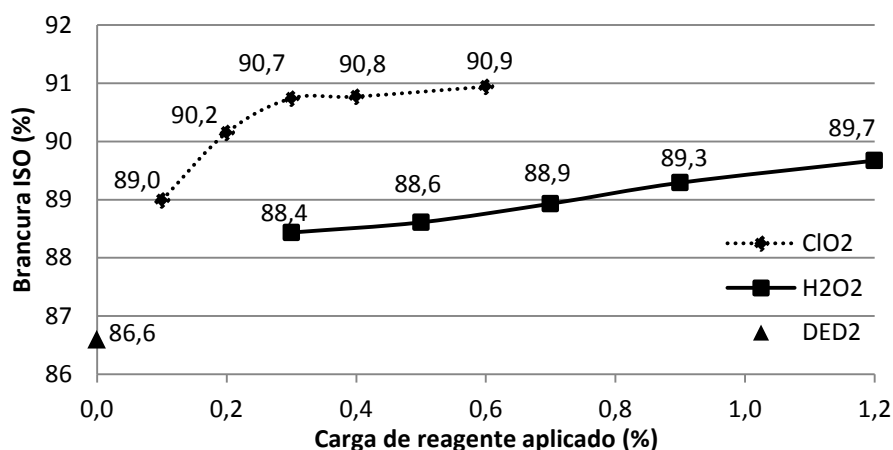


Figura 28: Evolução da brancura ISO em função da carga aplicada de dióxido de cloro (como cloro activo) e peróxido de hidrogénio (massa de reagente/massa de pasta seca, em percentagem) – pasta DED2

Na Figura 29 apresentam-se os resultados obtidos para a reversão da brancura (avaliada através do PC number) para cada um dos reagentes, onde se evidencia um valor bastante inferior no branqueamento com peróxido de hidrogénio. Como já era espectável, este reagente confere à pasta uma maior estabilidade (Loureiro et al., 2012; Suess et al., 2004). Este comportamento está relacionado com a facilidade que o peróxido de hidrogénio tem em condições alcalinas de extrair as estruturas causadoras da reversão, como as quinonas e outros cromóforos. Tal com já se mencionou anteriormente, as ligações LCC (xilana-lenhina) contribuem para a instabilidade da pasta, podendo estas também terem ligações com cromóforos. Estas são removidas mais eficientemente da superfície da fibra, em condições alcalinas como no branqueamento com peróxido de hidrogénio em vez das condições ácidas no branqueamento com dióxido de cloro (Loureiro, 2012).

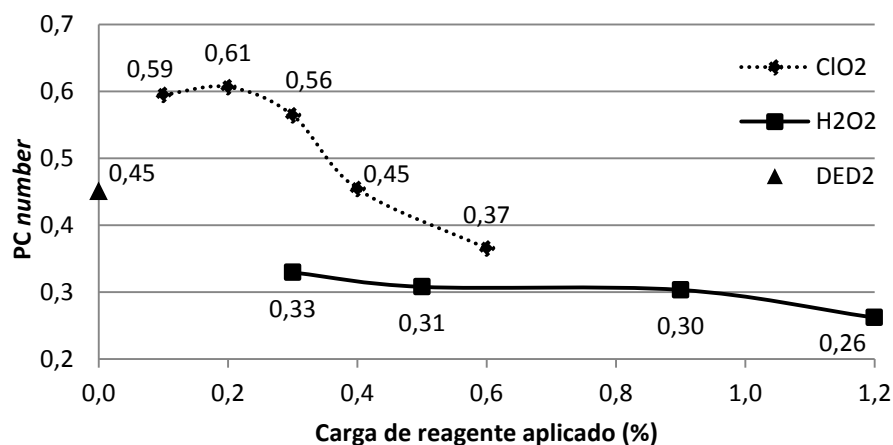


Figura 29: Evolução do PC number em função da carga aplicada de dióxido de cloro (em cloro activo) e de peróxido de hidrogénio – Pasta DED2

O branqueamento com dióxido de cloro, por sua vez, contribui para a formação de estruturas insaturadas nas xilanas, promovendo assim a sua instabilidade. Também foi recentemente demonstrado que o branqueamento final com dióxido numa sequência DEDD contém mais estruturas parcialmente oxidadas do que em sequência DEDP (Loureiro et al., 2012).

Para um estudo mais completo sobre a estabilidade da pasta, o teor em ácidos hexenurónicos, bem como o teor total em ácidos carboxílicos e o de grupos carbonilo, deveria ter sido determinado nas diferentes pastas, mas não foi possível em tempo útil. Contudo, no que respeita aos HexA, existem estudos anteriores que mostram que, apesar das pastas branqueadas com peróxido de hidrogénio exibirem um teor de HexA mais elevado do que nas pastas branqueadas com dióxido de cloro, o valor do PC *number* é inferior, pelo que os HexA, ao contrário do que se pensava, podem não justificar só por si a instabilidade da pasta (Loureiro et al., 2010).

Na Figura 30 apresentam-se os resultados obtidos para a viscosidade, onde o dióxido de cloro apresenta os valores mais elevados por ser um reagente mais selectivo reagindo apenas com os grupos fenólicos e não fenólicos da lenhina, não atacando os polissacarídeos em grande extensão (Valls et al., 2011). Este aspecto faz com que a viscosidade da pasta se mantenha e não diminua abruptamente, como no branqueamento com peróxido de hidrogénio. Apesar do peróxido de hidrogénio se mostrar bastante eficaz na estabilidade da brancura, este causa uma maior degradação dos polissacarídeos, tal como já foi provado por alguns autores (Loureiro et al., 2011), por poder formar radicais não selectivos (Valls et al., 2011). A diminuição da viscosidade leva a uma perda de rendimento e de resistência mecânica na pasta.

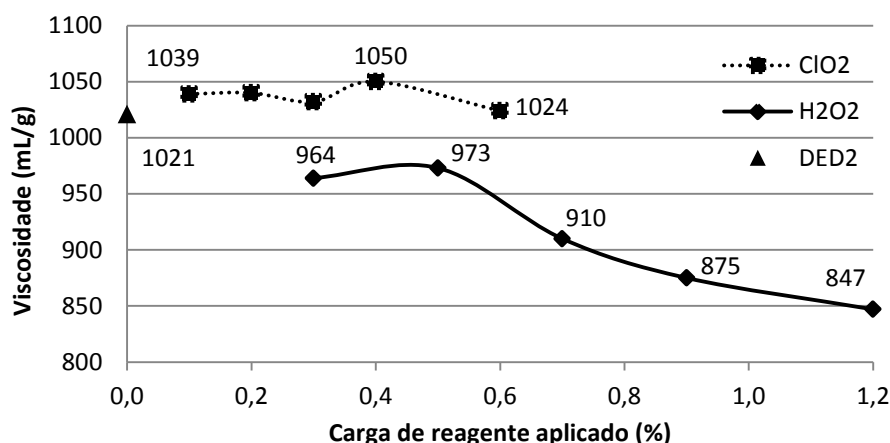


Figura 30: Evolução da viscosidade em função da carga aplicada de dióxido de cloro (como cloro activo) e de peróxido de hidrogénio – Pasta DED2

6.2.2 Pasta DE

Pela Figura 31 é possível verificar que o estágio com dióxido de cloro promove um aumento da brancura bastante elevado. Comparando com a Figura 28, na qual se apresentava a evolução da brancura resultante da aplicação de dióxido de cloro numa pasta DED, é possível verificar, para aproximadamente a mesma carga aplicada, um ganho de brancura na pasta DE quase de 9 pontos, enquanto na pasta DED ocorre um ganho à volta dos 4 pontos. Em ambos os casos, no entanto, os valores tendem para um patamar. Na pasta DE o processo de branqueamento ainda está numa fase de remoção dos cromóforos que reagem mais facilmente, enquanto na pasta DED, o processo de branqueamento já se encontra numa fase final evidenciando-se a dificuldade de remoção dos cromóforos residuais. É uma das razões que justificam que o processo de branqueamento seja multi estágios.

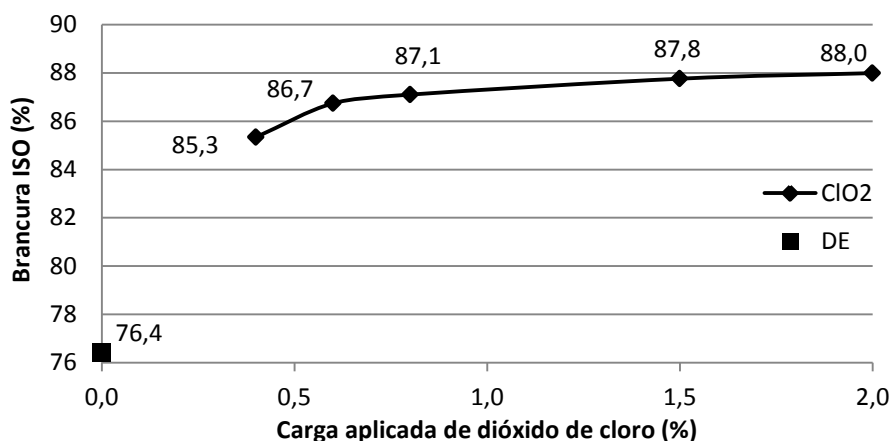


Figura 31: Evolução da brancura ISO em função da carga de dióxido de cloro aplicado (como cloro activo) – Pasta DE

De forma a comprovar que o branqueamento é mais eficiente em multi estágios, procedeu-se ao branqueamento com dois estágios com uma carga de 1,5 % e de 0,15 % de cloro activo. Daqui foi possível concluir que com uma carga total de 1,65 % de cloro activo conseguia-se atingir uma maior brancura ISO (88,5 %) do que com apenas um só estágio de 2 %.

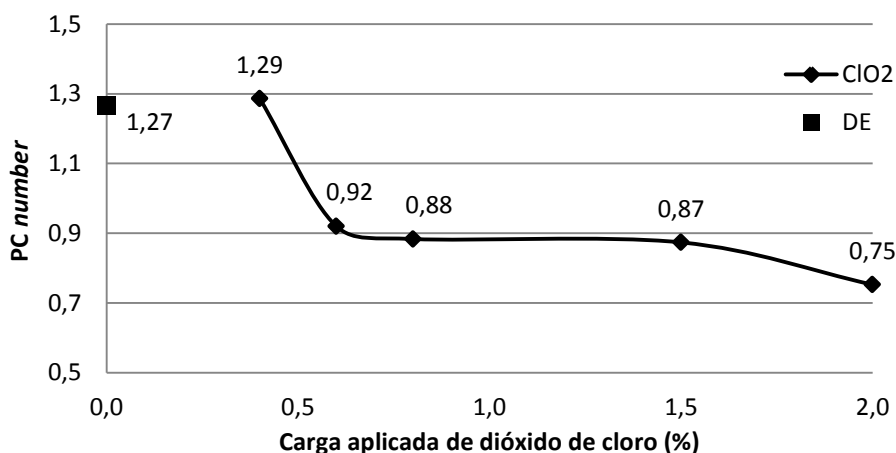


Figura 32: Evolução do PC number em função da carga de dióxido de cloro aplicado (como cloro activo) – Pasta DE

Na Figura 32 encontra-se apresentado a evolução do PC number. Ao contrário do que a Figura 29 mostrava, o estágio com dióxido de cloro promove nesta pasta uma redução no PC number, devido à remoção de lenhina residual e outros grupos cromóforos que se verifica nesta etapa de branqueamento e que contribuem para a instabilidade da brancura.

Na Figura 33 encontra-se representado a variação da viscosidade em função da carga de cloro activo aplicado onde se verifica uma diminuição contínua da viscosidade, embora pouco acentuada.

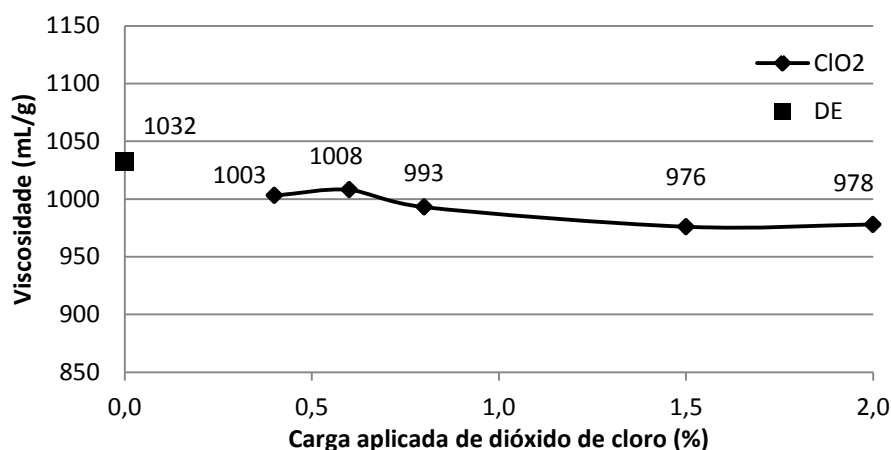


Figura 33: Evolução da viscosidade em função da carga de dióxido de cloro aplicado (como cloro activo) – Pasta DE

6.3 Análise do tratamento enzimático

Para o estudo da xilanase EI1 foram realizados cerca de 44 ensaios com o objectivo de encontrar as condições óptimas de operação. Tal como se mencionou nos capítulos anteriores, as enzimas são muito sensíveis às condições de operação e cada uma comporta-se de uma maneira muito particular, sendo por isso necessário fazer um estudo intensivo acerca das melhores condições operatórias. Este estudo envolveu a alteração das variáveis temperatura, pH, tempo de reacção e dosagem da enzima. Uma vez que a actividade desta xilanase era elevada (47600 U/mL) e, conseqüentemente, as dosagens eram pequenas, foi necessário proceder a uma diluição da solução enzimática de 1:1000 de forma a minimizar os erros de medição. Dado que não havia qualquer indicação do fornecedor acerca do tempo de reacção mais adequado, começou-se por estudar esta variável usando as condições operatórias aconselhadas pelo fornecedor para as restantes variáveis. Seguiu-se o estudo do efeito da dosagem para poder ganhar sensibilidade para um estudo de optimização envolvendo um planeamento experimental – Tabela 21. Todos estes ensaios estão apresentados no Anexo II. Nesta secção são apenas apresentados os resultados do estudo do tempo de reacção e da dosagem de xilanase.

Tabela 21: Condições operatórias do tratamento enzimático da pasta DED com a xilanase EI1.

<i>Condições</i>	<i>Efeito do tempo</i>	<i>Efeito da carga</i>
<i>pH</i>	6	6
<i>Temperatura (°C)</i>	60	60
<i>Tempo (h)</i>	0,5, 1, 2 e 4	1
<i>Dosagem (g/t AD)*</i>	100	10, 25, 50, 100 e 200
<i>Actividade (U/g)**</i>	4,9	0,5; 1,2; 2,5; 4,9; 9,8
<i>Carga (%)***</i>	0,01	0,001; 0,003; 0,006; 0,01; 0,02

* grama de solução enzimática por tonelada de pasta “air dry” tal qual como é fornecida (correspondente a uma pasta com 10% de humidade) – unidades indicadas pelo fornecedor.

** unidade de actividade de xilanase por grama de pasta (cálculos no Anexo I2)

*** cálculos no Anexo I2

Após os tratamentos enzimáticos procedeu-se à determinação da viscosidade da pasta e à formação de folhas de pasta para medir a respectiva brancura ISO e brancura após reversão, de forma a concluir-se quais as melhores condições para o tratamento enzimático que exibissem melhor resultados. Após a realização dos ensaios necessários, chegou-se à conclusão (Anexo II 2) que as condições óptimas para a xilanase EI1 eram as mesmas que o fornecedor indicava – 60°C, pH 6 e 100 g/tAD (4,9 U/g o.d.p) para um tempo de reacção de 1h.

6.3.1 Efeito do Tempo

Na Figura 34 apresenta-se a influência que o tempo de operação da xilanase tem na evolução da brancura, identificando-se o tempo de 1h como o valor mais adequado pois que o seu aumento não melhora qualquer uma das características analisadas. Nestas condições verifica-se um aumento de quase 1,5 pontos na brancura ISO da pasta inicial DED1.

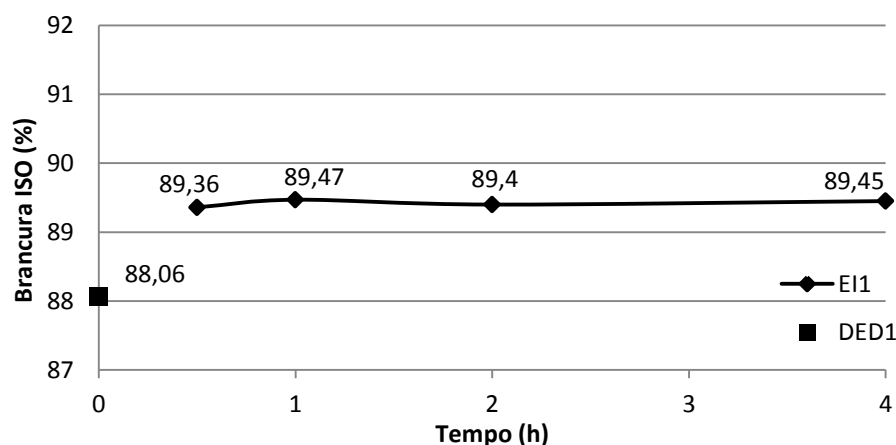


Figura 34: Evolução da brancura ISO (%) em função do tempo de reacção do tratamento enzimático com EI1 – pasta DED1 (pH 6, 60°C, 0,01% ou 4,9 U/g)

É referido na literatura que o tratamento enzimático tem como objectivo promover a acção dos reagentes de branqueamento nos estágios seguintes, nomeadamente através da remoção das xilanas depositadas na superfície da fibra, levando a um menor consumo de reagentes (Roncero et al., 2005). Este fenómeno é chamado de *bleach boosting*, onde não ocorre um branqueamento directo da pasta. No entanto, nos valores apresentados na figura 34 é possível verificar um aumento da brancura imediatamente após aplicação da xilanase na pasta (mesmo antes de haver branqueamento químico). A este fenómeno dá-se o nome de branqueamento directo e a sua causa pode estar relacionada com a capacidade da xilanase afectar as ligações LCC com a remoção de alguns fragmentos de lenhina e cromóforos associados (Jong et al., 1997; Shatalov & Pereira, 2008; Yang & Eriksson, 1992).

Quanto à sua eventual capacidade de *bleach boosting* esta será avaliada mais adiante após a aplicação de um estágio de branqueamento com dióxido de cloro ou peróxido de hidrogénio.

A Figura 35 mostra que a aplicação do tratamento enzimático promove uma maior estabilidade da pasta, reduzindo o seu PC *number* em cerca de 1 décima em relação à pasta

original. Este fenómeno já era previsível, sendo uma das vantagens do tratamento enzimático (Shatalov & Pereira, 2008; Simeonova et al., 2007; Sousa, 2012; Thakur et al., 2012).

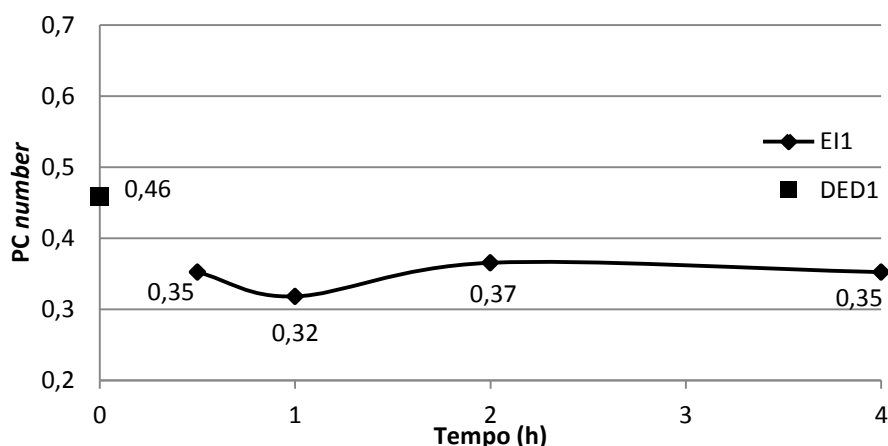


Figura 35: Evolução do PC number em função do tempo de reacção do tratamento enzimático com EI1 – pasta DED1 (pH 6, 60°C, 0,01% ou 4,9 U/g)

Quanto à viscosidade (Figura 36) verifica-se um ligeiro aumento do seu valor que pode ser justificado pelo aumento da proporção celulose/xilana como resultado da degradação e posterior solubilização de xilana que tem um peso molecular inferior ao da celulose. Este comportamento já foi verificado noutros estudos (Sousa, 2012).

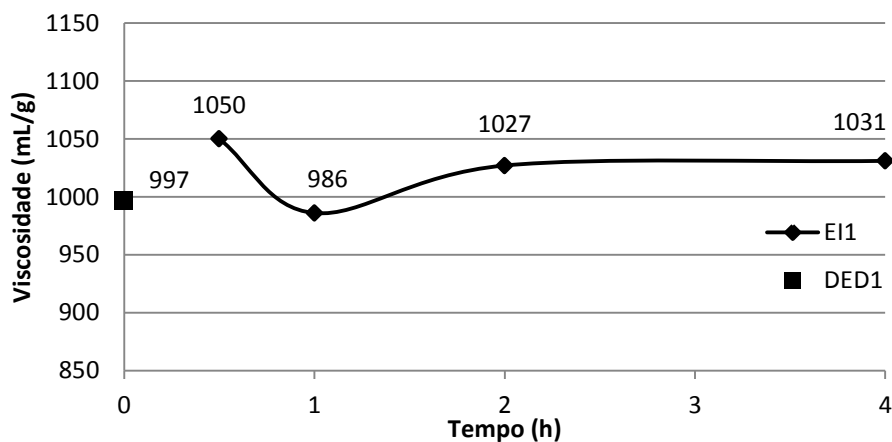


Figura 36: Evolução da viscosidade em função do tempo de reacção do tratamento enzimático com EI1 – pasta DED1 (pH 6, 60°C, 0,01% ou 4,9 U/g)

6.3.2 Efeito da Carga

Depois de determinado o tempo óptimo de tratamento, estudou-se o efeito que a dosagem da solução enzimática tinha na evolução da brancura, PC number e viscosidade, mantendo as restantes condições (pH 6, 60°C e 60 min). A carga de enzima variou entre 10 – 200 g/tAD.

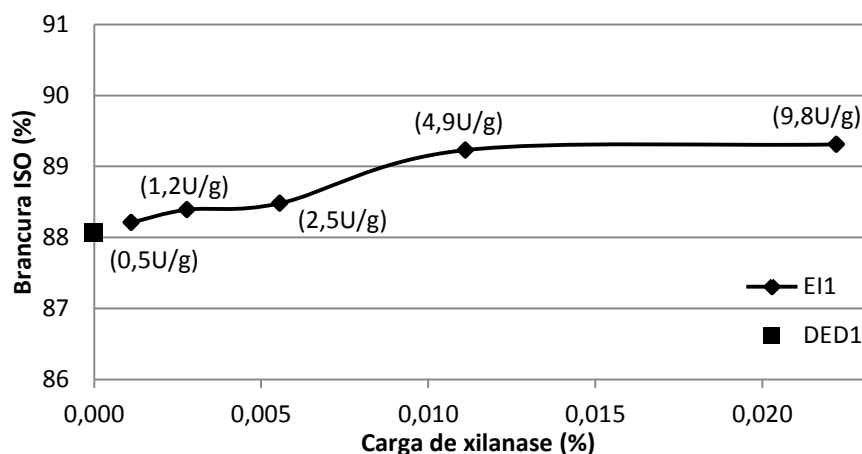


Figura 37: Estudo da carga da enzima EI (massa de solução de enzima/massa de pasta seca, %) na evolução da brancura. Entre parêntesis encontram-se os valores da dosagem em unidades de actividade de xilanase por grama de pasta seca (pH 6, 60°Ce 60min)

Analisando a Figura 37 é perceptível um aumento acentuado da brancura com o aumento de carga aplicada até ser atingido um patamar a partir da carga de 0,01% (100 g/tAD). O mesmo ocorre com a evolução do PC number mas em sentido inverso – Figura 38 – isto é, obtém-se valores inferiores ao da pasta original, de acordo com outros estudos (Shatalov & Pereira, 2008), como resultado da remoção crescente de compostos absorventes de luz.

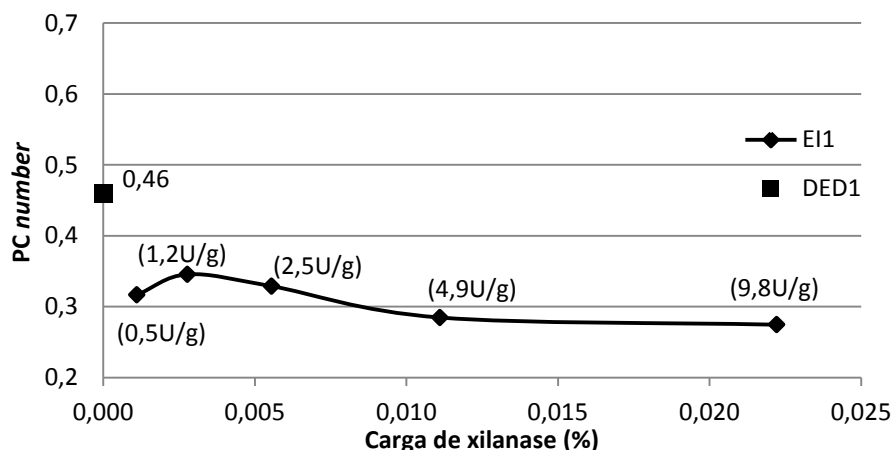


Figura 38: Evolução do PC number com a carga de enzima EI1 – Pasta DED1 (pH 6, 60°Ce 60min)

No que diz respeito à evolução da viscosidade, esta apresenta um ligeiro aumento em relação à pasta inicial, como se mostra na Figura 39, embora para a carga mais baixa de 0,001% (10 g/tAD) se verifique uma diminuição brusca que ainda não foi possível justificar. Só após a realização de ensaios complementares de análise de actividade celulolítica e de ensaios sem a presença de enzima se poderá obter pistas para este comportamento.

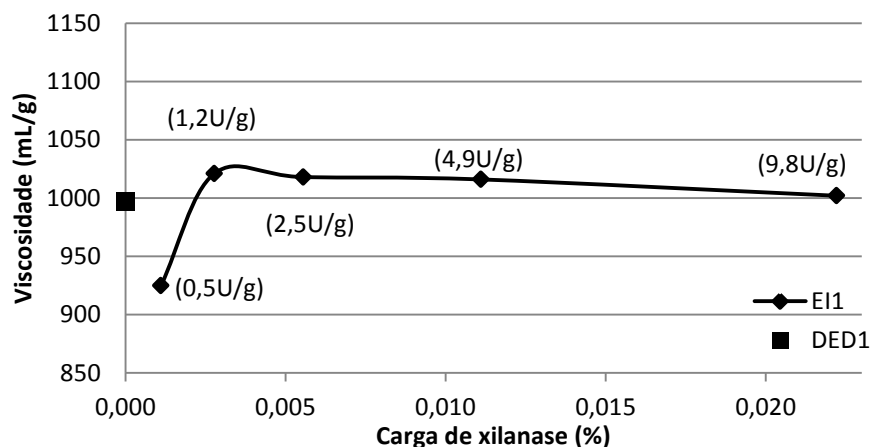


Figura 39: Evolução da viscosidade em função da carga de enzima E11 – Pasta DED1 (pH 6, 60°Ce 60min)

6.4 Branqueamentos finais

Depois do estudo de optimização dos tratamentos enzimáticos e selecção das respectivas condições operatórias procedeu-se, nas pastas pré-tratadas (DEDX e DEX), ao branqueamento com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio. Estes branqueamentos tiveram como objectivo a avaliação da poupança que se consegue obter dos reagentes de branqueamento quando aplicados após o pré-tratamento colocado em diferentes posições da sequência de branqueamento (DEDXD, DEDXP e DEXD). O posicionamento do estágio enzimático X como penúltimo estágio, em vez de último (p.e. DEDDX), decorreu das conclusões obtidas num trabalho recente que abordou esta temática, tendo sido essa a posição mais vantajosa (Sousa, 2012). Em pastas brancas industriais a brancura ISO final é geralmente 90,5% (Sevastyanova et al., 2011), tendo este sido um valor de referência para avaliar o desempenho dos tratamentos efectuados neste trabalho.

Para este estudo incluíram-se mais duas xilanases estudadas por Ferraz (2013), EN4 e EN5, de forma a analisar cada um dos seus desempenhos e os seus efeitos na poupança de reagentes. Na Tabela 22 encontram-se as condições de tratamento enzimático e na Tabela 23 as condições para o branqueamento químico posterior.

Tabela 22: Condições do tratamento enzimático aplicado às pastas DED e DE

<i>Variáveis</i>	<i>E11</i>	<i>EN4</i>	<i>EN5</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	60	50	70
<i>Tempo (min)</i>	60	60	60
<i>pH</i>	6	5	7
<i>Carga (U/g o.d.p)</i>	4,9	4,5	4,9

Tabela 23: Condições dos branqueamentos com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio para as diferentes pastas pré-tratadas com xilanases

<i>Branqueamento com Dióxido de Cloro</i>	<i>Pasta DEDX</i>	<i>Pasta DEX</i>
Temperatura (°C)	70	70
Tempo (min)	150	150
Carga de ClO ₂ (como Cl ₂ activo) (%)	0,1 e 0,3	0,4 – 2
<i>Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio</i>	<i>Pasta DEDX</i>	
Temperatura (°C)	70	
Tempo (min)	60	
Carga de H ₂ O ₂ (%)	0,5	
Carga de NaOH (%)	0,65	
Carga de MgSO ₄ .7H ₂ O (%)	0,2	

6.4.1 Pasta DEDX

Na Figura 40 é possível observar os efeitos dos pré-tratamentos enzimáticos com cada uma das xilanases ensaiadas (pastas DEDX) no desempenho do dióxido de cloro aplicado posteriormente (pastas DEDXD). Como referência, usou-se a pasta original DED2 sem tratamento enzimático que foi sujeita às mesmas cargas de dióxido de cloro (pastas DEDD).

Em todos os casos conseguem-se valores elevados de brancura na pasta mas o desempenho não é o mesmo.

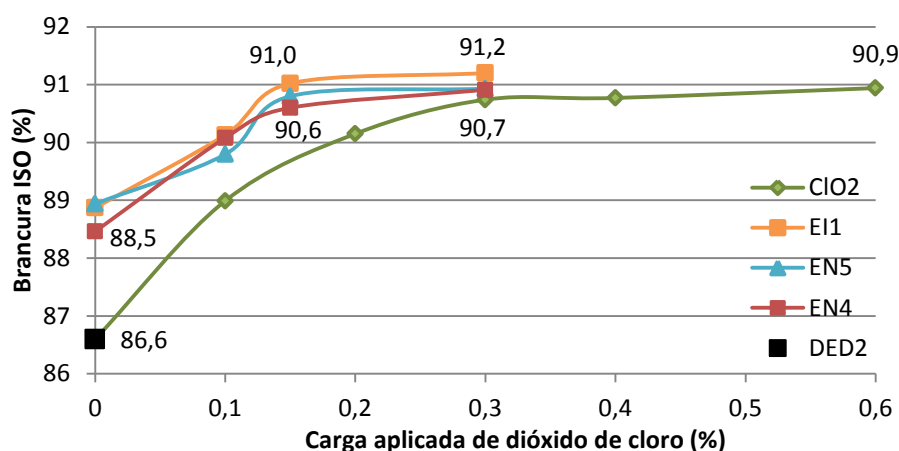


Figura 40: Evolução da brancura depois da aplicação de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: E11 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

Com a mesma carga enzimática aplicada (~ 5 U/g) e com a mesma carga dióxido de cloro de 0,15%, a xilanase E11 exibe um maior *bleach boosting* pois conseguiu um ganho de brancura cerca de 2,2 pontos, enquanto a enzima EN5 apresentou um ganho perto de 1,9 pontos. Ambas permitem atingir uma brancura semelhante (90,8 – 91,0%) do que a pasta de referência (90,7%) usando menos 50% de dióxido de cloro (0,15% em vez de 0,3% como cloro activo). Estes resultados comprovam mais uma vez que o pré-tratamento enzimático permite diminuir o consumo de reagentes no branqueamento subsequente, conseguindo-se atingir a brancura pretendida (Senior et al., 1992; Thakur et al., 2012; Vicuña et al., 1997). Já a enzima EN4, com uma carga de 4,5 U/g, mostra um *bleach boosting* semelhante ao da

xilanase EN1 (2,1 pontos) atingindo no entanto uma brancura ligeiramente inferior. Também para o caso da EN4 se verifica uma poupança semelhante de dióxido de cloro (cerca de 50 %), dado que uma carga deste reagente de 0,15% numa pasta tratada com esta enzima permite atingir uma brancura ISO de 90,6%, idêntica à brancura obtida só com dióxido de cloro para uma carga de 0,3% (90,7 % ISO) – Figura 40.

O ganho de brancura e a brancura final obtida, nem sempre significam eficácia do tratamento, devendo-se sempre analisar outros parâmetros, como o PC *number*, a viscosidade, bem como o teor de ácidos hexenurónicos, índice *kappa* entre outros (Shatalov & Pereira, 2008). Assim, na Figura 41, ilustram-se os efeitos de cada uma das enzimas no PC *number*, antes e após o branqueamento com dióxido de cloro. Após o branqueamento com dióxido de cloro concluiu-se que o pré-tratamento enzimático promove uma diminuição do PC *number* em relação ao branqueamento apenas com dióxido de cloro da pasta não pré-tratada (DEDXD *versus* DEDD), especialmente no caso da xilanase EI1. Esta redução no valor de PC *number* atinge cerca de 0,2 pontos da pasta DEDD para a mesma carga de dióxido de cloro aplicada entre 0,15 e 0,3% como cloro activo.

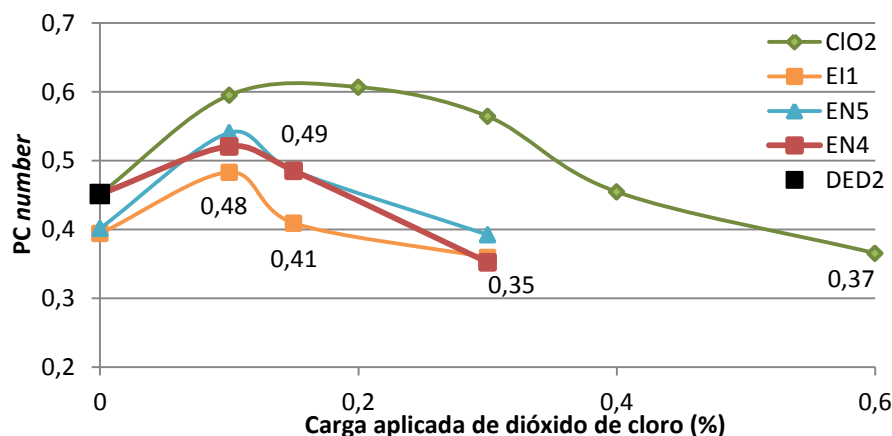


Figura 41: Evolução do PC *number* depois da aplicação de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

Apesar do tratamento enzimático ser benéfico relativamente à diminuição do consumo de reagentes e estabilidade da brancura, este pode levar a um abaixamento do rendimento, uma vez que pode haver uma degradação acentuada das xilanas (Simeonova et al., 2007). Para se avaliar a perda de rendimento com o tratamento enzimático, efectuou-se um ensaio com enzima EI1 e posterior aplicação de dióxido de cloro (Tabela 24). Este ensaio foi realizado nas mesmas condições dos anteriores (X: pH 6, 60 min, 60°C e 100 g/tAD; D: 0,15% de cloro activo), sendo a filtração da pasta realizada num funil de *Buchner* de vidro com placa porosa, de modo a evitar ao máximo a perda de fibra. Apresenta-se como comparação o ensaio sem tratamento enzimático e com branqueamento final com dióxido de cloro, com uma carga de 0,3% de cloro activo.

Tabela 24: Resultado do rendimento obtido com dióxido de cloro e com aplicação da enzima EI1 seguida do branqueamento com dióxido de cloro

<i>Ensaio</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>
<i>DEDX</i>	99,81	88,0
<i>DEDD</i>	99,72	90,7
<i>DEDXD</i>	98,63	91,0
<i>DEDXP</i>	97,98	90,7

Pela Tabela 24 é possível concluir que há uma ligeira perda de rendimento (0,2%) usando um tratamento enzimático na pasta DED. Contudo, nos branqueamentos completos (**DEDD** vs **DEDXD** e **DEDXP**) verifica-se uma perda de rendimento de 1% quando se aplica a xilanase seguida de dióxido de cloro e de 2% quando se aplicada a xilanase seguida de peróxido de hidrogénio, confirmando que este reagente provoca um maior ataque aos polissacarídeos. Esta perda de rendimento mostra que a xilanase quebra a cadeia de xilana dando origem a oligossacáridos que são depois dissolvidos na etapa final do branqueamento (estágios D ou P).

A Figura 42 mostra o efeito do tratamento enzimático na viscosidade das pastas pré-tratadas (**DEDX**) como nas pastas branqueadas com dióxido de cloro (**DEDXD** e **DEDD**). Concluiu-se que a aplicação do tratamento enzimático provoca o aumento da viscosidade da pasta original, como resultado da hidrólise das xilanas, indicando também que as enzimas não apresentam actividade celulótica, sendo este um aspecto bastante positivo pois mostra a selectividade da acção enzimática (Valls et al., 2011). A enzima EI1 mostra ser aquela que tem um ataque mais selectivo às xilanas, levando ao maior valor de viscosidade obtido para as pastas **DEDX**. Após o branqueamento subsequente com dióxido de cloro, as pastas **DEDXD** exibem viscosidades ligeiramente superiores às pastas de referência (**DEDD**) para a mesma carga de dióxido de cloro no estágio final. Esta conclusão foi também comprovada noutros estudos (Senior et al., 1992).

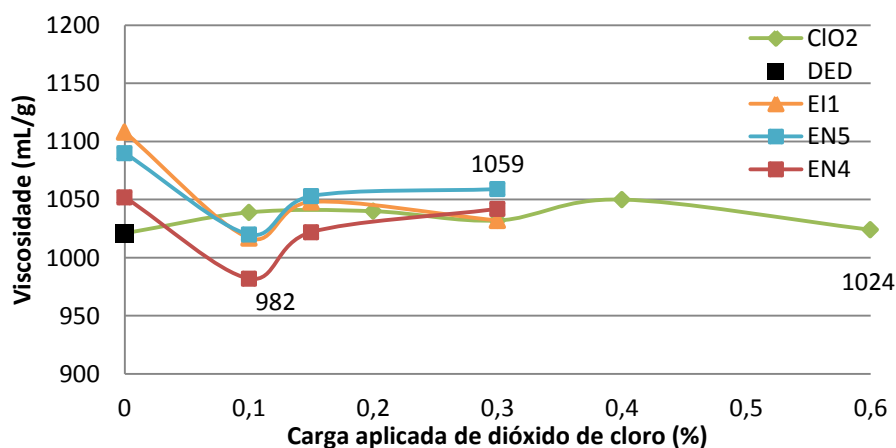


Figura 42: Evolução da viscosidade em função da carga aplicada de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

O peróxido de hidrogénio foi outro reagente utilizado no estágio final de branqueamento, mostrando as Figuras 43 a 45 os resultados correspondentes às evoluções da brancura, da reversão e da viscosidade. No branqueamento com peróxido de hidrogénio a enzima EI1

continua a conseguir um *bleach boosting* maior, conferindo à pasta maior ganho de brancura, como apresentado na Figura 43. A enzima EN5 com uma carga enzimática de ~ 5 U/g consegue atingir um ganho de brancura próximo à da enzima EI1 com a mesma carga aplicada. Não houve aplicação de tratamento enzimático com a enzima EN4, uma vez que esta não apresentava um potencial de melhoria muito elevado. Esta foi a enzima que apresentou um desempenho menos satisfatório.

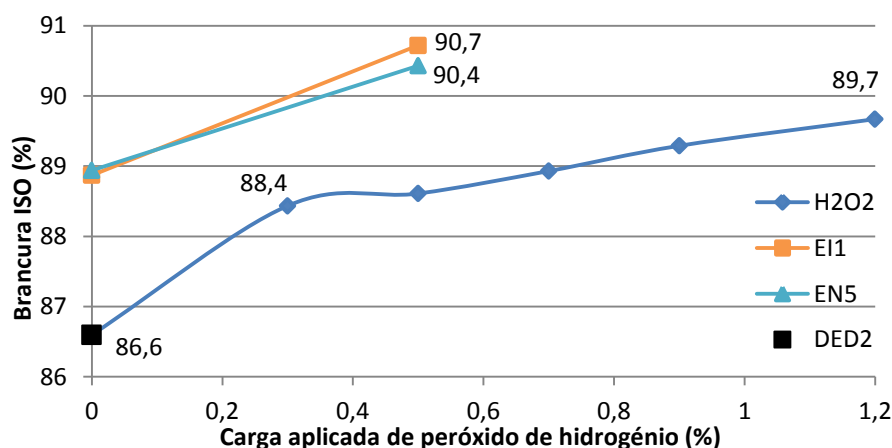


Figura 43: Evolução da brancura depois da aplicação de peróxido de hidrogénio à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

Ainda comparando o desempenho das enzimas EI1 e EN5 no branqueamento final com peróxido, com o branqueamento final com dióxido os ganhos de brancura são menores no primeiro sendo o desempenho da EN5 pior. Daqui pode-se concluir que as enzimas apresentam efeitos distintos em cada etapa de branqueamento, tendo cada uma delas acções diferentes na pasta. Como se esperava, o branqueamento com dióxido de cloro apresenta melhores resultados do que o tratamento com peróxido (Valls et al., 2011).

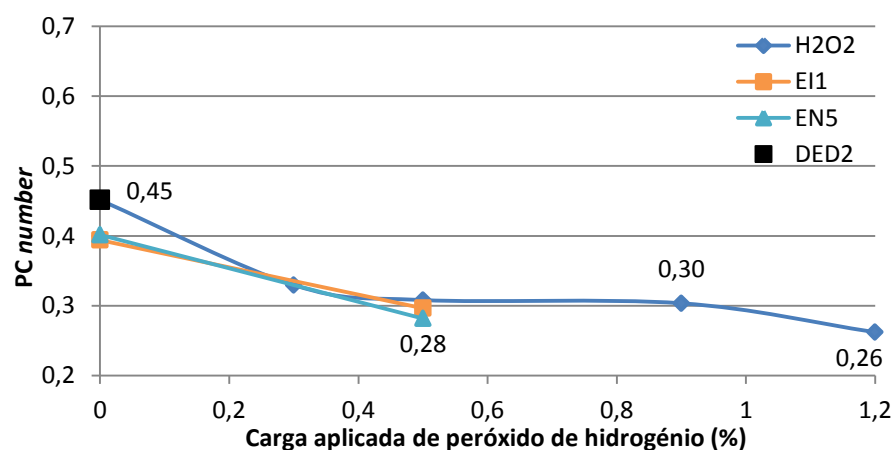


Figura 44: Evolução do PC number depois da aplicação de peróxido de hidrogénio à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

No que respeita à reversão, tanto a enzima EI1 como a enzima EN5 provocam uma redução acentuada no PC number após aplicação do peróxido de hidrogénio. É de realçar que esta redução é maior do que a verificada no caso do dióxido de cloro havendo um efeito

sinérgico entre os dois tratamentos à pasta (enzimático e branqueamento com peróxido de hidrogénio).

Como já foi referido, a avaliação da viscosidade de uma solução de pasta é um parâmetro bastante importante, traduzindo a extensão de degradação que ocorre com os polissacarídeos, durante os processos de deslenhificação e branqueamento (Shatalov & Pereira, 2008). A maior ou menor alteração da viscosidade vai reflectir a selectividade de cada etapa. Contudo, o valor da viscosidade vai ser o resultado de um balanço entre a degradação da celulose (que a faz diminuir), a solubilização de fragmentos de celulose e a degradação/solubilização das xilanas (que a poderá fazer aumentar devido ao facto de terem um grau de polimerização pequeno). Pela análise da figura 45 é evidente que, muito embora haja uma diminuição da viscosidade em relação à pasta original, ocorre uma preservação com o pré-tratamento enzimático quando este é seguido pelo branqueamento de peróxido de hidrogénio (Shatalov & Pereira, 2008). De facto, uma brancura ISO de ~ 90,5% é conseguida com 0,5% de peróxido enquanto uma carga de peróxido de 1,2% aplicada numa pasta sem pré-tratamento não permite obter uma brancura ISO além de 90%, com uma quebra na viscosidade muito acentuada. As enzimas EI1 e EN5 continuam a mostrar um comportamento idêntico no seu desempenho.

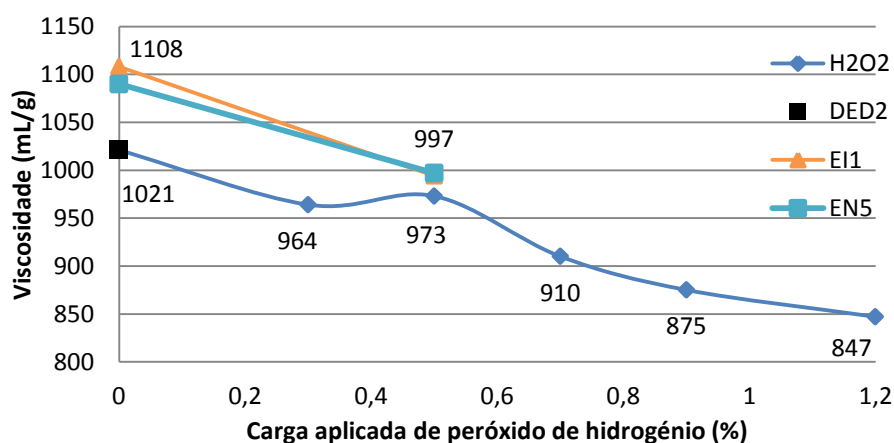


Figura 45: Evolução da viscosidade depois da aplicação de peróxido de hidrogénio à pasta DED2 ou às pastas DEDX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g)

6.4.2 Pasta DEX

A aplicação do tratamento enzimático nas pastas DE, seguido de um estágio de dióxido teve como principal objectivo estudar a possibilidade da eliminação de um estágio de dióxido de cloro (sequência DEXD) e estudar a poupança que se poderia obter. A pasta DE branqueada exclusivamente com dióxido de cloro foi usada como referência (pasta DED). Uma vez que a sequência DE tem como último estágio uma extracção alcalina e uma brancura ainda muito reduzida, não se estudou a aplicação do reagente peróxido de hidrogénio, uma vez que este não iria providenciar a brancura final desejada. Para este estudo, além da enzima EI1, incluíram-se as 2 enzimas usadas por Ferraz (2013), de forma a comparar cada um dos seus comportamentos e respectiva poupança.

Como se pode observar na Figura 46, com as xilanases EI1 e EN5 consegue-se atingir, imediatamente após o tratamento enzimático, um maior valor de brancura em comparação a acção da EN4, ao contrário do que se observou no tratamento enzimático aplicado na pasta DED. Quando se efectua o branqueamento posterior com dióxido de cloro, as xilanases EI1 e EN5 apresentam um efeito bastante idêntico entre si e sempre superior ao da enzima EN4. As pastas pré-tratadas com as enzimas EI1 e EN5 conseguem atingir brancuras na gama dos 90% ISO, ao contrário da enzima EN4 que não consegue alcançar mais do que 88%.

Com os resultados obtidos da brancura é possível concluir que, usando um pré-tratamento enzimático, poderia haver a supressão de um estágio de dióxido de cloro, uma vez que se conseguem atingir brancuras maiores do que 90% ISO. No entanto, poderá não ser vantajoso quando analisadas as outras propriedades da pasta. Como comprovado anteriormente, as enzimas diferem nos seus comportamentos, obtendo diferentes *bleach boosting*, dependendo da enzima aplicada, sequência e reagente seguinte aplicado (Shatalov & Pereira, 2008).

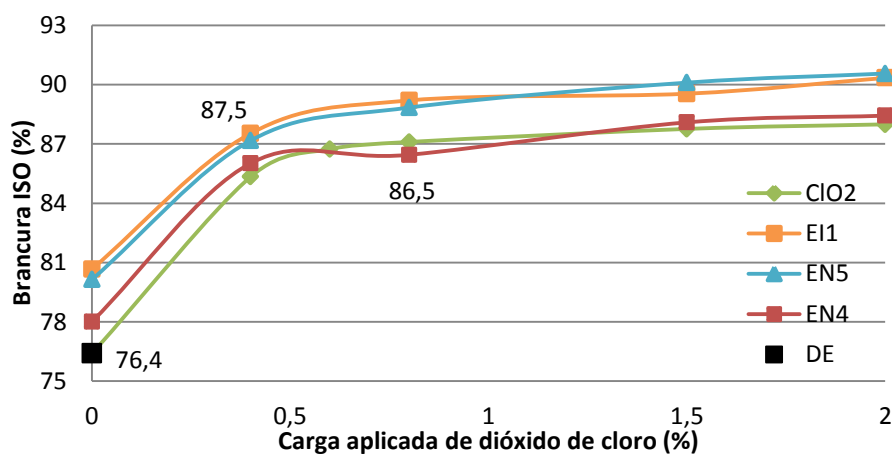


Figura 46: Evolução da brancura depois da aplicação de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DE ou pastas DEX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g)

No que diz respeito ao PC *number*, a pasta DE comporta-se da mesma forma que a pasta DED1 (usada inicialmente) com o tratamento enzimático, exibindo menor reversão. Adicionalmente comprova-se que um estágio enzimático prévio ao estágio com dióxido de cloro faz diminuir o PC *number* da pasta DEXD resultante quando comparado com a utilização apenas do estágio de dióxido de cloro sem enzima - DED. Tal como se observou na Figura 46, as enzimas EI1 e EN5 têm efeito semelhante, obtendo-se sempre com elas os melhores resultados.

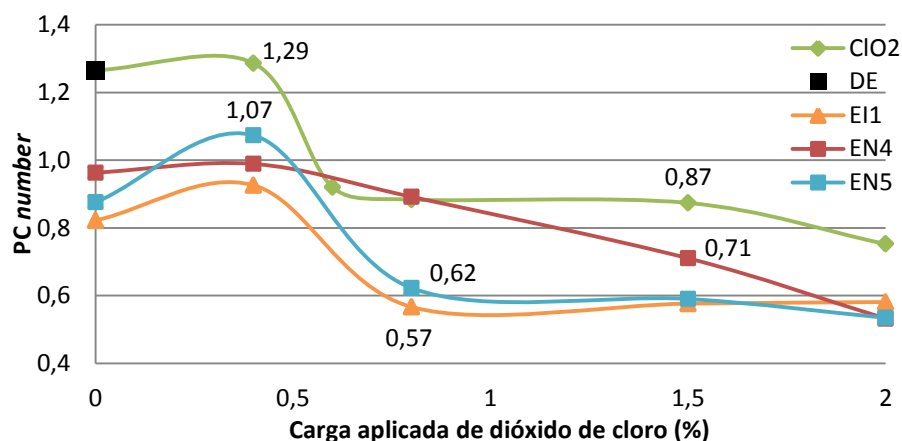


Figura 47: Evolução do PC number depois da aplicação de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DE ou pastas DEX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

Pela Figura 48 verifica-se que todas as pastas pré-tratadas com enzimas e branqueadas em seguida com dióxido de cloro apresentam uma viscosidade inferior à pasta original (DE) mas superior à pasta de referência (DED) para a mesma carga de reagente. O pré-tratamento ajuda a manter os níveis de viscosidade iniciais balanceando a perda que ocorre exclusivamente pela acção do dióxido de cloro sobre a pasta que ainda se verifica nestas etapas iniciais.

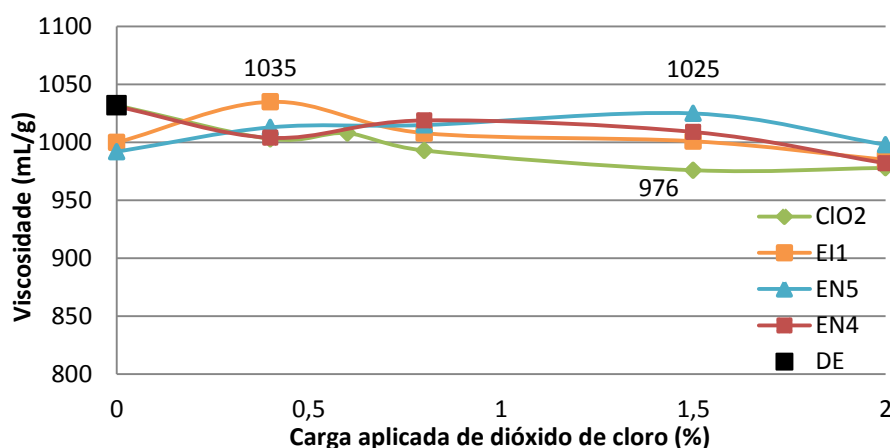


Figura 48: Evolução da viscosidade depois da aplicação de dióxido de cloro (como cloro activo) à pasta DE ou pastas DEX pré-tratadas com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g

Sumariando todas as conclusões retiradas até ao momento, pode-se concluir que existe uma grande variabilidade entre pasta podendo provocar ligeiras diferenças nos resultados que seriam esperados. As melhores condições a utilizar num tratamento enzimático não podem ser generalizadas e deverão ser determinadas caso a caso. É também importante referir que a comparação entre xilanase de diferentes origens não é linear, dependendo muito da dosagem aplicada, da composição e do mecanismo de actuação de cada uma. O desempenho de cada uma na poupança de reagentes é também muito dependente da origem da matéria-prima, da sequência de branqueamento prévia ou posterior ao tratamento enzimático, isto é, da “história da pasta”, entre muitos outros factores (Jeffries et al., 1998).

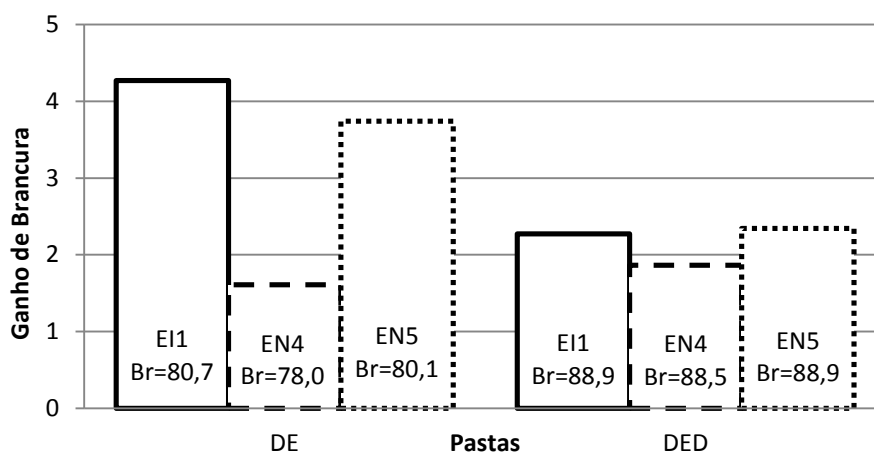


Figura 49: Comparação dos ganhos de brancura nas pastas DE e DED2 com aplicação do tratamento enzimático com X: EI1 – 4,9 U/g, EN4 – 4,5 U/g e EN5 – 4,9 U/g. Br – brancura atingida após tratamento enzimático.

Fazendo uma comparação entre a aplicação das xilanases nas pastas DE e DED, é possível verificar pela Figura 49, que há um ganho maior de brancura nas pastas DE. Este maior aumento pode ser uma consequência da pasta DE ainda se encontrar numa fase de deslenhificação residual e de mais fácil remoção dos grupos cromóforos mais reactivos. Quando, em seguida, se aplica um estágio de dióxido de cloro de forma a atingir a mesma brancura final, há uma redução da reversão em todas as pastas como se pode visualizar na Tabela 25. No entanto, a supressão de um estágio de dióxido de cloro mesmo mantendo a aplicação de um tratamento enzimático na sequência DE (**DEXD** versus **DEDXD**) é desvantajosa no que respeita às características finais da pasta, como brancura, reversão e viscosidade, confirmando que o branqueamento deve ser realizado em multi estágios de modo a minimizar a degradação na pasta e maximizar a brancura. Quando, por outro lado se suprime um estágio de dióxido de cloro por aplicação de um tratamento enzimático (**DEXD** vs **DEDD**) consegue-se uma poupança significativa de dióxido de cloro quando se pretende atingir a mesma brancura (ver translação das curvas observadas na Figura 46).

Tabela 25: Características das pastas após branqueamento com dióxido de cloro com ou sem pré-tratamento enzimático X, usando a mesma carga de enzima (ver Fig. 49) e uma carga de dióxido de cloro de forma a obter idêntica brancura final

	<i>Carga de dióxido (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>PC number</i>	<i>Viscosidade (mL/g)</i>
DE	-	76,4	1,27	1032
DEDD	1,5 + 0,15	88,5	0,72	996
DEXD	EI1 0,8; 1,5	89,2; 89,5	0,57	1008
	EN4 1,5	88,1	0,71	1009
	EN5 0,8; 1,5	88,8; 90,1	0,62	1015
DED	-	86,6	0,45	1021
DEDD	0,3	90,7	0,56	1032
DEDXD	EI1 0,15	91,0	0,41	1048
	EN4 0,15	90,6	0,49	1022
	EN5 0,15	90,8	0,49	1053

6.5 Poupança de Reagentes

Para ser mais facilmente entendível os prós e contras das diferentes sequências aplicadas, procedeu-se à construção da Tabela 26 onde se resumem todos os resultados obtidos de cada tratamento enzimático e com reagente químico, isoladamente. Esta tabela serve como “tabela de controlo” de modo a se poder comparar os ganhos de brancura e variação de PC number obtidos no final, comparativamente com os resultados iniciais.

Tabela 26: Resultados dos diferentes tratamentos enzimáticos e branqueamentos químicos

	<i>Carga (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>Ganho Brancura</i> **	<i>PC number</i> ***	<i>Varição do PC number</i> ****	<i>Viscosidade (mL/g)</i>
Pasta DED						
<i>DED</i>	-	86,6	-	0,45	-	1021
<u>DEDX</u>						
<i>EI1</i>	0,01 (4,9 U/g)	88,9	2,3	0,39	0,06	1108
<i>EN4</i>	0,15 (4,5 U/g)	88,5	1,9	0,45	0,00	1052
<i>EN5</i>	0,05 (4,9 U/g)	88,9	2,3	0,40	0,05	1090
<u>DEDD</u>						
<i>Dióxido</i>	0,3*	90,7	4,1	0,56	-0,11	993
<u>DEDP</u>						
<i>Peróxido</i>	1,2	89,7	3,1	0,26	0,19	847
Pasta DE						
<i>DE</i>	-	76,4	-	1,27	-	1032
<u>DEX</u>						
<i>EI1</i>	0,01 (4,9 U/g)	80,7	4,3	0,82	0,45	1000
<i>EN4</i>	0,15 (4,5 U/g)	78,0	1,6	0,96	0,31	1031
<i>EN5</i>	0,05 (4,9 U/g)	80,1	3,7	0,88	0,39	992
<u>DED</u>						
<i>Dióxido</i>	1,5 + 0,15 *	88,5	12,1	0,72	0,55	996

* Carga em cloro activo

** diferença entre a brancura final obtida e a brancura inicial da pasta original (DE ou DED)

$$*** \text{ PC number} = 100 \cdot \left(\frac{(1-R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} \text{ após reversão} - \frac{(1-R_{\infty})^2}{2 \cdot R_{\infty}} \text{ antes da reversão} \right)$$

**** diferença entre o PC number da pasta original (DE ou DED) e o PC number da pasta com estágio (X, D ou P)

Na Tabela 27 apresentam-se as cargas de reagentes usadas nos branqueamentos finais para as sequências DEDXD e DEDXP, com a respectiva poupança em reagente D ou P que se conseguiu com aplicação do tratamento enzimático, comparativamente ao tratamento químico DEDD e DEDP. Conclui-se que o tratamento com as três xilanases leva a uma poupança de reagente semelhante: à volta dos 50% no consumo de dióxido de cloro (EI1, EN4 e EN5) e de 58% no de peróxido de hidrogénio (EI1 e EN5) quando a brancura ISO final das pastas é ~91%. Estes resultados vêm confirmar outros obtidos em os diversos estudos já publicados onde se verificou que o tratamento enzimático reduz o consumo de reagentes químicos de

branqueamento em etapas posteriores (Daneault et al., 1994; Senior et al., 1992; Sousa, 2012). É de realçar que, no caso do peróxido de hidrogénio, a brancura atingida com o tratamento enzimático foi uma unidade de brancura ISO superior, do que com um estágio de peróxido com a carga máxima estudada (pastas DEDXP vs DEDP).

Tabela 27: Análise da poupança de reagentes no branqueamento da pasta DED para uma brancura ISO final de ~91%.

<i>Carga de reagente (%)</i>					
	<i>Enzima + Branqueamento Químico (DEDXD e DEDXP)</i>	<i>Tratamento só com Dióxido (DEDD)</i>	<i>Tratamento só com Peróxido (DEDP)</i>	<i>Ganho de brancura ISO (%) *</i>	<i>Poupança de D ou P (%)</i>
<i>EII</i>	0,15 (Cl ₂ activo)	0,3	-	4,42	0,50
	0,5 (H ₂ O ₂)	-	1,2	4,12	0,58
<i>EN4</i>	0,15 (Cl ₂ activo)	0,3	-	4,00	0,50
	-	-	-	-	-
<i>EN5</i>	0,15 (Cl ₂ activo)	0,3	-	4,20	0,50
	0,5 (H ₂ O ₂)	-	1,2	3,83	0,58

* diferença entre a brancura ISO final obtida e brancura ISO inicial da pasta original (DE ou DED)

6.6 Análise Económica

Para avaliar o potencial da aplicação de um tratamento enzimático com xilanases no branqueamento não basta a sua eficácia técnica, sendo também necessário analisar a sua viabilidade económica. Desta forma é possível concluir se o processo é ou não rentável quando aplicado industrialmente.

Neste capítulo é importante contrabalançar os gastos investidos nos tratamentos com xilanases e os ganhos resultantes do decréscimo de dosagens de reagentes usados posteriormente. Na Tabela 28 apresentam-se os preços aproximados de cada um dos reagentes utilizados e para cada uma das xilanases. Estes preços foram facultados pelas empresas que forneceram as xilanases para o estudo.

Tabela 28: Preço de cada reagente (€/t)

<i>Dióxido de Cloro</i>	<i>Peróxido de Hidrogénio</i>	<i>Solução de Enzima (EII)</i>	<i>Solução de Enzima (EN4)</i>	<i>Solução de Enzima (EN5)</i>
1300	600	10000	9350	8675

A Tabela 29 apresenta os preços finais para cada uma das sequências estudadas, que atingem brancuras de aproximadamente 90% ISO.

Tabela 29: Resultados da análise económica

<i>Sequência</i>	<i>Carga de químico (%)</i>	<i>Carga de enzima ** (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>PC number</i>	<i>Custo Dióxido</i>	<i>Custo Peróxido</i>	<i>Custo Enzima</i>	<i>Custo total (€/t)</i>
<i>Pasta DED</i>								
<i>DEDD</i>	0,6*	-	90,9	0,37	2,97			2,97
<i>DEDP</i>	1,2	-	89,7	0,26		7,2		7,20
<i>Enzima EII</i>								
<i>DEDXD</i>	0,15*	0,011	91,0	0,41	0,74		1,1	1,84
<i>DEDXP</i>	0,5	0,011	90,7	0,30		3	1,1	4,10
<i>Enzima EN4</i>								
<i>DEDXD</i>	0,15*	0,15	90,6	0,49	0,74		14,03	14,77
<i>Enzima EN5</i>								
<i>DEDXD</i>	0,15*	0,05	90,9	0,39	0,74		4,34	5,08
<i>DEDXP</i>	0,5	0,05	90,4	0,28		3	4,34	7,34
<i>Pasta DE</i>								
<i>DEDD</i>	1,5 + 0,15	-	88,5	0,72	8,16			8,16
<i>Enzima EII</i>								
<i>DEXD</i>	0,8*	0,011	89,2	0,57	3,95		1,1	5,05
<i>Enzima EN4</i>								
<i>DEXD</i>	1,5*	0,15	88,1	0,71	7,41		14,03	21,44
<i>Enzima EN5</i>								
<i>DEXD</i>	0,8*	0,05	88,8	0,62	3,95		4,34	8,24

* carga de cloro activo

** carga = massa de solução de enzima por unidade de massa de pasta seca, em percentagem;

Começando pela análise da sequência DED é possível concluir que o tratamento com a xilanase EI1 leva a uma poupança de 1,13 €/t e 3,11 €/t no custo final quando se branqueia com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio, respectivamente. Tanto a utilização da xilanase EN4 como a da EN5 levam a um custo final superior à sequência convencional. No entanto, no caso do branqueamento com peróxido de hidrogénio, verifica-se que a utilização da xilanase EN5 (na sequência DEDXP) confere à pasta uma maior brancura e o aumento do preço final é insignificante. Já para a sequência com dióxido de cloro, o tratamento prévio com a xilanase EN5 fica muito mais dispendioso para a sequência DEDXD, uma vez que atingem a mesma brancura mas a diferença no preço final é bastante mais elevada.

Para a sequência DE como não se conseguiu atingir valores superiores a 90% de brancura para todas as pastas, optou-se por fazer a comparação para uma brancura final à volta dos 89%. Novamente comprova-se que a xilanase EI1 é a mais eficiente e a mais económica, conseguindo a pasta DEXD o maior valor de brancura (89,2%) com a carga mais baixa de cloro activo (0,8%) e apresentando um custo inferior comparativamente ao branqueamento sem pré-tratamento enzimático, conseguindo uma poupança de 3,11 €/t. A pasta tratada com a xilanase EN4 apresenta valores inacceptáveis de custo. A xilanase EN5 atinge a mesma brancura final com um aumento no custo insignificante, com a vantagem da diminuição do PC number.

7. CONCLUSÕES

A estabilidade da pasta e a poupança de reagentes que se consegue obter com um tratamento enzimático eram dois dos principais objectivos propostos deste estudo. Concluiu-se que qualquer uma das enzimas promove uma maior estabilidade na brancura final na pasta, bem como a poupança de reagentes químicos. Verifica-se igualmente que o tratamento enzimático seguido do branqueamento químico (**DEXD**, **DEDXD** e **DEDXP**) promove uma maior estabilidade quando comparado com os estágios de reagentes químicos (**DED**, **DEDD** e **DEDP**). O tratamento enzimático mostrou também um efeito de promoção no ganho da brancura conseguindo uma maior preservação da viscosidade bem como a diminuição do uso de químicos no branqueamento.

O uso de xilanase mostrou um ataque selectivo às xilanas, facilitando o alcance dos reagentes de branqueamento e provocando um efeito de *bleach boosting*. O *bleach boosting* foi observado para as três xilanases ensaiadas, EI1, EN5 e EN4, por ordem decrescente. Em relação à pasta original **DED**, a xilanase EI1 provocou um ganho na brancura no branqueamento final com dióxido de cloro (**DEDXD**) de 4,4 pontos, a EN5 de 4,2 pontos e a EN4 de 4 pontos, alcançando 91,0, 90,8 e 90,6% de brancura ISO, respectivamente, enquanto a pasta **DEDD** exibiu 89,6% para a mesma carga de dióxido de cloro (0,15% como cloro activo). No caso dos branqueamentos com a pasta **DE** as xilanases EI1 e EN5 conseguiram um maior *bleach boosting*, provocando um aumento de brancura de 13 e 13,7 pontos enquanto a EN4 apresentou um ganho de 11,7 pontos, com brancuras finais de 89,5, 90,1 e 88,1%, respectivamente, enquanto a pasta **DED** exibiu 87,8% para a mesma carga de dióxido de cloro (1,5% como cloro activo). No branqueamento final com peróxido de hidrogénio, foi novamente a xilanase EI1 que mostrou maior desempenho, com um ganho de brancura de 4 pontos, atingindo os 90,7%. A EN5 mais uma vez teve um comportamento semelhante conseguindo um ganho de 3,8 pontos. A xilanase EN4 não foi aplicada nos branqueamentos com peróxido de hidrogénio, visto não apresentar potencial para as brancuras finais pretendidas.

Com as três enzimas estudadas obteve-se uma poupança de reagente semelhante: 50% no uso de dióxido de cloro e 58% no uso de peróxido de hidrogénio na pasta **DED**, obtendo-se facilmente brancuras na ordem dos 91%.

No branqueamento com a pasta **DE**, tendo como objectivo a supressão de um estágio de dióxido de cloro mantendo a aplicação de um tratamento enzimático na sequência **DE** (**DEXD** versus **DEDXD**), concluiu-se que essa eliminação é desvantajosa nas características finais da pasta, como brancura, reversão e viscosidade. No entanto, à excepção do uso da xilanase EN4, essa supressão permite uma poupança significativa de dióxido de cloro quando se pretende atingir a mesma brancura, embora num nível inferior (~89 – 90%). Estes resultados confirmam que o branqueamento deve ser realizado em multi estágios de modo a minimizar a degradação na pasta e maximizar a brancura.

Pela breve análise económica efectuada, comprovou-se que a aplicação da xilanase E11 nas pastas DED e DE leva sempre a valores mais baixos de custo de branqueamento, tanto com dióxido de cloro como peróxido de hidrogénio nos estágios finais. A xilanase EN5 apenas se mostra mais económica quando aplicado peróxido de hidrogénio como estágio final na sequência DED e origina um custo semelhante na pasta DE com aplicação do dióxido de cloro (**DEXD vs DED**).

Trabalhos futuros:

- Analisar os ácidos hexenurónicos e outros compostos oxidados constituintes das pastas como outros ácidos carboxílicos e grupos carbonilo;
- Estudar o comportamento da brancura ISO (%) após reversão com outra técnica de envelhecimento forçado;
- Testar a viabilidade deste estudo numa pasta proveniente de outra sequência de branqueamento;
- Estudar o efeito deste tratamento numa matéria-prima diferente origem;
- Comparar o desempenho de duas enzimas com origens diferentes (fúngica e bacteriana);
- Avaliar as propriedades papeleiras resultantes das pastas;

BIBLIOGRAFIA

- Aguiar, A., & Ferraz, A. (2011). Mecanismos envolvidos na biodegradação de matérias lignocelulósicas e aplicações tecnológicas correlatas. *Quim. Nova*, 34(10), 1729-1738.
- Aleksandrova, G. P., Medvedeva, S. A., Babkin, V. A., Petrenev, V. A., Sergeeva, I. V., Sergeev, A. D., Sinitsyn, A. P., & Okunev, O. N. (1998). Use of enzymes in kraft pulp bleaching. *Fifth European Workshop on Lignocellulose and Pulp*, 113-115.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology progress*, 15, 147-157.
- Bajpai, P. (2005). *Environmentally benign approaches for pulp bleaching*: Elsevier Science Limited.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3), 326-338.
- Biermann, C. J. (1996). *Handbook of pulping and papermaking*: Academic press.
- Bolaski, W. (1959). Enzymatic conversion of cellulosic fibers: Google Patents.
- Buchert, J., Bergnor, E., Lindblad, G., Viikari, L., & Ek, M. (1997). Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. *Tappi journal*, 80(6), 165-171.
- Buchert, J., Ranua, M., Kantelinen, A., & Viikari, L. (1992). The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pine kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 825-829.
- Buchert, J., Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Viikari, L., & Vuorinen, T. (1995). Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in conventional pine kraft pulp. *Tappi journal*, 78.
- Call, H., & Mücke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of biotechnology*, 53(2), 163-202.
- Carter, H. A. (1996). The chemistry of paper preservation: Part 2. The yellowing of paper and conservation bleaching. *Journal of chemical education*, 73(11), 1068.
- Carvalho, M. (2013). Eucalipto já se tornou a primeira espécie da floresta nacional
Acedido em 30-01-2013. Disponível em:

<http://www.publico.pt/economia/noticia/eucalipto-ja-se-tornou-a-primeira-especie-da-floresta-nacional-1582656>

- Carvalho, M. G. V. S. (1999). *Efeitos das variáveis de cozimento nas características químicas de pastas kraft de Eucalyptus globulus* Tese Doutorado – Universidade de Coimbra.
- Celpa. (2012). História do Papel Acedido em 28-11-2012. Disponível em www.celpa.pt
- Chandranupap, P., & Nguyen, K. L. (1998). Kinetics of chlorine dioxide delignification. *Appita journal*, 51(3), 205-208.
- Clark, T., McDonald, A., Senior, D., & Mayers, P. (1990). Mannanase and xylanase treatment of softwood chemical pulps: effects on pulp properties and bleachability. *Biotechnology in the pulp and paper industry ed. Kirk, TM and Chang, HM*, 137-144.
- Daneault, C., Leduc, C., & Valade, J. L. (1994). The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review. *Tappi journal*, 77(6), 125-131.
- Demuner, B. J., Pereira Junior, N., & Antunes, A. (2011). Technology Prospecting on Enzymes for the Pulp and Paper Industry. *Journal of technology management & innovation*, 6(3), 148-158.
- Dence, C. W., & Reeve, D. W. (1996). *Pulp Bleaching: Principles and Practice*. Atlanta, Georgia: TAPPI press.
- Dhiman, S. S., Sharma, J., & Battana, B. (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: A review. *BioResources*, 3(4), 1377-1402.
- Diehm, R. A. (1942). Process of manufacturing paper: Google Patents.
- Ebringerová, A. (2006). *Structural diversity and application potential of hemicelluloses*. Paper presented at the Macromolecular symposia.
- Eriksson, K. E. L. (1990). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*, 24(1), 79-101.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*: Springer-verlag.
- Eriksson, K. E. L., Kuhad, R. C., & Singh, A. (1997). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 57.

- Evtuguin, D. V., Tomás, J. L., Silva, A. M. S., & Neto, C. P. (2003). Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill. *Carbohydrate research*, 338(7), 597-604.
- Fengel, D., & Wegener, G. (1984). *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*.
- Ferraz, J. G. R. (2013). *Avaliação de tratamentos enzimáticos na estabilidade da branca de pastas kraft de eucalipto*. Tese de Dissertação, Universidade de Coimbra.
- Ferreira, P. J. T. (2000). *Estudos de pastas Kraft de Eucalyptus globulus: características estruturais e aptidão papeleira*. Doutorado, Universidade de Coimbra.
- Fillat, U., Roncero, M. B., Bassa, A., & Sacón, V. M. (2012). Effect of commercial xylanases applied at extreme conditions in a eucalyptus pulp mil *Tappi Journal*, 11(10), 53-59.
- Florestal, D. N. G. (2010). *5º Inventário Florestal Nacional*.
- Garg, G., Dhiman, S. S., Mahajan, R., Kaur, A., & Sharma, J. (2011). Bleach-boosting effect of crude xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX on wheat straw pulp. *New Biotechnology*, 28(1), 58-64.
- Germer, E., Métais, A., & Hostachy, J. C. (2012). Cinco obstáculos no caminho de uma nova tecnologia (pp. 53 - 57): Revista O Papel - ABTCP São Paulo.
- Ghatora, S. K., Chadha, B. S., Badhan, A., Saini, H., & Bhat, M. (2006). Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. *BioResources*, 1, 18-33.
- Ghose, T., & Bisaria, V. (1987). Measurement of hemicellulase activities part 1: xylanases. *Pure Appl. Chem*, 59(12), 1739-1752.
- Gil, N., Gil, C., Amaral, M. E., Costa, A. P., & Duarte, A. P. (2009). Use of enzymes to improve the refining of a bleached *Eucalyptus globulus* kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 46(2), 89-95.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., & Gold, M. H. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and biophysical research communications*, 114(3), 1077-1083.
- Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N., & da Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, 30(1), 136-145.

- Harazono, K., Kondo, R., & Sakai, K. (1996). Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without Addition of MnSO₄. *Applied and environmental microbiology*, 62(3), 913-917.
- Hart, P. W. (2012). Differences in bleaching responses from fungal-versus bacterial-derived enzymes. *Tappi journal*, 11(3).
- Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251.
- Holik, H. (2006). *Handbook of paper and board*: Wiley-vch.
- INE. (2012). Estatísticas da Produção Industrial 2011.
- Irie, Y., Matsukura, M., & Hata, K. (1993). Avoiding pitch troubles using acylgerol lipase: Google Patents.
- Jeffries, T. W., Davis, M., Rosin, B., & Landucci, L. L. (1998). Mechanisms for kappa reduction and color removal by xylanases. *enzyme*, 4, 2,319.
- Jiang, Z. H., Van Lierop, B., & Berry, R. (2000). Hexenuronic acid groups in pulping and bleaching chemistry. *Tappi journal*, 83(1).
- Jong, E., Wong, K. K. Y., & Saddler, J. N. (1997). The mechanism of xylanase prebleaching of kraft pulp: An examination using model pulps prepared by depositing lignin and xylan on cellulose fibers. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 51(1), 19-26.
- Jurasek, L., & Paice, M. (1986). Pulp, paper and biotechnology. *Chemtech*, 16(6), 360-365.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M., & Viikari, L. (1993). Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 47(4), 318-324.
- Kibblewhite, R. P., Bawden, A. D., & Hughes, M. (1991). Hardwood market kraft fibre and pulp qualities. *Appita journal*, 44(5), 325-332.
- Kim, T., Ow, S., & Eom, T. (1991). *Enzymatic deinking method of wastepaper*. Paper presented at the Proceedings of TAPPI pulping conference, Orlando, Florida.
- Kirk, R. E., Othmer, D. F., & Mark, H. F. (2004). *Encyclopedia of Chemical Technology* (5th edition ed. Vol. 21): Interscience Publishers.

- Kirk, T. K., & Yang, H. H. (1979). Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnology letters*, 1(9), 347-352.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., & Wagenknecht, W. (1998). *Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: Fundamentals and analytical methods*: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Liitiä, T., & Tamminen, T. (2007). *How to evaluate the kraft pulp brightness stability?* Paper presented at the Proceedings of the 3rd International Colloquium on Eucalyptus Pulp, Belo Horizonte, Brazil.
- Loureiro, P. E. G. (2010). *Studies on the final bleaching of Eucalyptus globulus kraft pulps with hydrogen peroxide*. Doutoramento Universidade de Coimbra.
- Loureiro, P. E. G. (2012). *On the role of xylan in the final bleaching of Eucalyptus globulus Kraft pulps*. Tese Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Loureiro, P. E. G., Domingues, M. R. M., Fernandes, A. J. S., Carvalho, M., & Evtuguin, D. V. (2012). Discriminating the brightness stability of cellulosic pulp in relation to the final bleaching stage. *Carbohydrate Polymers*.
- Loureiro, P. E. G., Evtuguin, D. V., & Carvalho, M. (2011). The final bleaching of eucalypt kraft pulps with hydrogen peroxide: relationship with industrial ECF bleaching history and cellulose degradation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(3), 381-390.
- Loureiro, P. E. G., Fernandes, A. J. S., Carvalho, M., & Evtuguin, D. V. (2010). The assessment of chromophores in bleached cellulosic pulps employing UV-Raman spectroscopy. *Carbohydrate research*, 345(10), 1442-1451.
- Lourenço, A., Gominho, J., Ferreira, M. C., & Pereira, H. (2005). Estudo do efeito da aplicação enzimática no retardar do envelhecimento do papel.
- Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., & Vidal, T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource technology*, 99(17), 7959-7965.
- Montiel, M., Rodriguez, J., Pérez-Leblic, M., Hernández, M., Arias, M., & Copa-Patiño, J. (1999). Screening of mannanases in actinomycetes and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(2), 240-245.
- Mustранта, A., Fagernas, L., & Viikari, L. (1995). Effects of lipases on birch extractives. *Tappi journal*, 78.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Principles of biochemistry - Lehninger* (4 ed.): Palgrave Macmillan, ISBN-10.

- Novozymes® - A/S Copyright © (2010). Novozymes. All Rights Reserved - *Enzymes at work*. Acedido em 28-11-2012. Disponível em <http://www.novozymes.com>.
- Pedersen, L., Kihlgren, P., Nissen, A., & Munk, N. (1992). *Enzymatic bleach boosting of kraft pulp: laboratory and mill scale experiences*. Paper presented at the Tappi Pulping Conference, Books 1-3. Tappi Press, Atlanta. pp. 31-37.
- Pinho, J. (2010). 5.º Inventário Florestal Nacional - Apresentação do Relatório Final.
- Pinto, P. C. O. R. (2005). *Influência da estrutura química dos componentes da madeira no seu desempenho nos processos de produção de pastas celulósicas-estudo comparativo entre o eucalyptus globulus e outras folhosas*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro.
- Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J., & Amorim, D. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Pommier, J. C., Fuentes, J. L., & Goma, G. (1989). Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. I: The basis laboratory work. *Tappi journal*, 72(6), 187-191.
- Roberts, J. C. (1996). *The chemistry of paper* (Vol. 11): Royal Society of chemistry.
- Roncero, M. B., Torres, A. L., Colom, J. F., & Vidal, T. (2005). The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulps. *Bioresource technology*, 96(1), 21-30.
- Rowell, R. M. (2012). *Handbook of wood chemistry and wood composites*: CRC press.
- Saake, B., Clark, T., & Puls, J. (1995). Investigations on the reaction mechanism of xylanases and mannanases on sprucewood chemical pulps. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 49(1), 60-68.
- Senior, D., Hamilton, J., Bernier, R., & Du Manoir, J. (1992). Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment. *Tappi journal*, 75.
- Sevastyanova, O., Forsström, A., Wackerberg, E., & Lindström, M. E. (2011). *Bleaching of eucalyptus kraft pulps with chlorine dioxide: factors affecting the efficiency of the final D stage*. Paper presented at the International Pulp Bleaching Conference.
- Shatalov, A. A., & Pereira, H. (2008). Effect of xylanases on peroxide bleachability of eucalypt (*E. globulus*) kraft pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1), 19-26.

- Silva, C. H. C., Fonsêca, Â. S., Neto, S. A. L., Ximenes, E. A., Puls, J., & Filho, E. X. F. (2000). Evaluation of hydrolysis products of xylans by xylan-degrading enzymes from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), 81-83.
- Simeonova, G., Sjudahl, R., Ragnar, M., Lindström, M., & Henriksson, G. (2007). On the effect of a xylanase post-treatment as a means of reducing the yellowing of bleached hardwood kraft pulp. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 22(2), 172-176.
- Sixta, H. (2006). *Handbook of Pulp* (Vol. 1): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Sjöström, E. (1981). *Wood chemistry: Fundamentals and Applications*. San Diego, California: Academic Pr.
- Smook, G. (2002). *Handbook for pulp & paper technologists* Angus Wild Publication Inc.
- Soporcel, P. (2012). Floresta e Biodiversidade . Consultado em Novembro de 2012. Disponível em <http://www.portucelsoporcel.com/pt/group/forest.php>.
- Sousa, J. I. T. (2012). *Avaliação de um tratamento redutor e enzimático no branqueamento final de pasta kraft de eucalipto*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- Suess, H. U. (2010). *Pulp bleaching today*: de Gruyter.
- Suess, H. U., Schmidt, K., & Hopf, B. (2004). *How to improve brightness stability of ECF bleached softwood and hardwood kraft pulp*. Paper presented at the 58th Appita Annual Conference, Canberra.
- Suurnäkki, A., Mustranta, A., S., G., Tenkanen, M., Buchert, J., & Viikari, L. (1997). Enzymes in characterization of pulp fibres. *VTT Biotechnology and Food Research*.
- Thakur, V. V., Jain, R. K., & Mathur, R. M. (2012). Studies on xylanase and laccase enzymatic prebleaching to reduce chlorine-based chemicals during CEH and ECF bleaching. *BioResources*, 7(2), 2220-2235.
- Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science(Washington)*, 221(4611), 661-662.
- Tolan, J., Olson, D., & Dines, R. (1995). Survey of xylanase enzyme usage in bleaching in Canada: results highlight benefits and problems. *Pulp & Paper Canada*, 96(12), 107-110.

- Trotter, P. C. (1990). Biotechnology in the pulp and paper industry: a review - part 1: tree improvement, pulping and bleaching, and dissolving pulp applications. *TAPPI JOURNAL*, 73(4).
- Valls, C., Gallardo, Ó., Vidal, T., Pastor, F. I. J., Díaz, P., & Roncero, M. B. (2011). Performance of new and commercial xylanases for ECF and TCF bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Wood Science and Technology*, 45(3), 433-448.
- Valls, C., & Roncero, M. B. (2009). Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource technology*, 100(6), 2032-2039.
- Valls, C., Vidal, T., & Roncero, M. B. (2010). Boosting the effect of a laccase–mediator system by using a xylanase stage in pulp bleaching. *Journal of hazardous materials*, 177(1), 586-592.
- Ventorim, G., Caraschi, J. C., Colodette, J. L., & Gomide, J. L. (2009). The influence of hexenuronic acids in yield and bleachability of pulp kraft. *Química Nova*, 32(2), 373-377.
- Vicuña, R., Escobar, F., Osses, M., & Jara, A. (1997). Bleaching of eucalyptus kraft pulp with commercial xylanases. *Biotechnology letters*, 19(6), 575-578.
- Vidal, T., Torres, A., Colom, J., & Siles, J. (1997). Xylanase bleaching of eucalyptus kraft pulp: an economical ECF process: The use of xylanase in the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appita journal*, 50(2), 144-148.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., & Linko, M. (1986). *Bleaching with enzymes*. Paper presented at the Proceedings of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, STFI, Stockholm.
- Wong, K. K. Y., & Mansfield, S. D. (1999). Enzymatic processing for pulp and paper manufacture-a review. *Appita J*, 52(6), 409-418.
- Wong, K. K. Y., Martin, L. A., Gama, F. M., Saddler, J. N., & De Jong, E. (1997). Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft pulps.
- Yang, J. L., & Eriksson, K. E. L. (1992). Use of hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 46(6), 481-488.

ANEXOS

I – Actividade Enzimática

I 1 – Determinação da Actividade Enzimática

A actividade enzimática foi determinada com base no método proposto pela Universidade de *New South Wales*, na Austrália (Ghose & Bisaria, 1987). Este método indica que:

- Para enzimas de origem bacteriana, o ensaio deve ser realizado a 37°C e pH 7,2;
- Para enzimas de origem fúngica o ensaio deve ser realizado a 50°C e pH 4,8.

Como não era conhecida a origem de todas as enzimas, considerou-se que seriam todas de origem bacteriana, visto que uma delas era dessa origem.

O procedimento está descrito mais à frente, no Anexo III5.

Este método baseia-se na medição por meio do reagente DNS de equivalentes de xilose libertado da cadeia de xilana, como resultado da acção enzimática durante 60 min. Sendo necessário primeiramente determinar uma recta de calibração, usando uma xilose padrão (procedimento descrito no Anexo III5). Na Tabela I encontram-se os valores de absorvância, lidos a 640 nm no espectrofotómetro, obtidos para a xilose libertada correspondente.

Tabela I: Resultados obtidos da absorvância em função da xilose libertada

<i>Xilose (mg/mL)</i>	<i>Absorvância (640 nm)</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>média</i>
0,2	0,0549	0,0488	0,0519
0,4	0,14	0,1495	0,1448
0,6	0,2416	0,2364	0,2390
0,8	0,3293	0,3141	0,3217
1	0,403	0,4187	0,4109

Com os valores da Tabela I procedeu-se à construção da recta de calibração, como se mostra na Figura I. Na presença da enzima e nas condições indicadas vão se libertar açúcares redutores, cuja sua concentração é quantificada na curva de calibração usando xilose.

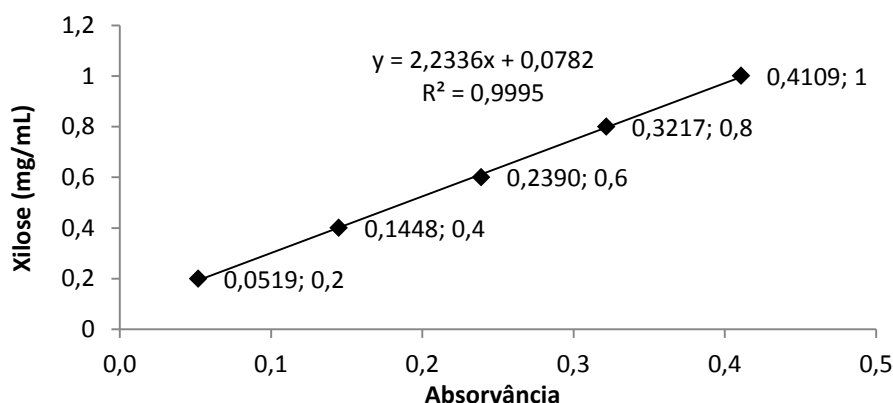


Figura I: Recta de calibração

Para determinar a actividade das enzimas em estudo foi necessário efectuar várias diluições de cada enzima na solução tampão (e.g. 1:1000, 1:10000), uma vez que a enzima deve estar diluída de modo a que 1 mL liberte entre 300 a 800 μg de xilose em 60 min. Posteriormente é lida a absorvância das amostras, num espectrofotómetro, a 640 nm. As leituras obtidas (absorvâncias) são depois convertidas em xilose libertada (mg/mL) através da recta de calibração efectuada anteriormente. Caso a xilose libertada não se encontre dentro do intervalo pretendido, é necessário fazer outra diluição.

A actividade enzimática é calculada através da Equação I

$$A_u = \frac{A_s \cdot t_s \cdot D_u}{t_u} \text{ [mU/mL]} \quad \text{Equação I}$$

Onde, A_s corresponde à actividade de uma enzima padrão (217 mU/mL); t_s é o tempo necessário para 1 mL de enzima padrão libertar a mesma quantidade de xilose que a enzima que se está a usar, durante 60 min (e pode ser determinado recorrendo à Figura II, de acordo com um estudo referido por Ghose & Bisaria, 1987); D_u é o factor de diluição da enzima e t_u corresponde ao tempo de incubação (60 min).

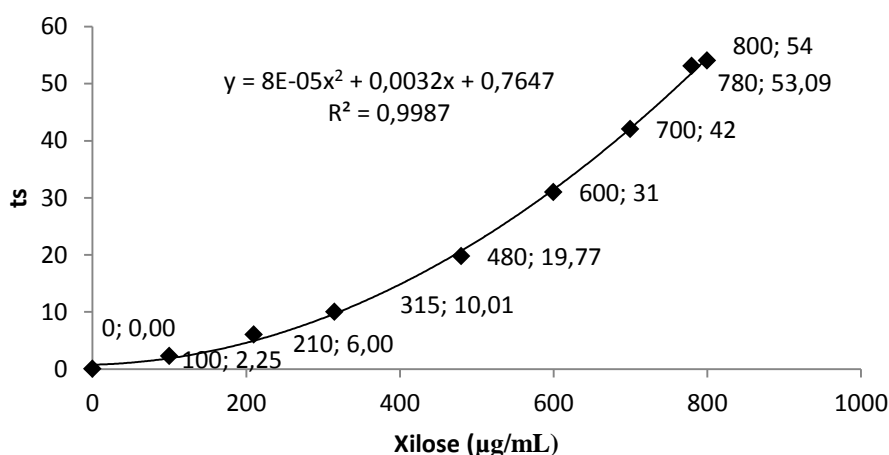


Figura II: Curva da actividade da xilanase padrão

I 2 – Cálculos de conversões

Foi necessário converter as doses e as cargas de enzima aplicadas nos branqueamentos, em unidades de actividade, para se poder comparar as enzimas na mesma base. Este cálculo encontra-se exemplificado para a xilanase EI1, para uma dose de 100 g/tAD.

Tabela II: Dados para as conversões

Actividade de solução enzimática (U/mL)	47600
Massa volúmica da solução enzimática (g/mL)	1,0772
Dose aplicada para as condições óptimas (g/tAD)	100
Massa de pasta absolutamente seca usada nos ensaios (g)	20

➤ Determinação da massa de solução de enzima correspondente à dose aplicada:

A dose aplicada nos ensaios finais foi 100 g/tAD, onde tonelada “air dry” significa que a pasta apresenta um teor de 10% de humidade, isto é, têm-se 100 g de solução enzimática por cada 0,9 t de pasta seca. Como nos ensaios realizados se utilizou uma base de 20 g de pasta seca, tem-se:

$$m_{\text{solução enzima}} = \frac{100 [g_{\text{solução enzima}}] \times 20 [g_{\text{pasta}}]}{1 \times 10^6 \times 0,9 [g_{\text{pasta}}]} = 2,22 \times 10^{-3} [g_{\text{solução enzima}}] \quad \text{Equação II}$$

O valor obtido corresponde à massa de solução enzimática original, sem qualquer diluição.

➤ Conversão de dose enzimática em carga aplicada:

Após a determinação da massa de solução de enzima que se vai utilizar em cada ensaio de branqueamento aplicada em 20 g de pasta absolutamente seca, correspondente à dose aplicada, pode determinar-se a carga de enzima, pela Equação III.

$$\text{carga \% } [g_{\text{solução enzima}}/g_{\text{pasta}}] = \frac{m_{\text{solução enzima}} [g_{\text{solução enzima}}]}{m_{\text{pasta seca}} [g_{\text{pasta}}]} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

Para 20 g de pasta seca e 100 g/tAD, tem-se:

$$\text{carga} = \frac{2,22 \times 10^{-3} [g_{\text{solução enzima}}] \times 100}{20 [g_{\text{pasta}}]} = 0,011 \% [g_{\text{solução enzima}}/g_{\text{pasta}}]$$

➤ Conversão de carga em unidades de actividade enzimática por grama de pasta:

A actividade enzimática determinada apresenta-se em unidades de actividade por mililitro de solução enzimática; para cada ensaio realizado é necessário saber o número de unidades de actividade por grama de pasta seca. Como a massa volúmica da solução enzimática é conhecida, aplica-se a Equação IV.

$$Actividade [U/g_{solução\ enzima}] = \frac{Actividade [U/mL_{solução\ enzima}]}{\rho_{solução\ enzima} [g_{solução\ enzima}/mL_{solução\ enzima}]} \quad \text{Equação IV}$$

Como exemplo, para a actividade determinada e dose aplicada, tem-se que:

$$Actividade = \frac{47600 [U/mL_{solução\ enzima}]}{1,0772 [g_{solução\ enzima}/mL_{solução\ enzima}]} = 44189 [U/g_{solução\ enzima}]$$

Pode-se então converter actividade enzimática em unidades de actividade por grama de pasta, usando a massa de solução enzimática adicionada a 20 g de pasta seca – Equação V:

$$Carga [U/g_{pasta}] = \frac{Actividade \left[\frac{U}{g_{solução\ enzima}} \right] * m_{solução\ enzima} [g_{solução\ enzima}]}{m_{pasta} [g_{pasta}]} \quad \text{Equação V}$$

$$Carga = \frac{44189 \left[\frac{U}{g_{solução\ enzima}} \right] * 2,22 \times 10^{-3} [g_{solução\ enzima}]}{20 [g_{pasta}]} = 4,9 [U/g_{pasta}]$$

II – Apresentação das Condições dos Ensaiois

II 1 – Condições do Tratamento enzimático

Tabela III: Condições de tratamento com a xilanase EII

<i>Ensaio</i>	<i>Dose (g/tAD)</i>	<i>Carga (%)</i>	<i>Actividade (U/mL)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>t (min)</i>
<i>Estudo do Tempo</i>						
<i>EII_1</i>	100	0,01	4,9	60	6	30
<i>EII_2</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_3</i>	100	0,01	4,9	60	6	120
<i>EII_4</i>	100	0,01	4,9	60	6	240
<i>Planeamento Experimental</i>						
<i>EII_5</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_6</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_7</i>	25	0,003	1,2	60	6	60
<i>EII_8</i>	100	0,01	4,9	60	6	15
<i>EII_9</i>	50	0,006	2,5	50	5	60
<i>EII_10</i>	50	0,006	2,5	50	7	60
<i>EII_11</i>	200	0,02	9,8	50	5	60
<i>EII_12</i>	200	0,02	9,8	50	7	60
<i>EII_13</i>	200	0,02	9,8	70	5	60
<i>EII_14</i>	200	0,02	9,8	70	7	60
<i>EII_15</i>	50	0,006	2,5	70	5	60
<i>EII_16</i>	50	0,006	2,5	70	7	60
<i>EII_17</i>	100	0,01	4,9	60	6	120
<i>EII_18</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_19</i>	100	0,01	4,9	60	7	60
<i>EII_20</i>	100	0,01	4,9	50	6	60
<i>Estudo da Temperatura para pH = 7</i>						
<i>EII_21</i>	100	0,01	4,9	40	7	60
<i>EII_22</i>	100	0,01	4,9	50	7	60
<i>EII_19</i>	100	0,01	4,9	60	7	60
<i>EII_28</i>	100	0,01	4,9	70	7	60
<i>EII_25</i>	100	0,01	4,9	80	7	60
<i>Estudo da Temperatura para pH = 8</i>						
<i>EII_23</i>	100	0,01	4,9	50	8	60
<i>EII_30</i>	100	0,01	4,9	60	8	60
<i>EII_29</i>	100	0,01	4,9	70	8	60
<i>EII_26</i>	100	0,01	4,9	80	8	60
<i>Estudo da Temperatura para pH = 6</i>						
<i>EII_20</i>	100	0,01	4,9	50	6	60
<i>EII_18</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_27</i>	100	0,01	4,9	70	6	60
<i>EII_24</i>	100	0,01	4,9	80	6	60
<i>Estuda da Carga 100 g/tAD; T = 60°C; pH = 6</i>						
<i>EII_33</i>	10	0,001	0,5	60	6	60
<i>EII_34</i>	25	0,003	1,2	60	6	60
<i>EII_35</i>	50	0,006	2,5	60	6	60
<i>EII_36</i>	100	0,01	4,9	60	6	60
<i>EII_37</i>	200	0,02	9,8	60	6	60

II 2 – Resultados do tratamento enzimático

Tabela IV: Resultados obtidos no tratamento com a xilanase EII

<i>Ensaio</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>Brancura ISO (%) após reversão</i>	<i>Reversão</i>	<i>PC number</i>	<i>Ganho brancura</i>	<i>Viscosidade (mL/g)</i>
<i>EII_1</i>	89,36	86,91	2,45	0,35	1,3	1050
<i>EII_2</i>	89,47	87,21	2,26	0,32	1,41	986
<i>EII_3</i>	89,4	86,86	2,54	0,37	1,34	1027
<i>EII_4</i>	89,45	86,98	2,47	0,35	1,39	1031
<i>EII_5</i>	89,05	87,51	1,54	0,22	0,99	1033
<i>EII_6</i>	89,29	87,14	2,15	0,31	1,23	1003
<i>EII_7</i>	89,02	86,88	2,14	0,31	0,96	1009
<i>EII_8</i>	89,29	87,19	2,1	0,30	1,23	1006
<i>EII_9</i>	88,86	86,58	2,28	0,34	0,8	1007
<i>EII_10</i>	89,36	87,32	2,04	0,29	1,3	1009
<i>EII_11</i>	89,37	87,36	2,01	0,28	1,31	997
<i>EII_12</i>	89,69	88,34	1,35	0,18	1,63	997
<i>EII_13</i>	89,19	86,98	2,21	0,32	1,13	974
<i>EII_14</i>	89,3	87,62	1,68	0,23	1,24	1009
<i>EII_15</i>	88,55	86,34	2,21	0,34	0,49	1020
<i>EII_16</i>	89,16	87,11	2,05	0,29	1,1	1010
<i>EII_17</i>	88,78	87,37	1,41	0,20	0,72	1008
<i>EII_18</i>	88,88	87,62	1,26	0,18	0,82	1029
<i>EII_19</i>	88,88	87,13	1,75	0,25	0,82	1035
<i>EII_20</i>	88,99	87,1	1,89	0,27	0,93	1007
<i>EII_21</i>	88,73	86,89	1,84	0,27	0,67	1019
<i>EII_22</i>	88,54	87,02	1,52	0,23	0,48	985
<i>EII_23</i>	88,69	87,29	1,4	0,20	0,63	985
<i>EII_24</i>	88,48	87,11	1,37	0,20	0,42	1000
<i>EII_25</i>	88,32	86,54	1,785	0,28	0,26	992
<i>EII_26</i>	87,72	85,77	1,95	0,32	-0,34	991
<i>EII_27</i>	88,88	87,28	1,6	0,23	0,82	1020
<i>EII_28</i>	88,76	86,94	1,82	0,27	0,7	1021
<i>EII_29</i>	88,89	87,46	1,43	0,20	0,83	995
<i>EII_30</i>	88,9	87,07	1,83	0,27	0,84	1015
<i>EII_10(2)</i>	88,83	86,99	1,84	0,27	0,77	1002
<i>EII_12(2)</i>	89,22	87,47	1,75	0,25	1,16	1018
<i>EII_31</i>	88,37	86,36	2,01	0,31	0,31	1038
<i>EII_32</i>	88,67	87,09	1,58	0,23	0,61	1032
<i>EII_33</i>	88,21	86,20	2,01	0,32	0,15	925
<i>EII_34</i>	88,39	86,18	2,21	0,35	0,33	1021
<i>EII_35</i>	88,48	86,35	2,13	0,33	0,42	1018
<i>EII_36</i>	89,23	87,23	2	0,28	1,17	1016
<i>EII_37</i>	89,31	87,36	1,95	0,27	1,25	1002

II 3 – Condições do Branqueamento com Dióxido de Cloro

Tabela V: Condições de branqueamento para o dióxido de cloro (carga de cloro activo)

T (°C)	t (min)	Pasta DED		Pasta DE	
		Ensaio	carga (Cl ₂ activo) (%)	Ensaio	carga (Cl ₂ activo) (%)
70	150	(DED)D1	0,1	(DE)D1	0,4
		(DED)D2	0,2	(DE)D2	0,6
		(DED)D3	0,3	(DE)D3	0,8
		(DED)D4	0,4	(DE)D4	1,5
		(DED)D5	0,6	(DE)D5	2,0
				(DE)DD	0,15 + 1,5

II 4 – Resultados do Branqueamento com Dióxido de Cloro

Tabela VI: Resultados obtidos no branqueamento com dióxido de cloro (carga de cloro activo)

Ensaio	Carga (%)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO (%) após reversão	PC number	Viscosidade (mL/g)
<i>Pasta DED</i>					
(DED)D1	0,1	89,0	85,3	0,59	1039
(DED)D2	0,2	90,2	86,0	0,61	1040
(DED)D3	0,3	90,7	86,6	0,56	1032
(DED)D4	0,4	90,8	87,3	0,45	1050
(DED)D5	0,6	90,9	88,0	0,37	1024
<i>Pasta DE</i>					
(DE)D1	0,4	85,3	79,8	1,29	1003
(DE)D2	0,6	86,7	81,3	0,92	1008
(DE)D3	0,8	87,1	82,6	0,88	993
(DE)D4	1,5	87,8	83,1	0,87	976
(DE)D5	2,0	88,0	83,8	0,75	978
(DE)DD	0,15 + 1,5	88,5	84,3	0,72	996

II 5 – Condições do Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio

Tabela VII: Condições de branqueamento para o peróxido de hidrogénio

Ensaio	Carga (%) H ₂ O ₂	Carga NaOH (%)	Carga de MgSO ₄ ·7H ₂ O (%)	T (°C)	t (min)
(DED)P1	0,3				
(DED)P2	0,5				
(DED)P3	0,7	0,55	0,2	70	60
(DED)P4	0,9				
(DED)P5	1,2				

II 6 – Resultados do Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio

Tabela VIII: Resultados obtidos no branqueamento de peróxido de hidrogénio

<i>Ensaio</i>	<i>Carga (%)</i>	<i>Consumo relativo H₂O₂ (%)</i>	<i>Consumo relativo NaOH (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>Brancura ISO (%) após reversão</i>	<i>PC number</i>	<i>Viscosidade (mL/g)</i>
<i>(DED)P1</i>	0,3	96,30	78,94	88,4	86,3	0,33	964
<i>(DED)P2</i>	0,5	97,55	73,36	88,6	86,6	0,31	973
<i>(DED)P3</i>	0,7	98,69	68,79	88,93	86,59	0,35	910
<i>(DED)P4</i>	0,9	98,68	55,89	89,3	87,2	0,30	875
<i>(DED)P5</i>	1,2	99,20	69,45	89,7	87,7	0,26	847

II 7 – Condições de Branqueamento Finais

Na tabela IX encontram-se apresentadas as condições de tratamento para cada xilanase, com as respectivas condições de branqueamento seguintes, com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio, para as pastas DED.

Tabela IX: Condições de tratamento enzimático e branqueamento com dióxido de cloro e peróxido de hidrogénio finais nas pastas pré-tratadas com as xilanases E11, EN4 e EN5

Xilanase	E11	EN4	EN5
<i>Carga (%)</i>	0,01	0,15	0,05
<i>T (°C)</i>	60	50	70
<i>t (min)</i>	60	60	60
<i>pH</i>	6	5	7
Branqueamento com Peróxido de Hidrogénio			
<i>Ensaio</i>	E11_P	EN5_P	
<i>Carga H₂O₂ (%)</i>	0,5	0,5	
<i>Carga NaOH (%)</i>	0,65	0,65	
<i>Carga MgSO₄.7H₂O (%)</i>	0,2	0,2	
Branqueamento com Dióxido de Cloro			
<i>Ensaio</i>	E11_D1	EN4_D1	EN5_D1
	0,1	0,1	0,1
	E11_D2	EN4_D2	EN5_D2
<i>Carga de ClO₂ (%)</i>	0,15	0,15	0,15
	E11_D3	EN4_D3	EN5_D3
	0,3	0,3	0,3

Na tabela X encontram-se apresentadas as condições do branqueamento final, com dióxido de cloro para as pastas DE pré-tratadas com xilanase.

Tabela X: Condições de branqueamento final com dióxido na pasta DE

<i>Xilanase</i>	<i>E11</i>	<i>EN4</i>	<i>EN5</i>
<i>Ensaio</i>	<i>(DE)E11_D1</i>	<i>(DE)EN4_D1</i>	<i>(DE)EN5_D1</i>
	0,4	0,4	0,4
	<i>(DE)E11_D2</i>	<i>(DE)EN4_D2</i>	<i>(DE)EN5_D2</i>
	0,8	0,8	0,8
<i>Carga de ClO₂ (%)</i>	<i>(DE)E11_D3</i>	<i>(DE)EN4_D3</i>	<i>(DE)EN5_D3</i>
	1,5	1,5	1,5
	<i>(DE)E11_D4</i>	<i>(DE)EN4_D4</i>	<i>(DE)EN5_D4</i>
	2,0	2,0	2,0

II 8 – Resultados dos Branqueamentos Finais

Tabela XI: Resultados dos branqueamentos finais

<i>Ensaio</i>	<i>Carga (%)</i>	<i>Brancura ISO (%)</i>	<i>Brancura ISO (%) após reversão</i>	<i>PC number</i>	<i>Viscosidade (mL/g)</i>
<i>E11_38</i>	100	88,87	86,28	0,39	1108
<i>E11_38D1</i>	0,1	90,13	86,68	0,48	1017
<i>E11_38D2</i>	0,15	91,02	87,77	0,41	1048
<i>E11_38D3</i>	0,3	91,20	88,24	0,36	1032
<i>E11_38P</i>	0,5	90,72	88,33	0,30	994
<i>(DE)E11_38</i>	100	80,67	77,89	0,82	1000
<i>(DE)E11_38D1</i>	0,4	87,53	82,68	0,93	1035
<i>(DE)E11_38D2</i>	0,8	89,20	85,55	0,57	1008
<i>(DE)E11_38D3</i>	1,5	89,54	85,73	0,58	1001
<i>(DE)E11_38D4</i>	2,0	90,34	86,24	0,58	985
<i>EN4_16</i>	0,15	88,46	85,64	0,45	1052
<i>EN4_16D1</i>	0,1	90,08	86,42	0,52	982
<i>EN4_16D2</i>	0,15	90,60	86,99	0,49	1022
<i>EN4_16D3</i>	0,3	90,91	88,08	0,35	1042
<i>(DE)EN4_16</i>	0,15	78,01	75,27	0,96	1031
<i>(DE)EN4_16D1</i>	0,4	86,02	81,40	0,99	1004
<i>(DE)EN4_16D2</i>	0,8	86,45	82,09	0,89	1019
<i>(DE)EN4_16D3</i>	1,5	88,09	84,04	0,71	1009
<i>(DE)EN4_16D4</i>	2,0	88,43	85,18	0,53	982
<i>EN5_15</i>	0,05	88,94	86,29	0,40	1090
<i>EN5_15D1</i>	0,1	89,80	86,11	0,54	1020
<i>EN5_15D2</i>	0,15	90,80	87,13	0,49	1053
<i>EN5_15D3</i>	0,3	90,93	87,82	0,39	1059
<i>EN5_15P</i>	0,5	90,43	88,21	0,28	997
<i>(DE)EN5_15</i>	0,05	80,14	77,29	0,88	992
<i>(DE)EN5_15D1</i>	0,4	87,17	81,83	1,07	1013
<i>(DE)EN5_15D2</i>	0,8	88,84	85,00	0,62	1015
<i>(DE)EN5_15D3</i>	1,5	90,10	86,03	0,59	1025
<i>(DE)EN5_15D4</i>	2,0	90,56	86,66	0,53	998

III – Descrição dos Procedimentos Experimentais

III 1 – Determinação Teor de Secura

Para a determinação do teor de secura procedeu-se da seguinte maneira:

- Pesar cerca de 3 g de pasta húmida numa caixa de pesagem com tampa (efectuar duas pesagens);
- Colocam-se as caixas de pesagem com as tampas, sem estarem tapadas, na estufa, a 105°C, durante no mínimo 4 horas e no máximo 24 h;
- No final de aproximadamente 4 horas, retiram-se as caixas, tapam-se e colocam-se num exsiccador durante 20 min;
- Após os 20 min coloca-se a caixa sem tampa na balança, espera-se até o valor estabilizar e tara-se a balança;
- Retira-se a caixa, deita-se fora a pasta nela contida e volta-se a colocar a caixa na balança registando o valor obtido;
- O valor obtido corresponde à massa de pasta seca;
- Pela seguinte fórmula determina-se o valor do teor de secura da pasta:

$$\text{Teor de secura} = \frac{\text{massa seca}}{\text{massa húmida}} \quad \text{Equação VI}$$

- Por fim faz-se a média entre os dois valores obtidos.

III 2 – Preparação da enzima

Como a carga enzimática aplicada é muito baixo, foi necessário proceder a uma diluição da enzima de 1:1000, na maioria dos ensaios, de forma a diminuir o erro associado.

Pela Equação VII determina-se a massa de reagente necessária ao ensaio. Em seguida como a enzima foi diluída de 1:1000 é necessário determinar o volume de solução a retirar, pela Equação VIII. Este volume é pesado e o seu valor é depois usado na Equação IX.

$$m_{\text{solução enzima}} (g) = \frac{\text{massa seca} \times \text{carga alcalina}}{100} \quad \text{Equação VII}$$

$$V_{\text{solução}} = \frac{m_{\text{solução enzima}}}{\rho_{\text{solução enzima}}} \times 1000 \quad \text{Equação VIII}$$

III 3 – Condições gerais dos ensaios

Todos os ensaios foram efectuados com base em 20 g de pasta seca, 200 g de suspensão e 10 % de consistência. Pela Equação III determina-se a massa de pasta húmida para cada ensaio e pela Equação VI determina-se a massa de água e enzima a introduzir no ensaio, tudo para uma suspensão de 200 g e consistência 10% como se verifica pela Equação X.

$$\text{massa suspensão} = m_{\text{pasta húmida}} + m_{\text{solução de enzima}} + m_{\text{água}} \quad \text{Equação IX}$$

$$\text{Consistência} (\%) = \frac{\text{massa seca}}{\text{massa suspensão}} \times 100 \quad \text{Equação X}$$

III 4 – Acerto do pH

Foi necessário acertar o pH dos branqueamentos com enzimas, de modo a garantir que os ensaios se realizassem ao pH requerido. Para isso seguiu-se o seguinte procedimento:

Reagentes:

- Solução de NaOH de diferentes molaridades
- Solução de HCl de diferentes molaridades
- Solução de enzima
- Pasta
- Água destilada

Material:

- Medidor de pH com eléctrodo de pH
- Pipetas de Pasteur
- Copos de 150 e 250 mL
- Magnetes

Procedimento:

- No copo de 250 mL, pesa-se a pasta húmida equivalente a 20 g de pasta seca;
- Em outro copo de 250 mL, pesa-se a água necessária aos 200 g de suspensão;
- Com a enzima diluída, coloca-se o volume correspondente à carga que se pretende no copo com a água e agita-se com um magnete;
- Mede-se o pH da solução e adicionam-se gotas de NaOH ou HCl consoante o pH que se pretende até um valor que pareça adequado;
- Regista-se o valor de pH da solução final e adiciona-se à pasta;
- Mistura-se a suspensão e por fim espreme-se a pasta, colocam-se o filtrado resultante num copo de 150 mL juntamente com um magnete;
- Mede-se o pH do filtrado com agitação continua;
- Se o pH estiver de acordo com aquilo que se deseja, repete-se o procedimento mais uma vez a fim de se comprovar o acerto;
- Caso o pH não seja o pretendido, repete-se o procedimento variando o número de gotas e variando as molaridades.

III 5 – Determinação da actividade enzimática da xilanase

Reagentes:

- Ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)
- Hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- Tartarato duplo de sódio de potássio
- Hidróxido de sódio
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- Fenol
- Sulfito de sódio
- Xilana (from *oat spelts*, Sigma)
- Xilose

Preparação Reagentes:**Tampão Mclivaine (pH=7.2) (no caso de enzimas produzidas por bactérias):**

- Misturar 13,8 mL de ácido cítrico de molaridade 0.1 M (21 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O/L$) com 86,2 mL de Na_2HPO_4 de molaridade 0.2 M (35.6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O/L$). Diluição do tampão de 1:10.

Reagente DNS:

Dissolver, em copos separados, cada um dos seguintes reagentes em água destilada, utilizando um total de 600 mL de água.

- 192 g tartarato duplo de sódio de potássio
- 10 g de hidróxido de sódio
- 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico
- 2 g de fenol
- 0,5 g de sulfito de sódio

Juntar todos os reagentes num copo de 1 L seguindo a ordem anterior, estando este em banho de maria. Deixar arrefecer, transferir para um balão volumétrico de 1L adicionar água destilada até à marca.

Xilana:

1% (w/v) suspenso em água. Manter numa suspensão uniforme, promovendo a agitação contínua.

Xilose:

1000 μ g de xilose por mL de água.

Curva de Calibração:

- Em seis tubos de ensaio introduzir (fazer em duplicado, excepto para o branco):

Tabela XII: Volume a introduzir

<i>Xilose (mL)</i>	<i>Água (mL)</i>	<i>Tampão (mL)</i>
1,0	1,0	1,0
0,8	1,2	1,0
0,6	1,4	1,0
0,4	1,6	1,0
0,2	1,8	1,0
0,0	2,0	1,0 (branco)

- Adicionar 3 mL de DNS a cada tubo, agitar e colocá-los num banho de água a ferver durante 15 min.
- Colocar os tubos em gelo, durante aproximadamente 5 min.
- Ler a absorvância no espectrofotómetro a 640 nm em cuvetes, começando pelo branco (que não contém xilose). Fazer a curva de calibração com os valores da absorvância.

Diluição da solução enzimática:

Efectuar diferentes diluições com solução tampão da solução enzimática (e.g. 1:1000; 1:10000; 1:100000).

Teste:

- Colocar em cada conjunto de 3 tubos (1 branco + 2 duplicados):
 - 1 mL de tampão
 - 1 mL de xilana
- Colocar os tubos num banho a 37 °C durante 10 min, bem como as diluições da solução enzimática.
- Juntar a dois tubos de cada conjunto (os duplicados A e B) a solução da enzima diluída. No terceiro tubo não se adiciona a enzima, uma vez que este é o branco.
- Agitar e colocar no banho todos os tubos durante 60 min, caso o banho não tenha agitação mecânica, agitar os tubos de vez em quando.
- De seguida, adicionar 3 mL de DNS a cada tubo. Nos tubos correspondentes ao ensaio branco adicionar ainda 1 mL da enzima diluída.
- Colocar os tubos de ensaio num banho de água a ferver durante 15 min. No final deste período colocar os tubos em gelo, durante 5 min.
- Ler a absorvância no espectrofotómetro a 640 nm em cuvetes, começando sempre pelo branco.

Conversão dos açúcares redutores em actividade da xilanase:

1 mL de enzima deve libertar entre 300 a 800 µg de açúcares redutores em 60 min. Se não estiver dentro deste intervalo fazer diluições maiores.

III 6 – Branqueamentos

Procedimento Experimental:

- Ligar o banho termostático à temperatura pretendida;
- Pesar a pasta húmida correspondente aos 20 g de pasta seca. Registrar o valor exacto. (Esta pesagem, deve ser efectuada directamente no saco de plástico.)
- Pesar os reagentes necessários ao branqueamento num gobelé (acertar com uma pipeta de *Pasteur*), deixando o H₂O₂ (caso seja utilizado) para último. Registrar os valores exactos.
- Misturar os reagentes e adiciona-los à pasta, tendo o cuidado de lavar os gobelés com uma parte da água necessária. Fechar o saco, retirando o máximo de ar possível. Depois de fechado, misturar bem a pasta com as mãos. Colocar este saco dentro de outro e com a ajuda de um disco (peso) submergir a mistura no banho. Começar a cronometrar e registar a temperatura do banho. (Todo este passo deve ser realizado o rápido quanto possível.)
- Passado o tempo definido para branqueamento, retirar o saco do banho e meter num banho de gelo. Registrar o tempo do banho em água quente.

- Depois de “repousar” no gelo aproximadamente 15 minutos, abrir o saco e filtrar bem a pasta com uma rede metálica. Recolher o filtrado, identificando-o bem, para análise.
- Lavar a pasta com 3 litros de água destilada a aproximadamente 35°C. Estes 3 litros devem ser divididos em 3 partes iguais de forma a se realizar 3 lavagens.
- Recolher a pasta e guardá-la no frigorífico correctamente identificada. (Poderá ser necessário antes de guardar a pasta retirar uma pequena quantidade para determinar o teor de secura da pasta.).

III 7 – Determinação da concentração de Peróxido de Hidrogénio concentrado

Reagentes:

- H₂SO₄, 2 M (4 N)
- KI, 1 M
- Solução de Molibdato de Amónio (5%)
- Na₂S₂O₃, 0,1 M (0,1 N) ou 0,05 M
- H₂O₂ (≅20 g/L)

Material:

- Titrino
- Eléctrodo de Platina
- Balão Volumétrico de 25, 1000 e 2000 mL
- Copo de 150 mL
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Frascos com Kipp de 15 e 20 mL
- Pipeta de Pasteur
- Magnetes
- Pêra

Procedimento experimental:

Preparação da solução de H₂SO₄ 2M (4 N)

- Diluir 222 mL de ácido concentrado (pureza: 96%, densidade: 1,84 kg/L, massa molecular: 98,08 g/mol) num balão volumétrico de 2000 mL em água destilada gelada. **ATENÇÃO:** MISTURA ALTAMENTE EXOTÉRMICA! Colocar primeiro ~1000 mL de água gelada, adicionar o ácido com cuidado, com o balão envolvido em gelo e colocado num recipiente para o efeito; depois de atingir a temperatura ambiente, perfazer o volume de 2000 mL;
- Transferir a solução para um frasco com *Kipp* de 20 mL.

Preparação da solução de KI 1N:

- Pesar 166,33 g para um copo;
- Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada.

Preparação de Molibdato de Amónio a 5%:

- Pesar 1,525 g para um copo;
- Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 25 mL e perfazer com água destilada. ATENÇÃO: a solução tem apenas validade de uma semana!

Preparação da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1M (0,1 N):

- Introduzir o conteúdo de uma ampola de Tiosulfato de Sódio 0,1 N num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada;
- Transferir a solução para um frasco compatível com a unidade intermutável do TITRINO.

Preparação do Cozimento de Amido (indicador):

- Pesar entre 0,2 a 0,3 g de amido solúvel e triturar com alguns mililitros de água fria;
- Verter esta pasta em 100 mL de água a ferver, deixando-se ferver durante 2 minutos;
- Filtrar ou deixar repousar usando-se apenas a camada de líquido límpida. Guardar no frigorífico!

Determinação da Concentração inicial:

1. Colocar no TITRINO a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M);
2. Pipetar 25 mL da solução de Peróxido de Hidrogénio (~20 g/L) para um balão volumétrico de 500 mL e perfazer o volume com água destilada (solução diluída de H_2O_2);
3. Introduzir num copo de 150 mL, 40 mL de ácido sulfúrico, 3 gotas de molibdato de amónio e um magnete;
4. Adicionar 10 mL da solução diluída de peróxido de hidrogénio preparada no ponto 2 e 15 mL de iodeto de potássio;
5. Colocar o copo no TRITINO (a utilizar em modo DOS), mergulhando a ponta doseadora;
6. Após ligar a agitação, iniciar a titulação do premindo DOS (antentar no controlo do caudal de titulante);
7. Quando a solução apresentar uma cor amarelo pálido, introduzir com a pipeta de Pasteur (cheia) a solução de amido: ocorre a mudança de cor amarelo-azul escuro;
8. Continuar o doseamento até ocorrer a mudança de cor azul/violeta-incolor: ponto de equivalência atingido;
9. Registrar o volume gasto de titulante;
10. Lavar a ponta doseadora com água destilada.
11. Fazer duplicado e obter o valor médio.

Cálculos:

A concentração inicial de peróxido de hidrogénio é dada por:

$$[H_2O_2] = \frac{1}{2} \times \frac{[Na_2S_2O_3] \times V_{Na_2S_2O_3}}{V_{toma}} \times \text{factor de diluição} \times 34 \left(\frac{g}{L} \right) \quad \text{Equação XI}$$

em que $[Na_2S_2O_3] = 0,05 \text{ mol/L}$ e $V_{Na_2S_2O_3}$ é o volume gasto de titulante, em mL; o factor de diluição é $(500/25=20)$; $V_{toma}=10 \text{ mL}$; a massa molar $M(H_2O_2) = 34 \text{ g/mol}$ permite expressar a concentração em g/L; o factor $\frac{1}{2}$ respeita a estequiometria da reacção de titulação: $n(H_2O_2):n(Na_2S_2O_3) = 1:2$.

III 8 – Preparação de solução de NaOH e sua padronização**Reagentes:**

- ◆ NaOH pó/pellets;
- ◆ Cloreto de bário a 20% (w/w);
- ◆ Ácido clorídrico (0.01M).

Material:

- ◆ Titrino;
- ◆ Medidor de pH;
- ◆ Balão de diluição 1 L;
- ◆ Balão de diluição 500 mL;
- ◆ Funil;
- ◆ Copos altos de 50 mL;
- ◆ Pipeta de 25 mL;
- ◆ Pipeta de 10 mL

Preparação do cloreto de bário a 20% (w/w):

Numa balança, colocar um copo de 2 litros e pesar 244,27 g de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ e adicionar água destilada até obter 1000g de solução.

Preparação do ácido clorídrico 0,01M padrão:

Adicionar o conteúdo de uma ampola de HCl 0,5 M num balão de diluição de 1 litro e perfazer com água destilada. Diluir posteriormente esta solução 50 vezes (pipetar 20 mL da solução 0,5 M e perfazer com água num balão de diluição de 1 L). Transferir a solução para um frasco compatível com a unidade intermutável do TITRINO.

Procedimento Experimental:

- Pesar aproximadamente 15 g de NaOH;
- Colocar num balão de diluição (1 L), adicionar água destilada e homogeneizar a solução; deixar arrefecer; perfazer o volume do balão com água destilada. Esta será a solução de NaOH a utilizar nos ensaios e da qual se pretende agora saber a verdadeira concentração.
- Diluir a solução anterior, retirando 20 mL da solução de NaOH para um balão de diluição (500 mL) e adicionar água destilada até perfazer o volume do balão;
- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,01 M);

- Introduzir o eléctrodo de pH no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;
- No TITRINO, usando o teclado, premir User method (3) → Recall method → Enter;
- Escolher o método pretendido, premindo repetidamente Select até se visualizar no ecrã “NaOH PGL” → Enter;
- Colocar num copo 25 mL da solução de NaOH diluído e adicionar 10 mL de cloreto de bário, para precipitar os carbonatos existentes na solução;
- Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eléctrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eléctrodo sem tocar no magnete;
- Ligar a agitação e premir START para dar início à titulação;
- Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
- Registar o valor do ponto de equivalência obtido (volume de titulante gasto em mL e o pH), presente no visor do TRITINO;
- Lavar os eléctrodos com água destilada e limpá-los;
- Efectuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0,5ml de volume de titulante).

Cálculos:

Cálculo da concentração de NaOH na solução original:

$$[NaOH] = \frac{V_{HCl} \times [HCl]}{V_{toma}} \times \text{factor de diluição} \times 40 \quad \left(\frac{g}{L} \right) \quad \text{Equação XII}$$

em que $[HCl]=0,01$ mol/L e V_{HCl} é o volume gasto de titulante, em mL; o factor de diluição é $(500/20=25)$; $V_{toma}=25$ mL; a massa molar M (NaOH) = 40 g/mol permite expressar a concentração em g/L.

III 9 – Determinação da concentração de peróxido residual

Objectivo:

Os valores das concentrações de peróxido de hidrogénio nos ensaios em branco e com pasta permitem o cálculo do consumo deste composto no respectivo estágio de branqueamento, daí a importância da sua determinação experimental. Esta é feita por iodometria, em que se utiliza molibdato de amónio que actua como catalisador, acelerando a reacção de formação de iodo livre.

Reagentes:

- H_2SO_4 , 2 M (4 N)
- KI, 1 M
- Solução de Molibdato de Amónio (5%)
- $Na_2S_2O_3$, 0,1 M (0,1 N) ou 0,05 M
- Cozimento de amido

Material:

- Titrino
- Balão Volumétrico de 25, 1000 e 2000 mL
- Copo de 150 mL
- Frascos com Kipp de 15 e 20 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Pipeta de Pasteur
- Proveta de 100 mL
- Magnetes
- Pompette
- Placa de aquecimento
- Triturador

Procedimento experimental:

Preparação da solução de H₂SO₄ 2M (4 N)

- Diluir 222 mL de ácido concentrado (pureza: 96%, densidade: 1,84 kg/L, massa molecular: 98,08 g/mol) num balão volumétrico de 2000 mL em água destilada gelada. **ATENÇÃO:** MISTURA ALTAMENTE EXOTÉRMICA! Colocar primeiro ~1000 mL de água gelada, adicionar o ácido com cuidado, com o balão envolvido em gelo e colocado num recipiente para o efeito; depois de atingir a temperatura ambiente, perfazer o volume de 2000 mL;
- Transferir a solução para um frasco com Kipp de 20 mL.

Preparação da solução de KI 1N:

- Pesar 166,33 g para um copo;
- Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada.

Preparação de Molibdato de Amónio a 5%:

Pesar 1,525 g para um copo;

Dissolver com um pouco de água destilada, introduzir num balão volumétrico de 25 mL e perfazer com água destilada. **ATENÇÃO:** a solução tem apenas validade de uma semana!

Preparação da solução de Na₂S₂O₃ 0,1M (0,1 N):

- Introduzir o conteúdo de uma ampola de Tiosulfato de Sódio 0,1 N num balão volumétrico de 1000 mL e perfazer com água destilada;
- Transferir a solução para um frasco compatível com a unidade intermutável do TITRINO.

Preparação do Cozimento de Amido (indicador):

- Pesar entre 0,2 a 0,3 g de amido solúvel e triturar com alguns mililitros de água fria;
- Verter esta pasta em 100 mL de água a ferver, deixando-se ferver durante 2 minutos;

- Filtrar ou deixar repousar usando-se apenas a camada de líquido límpida. Guardar no frigorífico!

Determinação da Concentração residual:

1. Colocar no TITRINO a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M ou 0,05 M);
2. Introduzir num copo de 100 mL, 40 mL de ácido sulfúrico, 3 gotas de molibdato de amónio e um magnete;
3. Adicionar 10 mL do efluente do estágio de peróxido de hidrogénio e 15 mL de iodeto de potássio;
4. Colocar o copo no TRITINO (a utilizar em modo DOS), mergulhando a ponta doseadora;
5. Após ligar a agitação, iniciar a titulação do premindo DOS (antentar no controlo do caudal de titulante);
6. Quando a solução apresentar uma cor amarelo pálido, introduzir com a pipeta de Pasteur (cheia) a solução de amido: ocorre a mudança de cor amarelo-azul escuro;
7. Continuar o doseamento até ocorrer a mudança de cor azul/violeta-incolor: ponto de equivalência atingido;
8. Registar o volume gasto de titulante;
9. Lavar a ponta doseadora com água destilada.

Cálculos:

A concentração de peróxido de hidrogénio na amostra de efluente é dada por:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \frac{1}{2} \times \frac{[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}}{V_{\text{toma}}} \times 34 \quad \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \quad \text{Equação IX}$$

em que $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] = 0,05 \text{ mol/L}$ e $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ é o volume gasto de titulante, em mL; $V_{\text{toma}} = 10 \text{ mL}$; a massa molar $M(\text{H}_2\text{O}_2) = 34 \text{ g/mol}$ permite expressar a concentração em g/L; o factor $\frac{1}{2}$ respeita a estequiometria da reacção de titulação: $n(\text{H}_2\text{O}_2):n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1:2$.

III 10 – NaOH Residual nos filtrados dos estágios de oxigénio ou de peróxido de hidrogénio

Para a determinação da quantidade de OH^- residual é necessário efectuar-se uma titulação ácido/base ao licor (filtrado) resultante da deslenhificação da pasta com oxigénio ou peróxido de hidrogénio.

Reagentes

- ◆ Cloreto de bário a 20% (w/w);
- ◆ Ácido clorídrico (0.01 M)

Material

- ◆ Titrino;
- ◆ Medidor de pH;
- ◆ Proveta de 100 mL e tampa;
- ◆ Frascos ~100 mL;
- ◆ Funil;
- ◆ Papel de filtro;
- ◆ Pipeta de 25 mL;
- ◆ Copos altos de 50 mL.

Preparação do cloreto de bário a 20% (w/w)

Numa balança, colocar um copo de 2 litros e pesar 244,27 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e adicionar água destilada até obter 1000 g de solução.

Preparação do ácido clorídrico 0,01M padrão

Adicionar o conteúdo de uma ampola de HCl 0,5 M num balão de diluição de 1 litro e perfazer com água destilada. Diluir posteriormente esta solução 50 vezes (pipetar 20 mL da solução 0,5 M e perfazer com água num balão de diluição de 1L). Transferir a solução para um frasco compatível com a unidade intermutável do TITRINO.

Procedimento Experimental:

- Colocar, numa proveta, 75 mL de filtrado e 25 mL de cloreto de bário, agitar e deixar repousar tapado, para precipitar os carbonatos os fenolatos e outros compostos orgânicos provenientes da reacção dos componentes da pasta com o Peróxido de Hidrogénio e o NaOH;

NOTA: Caso não haja residual suficiente proceder de acordo com a tabela seguinte:

<i>Volume de filtrado, V_f</i> (mL)	<i>Volume de cloreto de bário, V_{BaCl_2}</i> (mL)	<i>Volume total, V_t</i> (mL)
30	10	40
40	13	53
50	17	67
75	25	100

- Filtrar para um frasco com a ajuda de um funil e papel de filtro e tapar o frasco;
- Medir 25 mL de amostra para um copo + magnete;
- Colocar no TITRINO a solução de HCl (0,01 M);
- Introduzir o eléctrodo de pH no suporte do TITRINO, ligá-lo ao aparelho de análise e colocá-los em água destilada;
- No TITRINO, usando o teclado, premir *User method (3)* → *Recall method* → Enter;
- Escolher o método pretendido, premindo repetidamente *Select* até se visualizar no ecrã “NaOH PGL” → Enter;
- Medir 25 mL da amostra filtrada para um copo de 50 mL com magnete;

- Colocar o copo no TRITINO, introduzindo o eléctrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eléctrodo sem tocar no magnete;
- Ligar a agitação e premir START para dar início à titulação;
- Quando a curva de titulação estabilizar (aparece EP1) e o TITRINO automaticamente terminará a titulação;
- Premir Select até aparecer Fix EP's → premir Enter; registar o valor do volume gasto de titulante até um pH = 8,6 (o método seleccionado faz automaticamente esta avaliação);
- Efectuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5 mL de volume de titulante).

Cálculos:

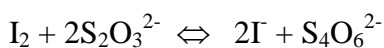
Cálculo da concentração de OH⁻ no licor residual.

$$[NaOH]_R (mol/L) = \frac{V \times [HCl]}{25} \times \frac{V_t}{V_f} \quad \text{Equação XIV}$$

A concentração em g/L obtém-se por multiplicação do resultado anterior pela massa molar do NaOH = 40 g/mol.

III 11 – Determinação da concentração do dióxido de cloro concentrado e residual

A determinação da concentração de ClO₂ é efectuada por iodometria, sendo o iodo libertado titulado com tiosulfato de sódio:



As soluções de dióxido de cloro podem também conter cloro, clorito e clorato. Por isso, fazem-se variar as condições de reacção para que todas as formas de cloro possam reagir com o iodeto de potássio.

Reagentes:

- Manter o frasco de ClO₂ em gelo.
- Solução de iodeto de potássio KI, a 10% (volume)
- Solução tampão de borato (pH=8,3)
- Solução de tiosulfato de sódio, 0,1M (padronizada) ou 0,05 M
- Solução de ácido clorídrico, 2 mol/L
- Indicador de cozimento de amido

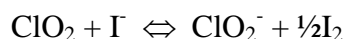
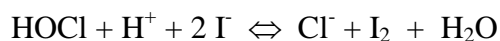
- Cloreto de titânio a 1,5% (diluir 10x a solução comercial de 15%, da Merck B406407 946, 500 mL)

Material:

- Bureta normal ou automática
- Medidor de pH
- Pipeta de 5,0 mL
- Copos de 250 mL
- Agitador magnético/magnetes
- Pipetas Pasteur
- Provetas de 25 e 50 mL
- Pompe

Procedimento experimental:

- Medir 25 mL de iodeto de potássio a 10% e cerca de 50 mL de água destilada e introduzir os dois volumes num copo de 250 mL. Juntar à solução anterior uma quantidade de tampão de borato (pH 8,3) que se verifique apropriada para a reacção ocorrer em meio neutro ou ligeiramente alcalino (~3x pipetas Pasteur). Adicionar 5,0 mL (no caso do residual, adicionar 25 mL) de solução de dióxido de cloro a titular (esta operação deve ser efectuada no interior de uma hotte; alternativa: pesar 5,830 g de solução de ClO₂ e converter em volume com a densidade (pesa-se, numa balança analítica de precisão 0,0001 g, um determinado volume conhecido da solução de ClO₂ (5 mL ou 10 mL, por exemplo); a densidade é calculada fazendo a razão entre a massa e o volume). Ocorrem as seguintes reacções:



- O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio adicionando-se 1 ml de cozimento de amido como indicador após a solução ficar amarelo claro. O volume de tiosulfato gasto quando a solução muda de violeta para incolor é designado por V₁. (levar a contagem de volume de titulante a zero.)
- Adiciona-se em seguida ácido clorídrico para o pH da solução ficar abaixo de 2, ocorrendo a seguinte reacção:



- A solução fica novamente violeta, e o iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio. O volume gasto nesta segunda titulação é designado por V₂. (levar a contagem de volume de titulante a zero.)

Cálculos:

No tratamento dos resultados têm que se considerar dois casos diferentes:

$$(a) \quad V_1 \leq \frac{V_2}{4} \qquad (b) \quad V_1 > \frac{V_2}{4}$$

Caso (a) – Solução de dióxido de cloro isenta de cloro. O teor em dióxido de cloro e em clorito podem ser calculados a partir das seguintes expressões:

$$C_{\text{ClO}_2} = 67,5 \cdot M \cdot \frac{V_1}{V_a} \quad (\text{g/l})$$

$$C_{\text{ClO}_2^-} = 67,5 \cdot M \cdot \frac{(V_2 - 4 \cdot V_1)}{4 \cdot V_a} \quad (\text{g/l})$$

Caso (b) – A solução de dióxido de cloro contém cloro. Neste caso não contém clorito. Teoricamente os teores de dióxido de cloro e de cloro podem ser calculados da seguinte forma:

$$C_{\text{ClO}_2} = 67,5 \cdot M \cdot \frac{V_2}{4 \cdot V_a} \quad (\text{g/l})$$

$$C_{\text{Cl}_2} = 71 \cdot M \cdot \frac{\left(V_1 - \frac{V_2}{4}\right)}{2 \cdot V_a} \quad (\text{g/l})$$

Para as expressões acima descritas foram utilizadas as seguintes notações:

M = Molaridade da solução de tiosulfato de sódio, mol/L;

V_a = Volume de amostra (titulado), mL;

V₁, V₂ = Consumo de tiosulfato de sódio em cada titulação, mL.

O valor 67,5 corresponde ao peso molecular de dióxido de cloro (g/mol).

O valor 71 refere-se a peso molecular do cloro (g/mol).

Para converter g ClO₂/L em g Cl₂ activo/L multiplica-se o primeiro por 2,63.

III 12 – Viscosidade intrínseca

Devido à elevada massa molecular e grau de cristalinidade da celulose, esta não é solúvel na maioria dos solventes. Idealmente, o processo de dissolução da celulose deveria resultar de uma completa desintegração em moléculas individuais sem alteração do comprimento da cadeia. De todos os solventes usados para esse efeito, a cupri-etilenodiamina (CED), complexo de cobre e amina, é o mais vulgar, sendo extensamente utilizado no controlo de viscosidades de pastas a nível industrial. A viscosidade traduz o grau de degradação (ou despolimerização) da celulose, sendo portanto uma característica da pasta que é imprescindível determinar. Um dos métodos mais simples de a determinar consiste em comparar o tempo de escoamento de um determinado volume de solução de pasta celulósica através de um capilar de um viscosímetro e o tempo de escoamento do solvente puro (normas SCAN-CM 15 e ISO 5351). Em geral, a viscosidade (aparente) de soluções de polímeros de elevado peso molecular varia com o gradiente de velocidade, apresentando no caso da celulose um comportamento pseudoplástico. Além disso, a viscosidade de soluções de celulose depende ainda da concentração da solução (C, em kg/dm³), aumentando com ela. Por isso, a viscosidade deve ser determinada em condições tais que a interacção entre as suas moléculas seja desprezável (quando a concentração da celulose no solvente tende para zero), atingindo-se o que se designa por número limite de viscosidade ou, mais correntemente, viscosidade intrínseca $[\eta]$, definida por:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{\text{rel}} - 1}{C} \right) \quad (\text{dm}^3/\text{kg}) \quad \text{Equação XV}$$

onde $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0$, sendo η e η_0 a viscosidade da solução e do solvente, respectivamente. Esta definição ilustra a razão pela qual normalmente se exprime a viscosidade em unidades de

(concentração)⁻¹. O resultado é convertido em viscosidade intrínseca pela fórmula de Martin a qual traduz a dependência da viscosidade de uma solução de celulose em CED (0,5 M) relativamente à concentração:

$$\eta_{\text{rel}} - 1 = [\eta]_{\text{Ce}} k' [\eta] C \quad \text{Equação XVI}$$

onde k' é uma constante empírica que toma o valor 0,30 para o sistema celulose-CED. Esta expressão é normalmente utilizada para um valor constante do produto $[\eta]C$, conforme proposto por Martin. A escolha deste valor, que segundo as normas referidas deve ser $[\eta]C = 3,0 \pm 0,4$ (correspondente a valores de η_{rel} entre 6,6 e 10,4) é baseada em considerações de exequibilidade prática do ensaio e em razões que se prendem com o facto de se estar a determinar a viscosidade intrínseca a partir de um único valor de concentração (erros inerentes à determinação da concentração e do tempo de escoamento e ao erro associado à constante k'). Assim, a precisão máxima do cálculo obtém-se quando $[\eta]C$ é o mais próximo possível de 3,0 ($3,0 \pm 0,1$), especialmente para valores de $[\eta]$ superiores a $1100 \text{ dm}^3/\text{kg}$, devendo a viscosidade ser determinada a um gradiente de $200 \pm 30 \text{ s}^{-1}$ num viscosímetro de dimensões perfeitamente definidas (volume de $1,0 \text{ cm}^3$ e raio do capilar de $0,040 \text{ cm}$). Nestas condições, o tempo de escoamento é próximo de 100 s.

A viscosidade relativa (η_{rel}) é calculada pela razão entre os tempos de escoamento da solução de ensaio e do solvente. Porém, como este último valor é muito baixo, são utilizados dois viscosímetros: um (de calibração) onde se determina o tempo de escoamento do solvente e o de uma solução de glicerol a 65% (viscosidade cerca de 10 mPa.s e densidade 1,16475 a 25°C), e outro (de leitura) onde se ensaia a solução de pasta e a de glicerol. A concentração de pasta deve ser tal que o valor do produto $[\eta]C$ se encontre na gama referida o que implica um ajustamento da concentração para compensar as variações no grau de polimerização médio das pastas celulósicas a serem testadas, sendo, nestas condições, as viscosidades aparentes das soluções próximas de 15 mPa.s.

Antes de proceder às medições no viscosímetro é necessário desintegrar a amostra de pasta, em água, e, em seguida, solubilizá-la em CED, sendo 30 minutos o tempo máximo indicado na norma SCAN-CM 15 para cada uma destas operações. A pasta não deve ter um índice *kappa* superior a 18-20 (lenhina Klason maior que cerca de 2%) pois pode não ocorrer a completa solubilização da amostra. A repetibilidade do ensaio (isto é, a diferença entre 2 determinações efectuadas na mesma amostra) é inferior a $25 \text{ dm}^3/\text{kg}$.

Reagentes e Material:

- Frascos de plástico de 50 mL com tampa perfurada e molas
- Bolas de vidro e pedaços de cobre
- magnetes
- 2 viscosímetros (um de medida e outro de calibração)
- Agitador magnético
- Agitador rotativo
- Banho termostático

- CED – Cuprietilenodiamina

Procedimento Experimental:

Calibração do viscosímetro (viscosímetro (anualmente ou sempre que se mude de viscosímetro ou de marca de CED))

- Medir o tempo de escoamento para uma solução de glicerol a 65% em água e para uma solução CED com água a 25°C (iguais volumes).

Preparação da solução de ensaio

- Se o valor da viscosidade da amostra for previamente conhecido, escolhe-se a massa de pasta (em base seca) como indicado na tabela 1.

Tabela XIII: Massa de pasta a pesar, adequada aos valores previstos para a viscosidade da pasta.

<i>Viscosidade intrínseca (dm^3/kg)</i>	<i>Concentração de pasta (mg/mL)</i>	<i>Gramas de pasta calculadas numa base seca (mg/50 mL)</i>
401-650	5	250
651-850	4	200
851-1100	3	150
1101-1400	2,4	120

Não se conhecendo a viscosidade da pasta, faz-se um ensaio com 3 mg/mL (base seca) e se a viscosidade não se encontrar na gama indicada, fazer por tentativas (ver Metodologia) até encontrar a massa de pasta seca a pesar idealmente. Em geral, para pastas cruas ou semi-branqueadas de *E. globulus*, é adequado pesar ~0,4 g de pasta húmida com ~0,3 de teor de secura, correspondente a ~0,12 g de pasta em base seca.

Procedimento:

- Pesar a massa de pasta conforme indicado acima, ou de acordo com o conhecimento já adquirido do valor aproximado da viscosidade intrínseca (precisão $\pm 0,1$ mg); pesar também uma quantidade adequada para determinação do teor de secura, caso este seja desconhecido.
- Adicionar 25 mL de água destilada, o magnete e algumas esferas de vidro e pedaços de cobre (1 colher de chá); enroscar a tampa do frasco;
- Desintegrar a pasta ~20 min num agitador magnético a ~700 rpm;
- Adicionar 25 mL solução CED, começar a contagem do tempo, colocar tampa de borracha perfurada, homogeneizar e expulsar o ar existente (se necessário adicionar mais 1 colher de bolas/cobre) fechando o tubo flexível com uma mola;
- Colocar no agitador mecânico rotativo durante 25 – 30 min;
- Colocar os frascos no banho termostático e esperar que a temperatura estabilize a $25 \pm 0,1^\circ C$ (~5 min); (no Inverno, usar primeiro água quente (40- 50°C) num copo para aquecer a solução – 30 a 60 s);

- Aspirar 1 ou 2 vezes a solução para o viscosímetro para lavar o capilar, aspirar de novo e medir o tempo de escoamento entre as duas marcas, com uma precisão de $\pm 0,2$ s. Efectuar pelo menos duas medições que sejam concordantes, $\pm 0,5$ s.
- Despejar a solução anterior para um coador, para que as bolas e o cobre não sigam para o esgoto! Guardar o resíduo da solução de CED num frasco de “resíduos de CED” para enviar posteriormente para uma empresa de tratamento de resíduos.
- Calcular o tempo de escoamento médio e a viscosidade relativa (use o valor da constante viscosimétrica que se encontra na tabela anexa). Usar as tabelas anexas para obter o valor do produto $c[\eta]$ e calcular a viscosidade da solução da amostra de pasta ensaiada.
- Efectuar novo ensaio e determinar a média, arredondando o resultado às dezenas. Corrigir a massa de pasta a pesar se o produto $c[\eta]$ estiver fora do intervalo $3\pm 0,1$ (ver introdução). Se usar a folha de cálculo Excel existente no DEQ/FCTUC, siga as instruções da folha de cálculo (só as células coloridas devem ser alteradas).

Tabela XIV: Valores de $[\eta] \times c$ correspondentes aos diferentes valores do rácio de viscosidade, $\eta_{\text{ratio}} (\eta/\eta_0)$

η_{ratio}	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
7,5	2,806	2,809	2,811	2,813	2,816	2,818	2,820	2,823	2,825	2,827
7,6	2,829	2,832	2,834	2,836	2,839	2,841	2,843	2,846	2,848	2,850
7,7	2,853	2,855	2,857	2,859	2,862	2,864	2,866	2,869	2,871	2,873
7,8	2,875	2,878	2,880	2,882	2,885	2,887	2,889	2,891	2,894	2,896
7,9	2,898	2,900	2,903	2,905	2,907	2,909	2,911	2,914	2,916	2,918
8,0	2,920	2,923	2,925	2,927	2,929	2,932	2,934	2,936	2,938	2,940
8,1	2,943	2,945	2,947	2,949	2,951	2,954	2,956	2,958	2,960	2,962
8,2	2,964	2,967	2,969	2,971	2,973	2,975	2,978	2,980	2,982	2,984
8,3	2,986	2,988	2,991	2,993	2,995	2,997	2,999	3,001	3,003	3,006
8,4	3,008	3,010	3,012	3,014	3,016	3,018	3,020	3,023	3,025	3,027
8,5	3,029	3,031	3,033	3,035	3,037	3,040	3,042	3,044	3,046	3,048
8,6	3,050	3,052	3,054	3,056	3,058	3,061	3,063	3,065	3,067	3,069
8,7	3,071	3,073	3,075	3,077	3,079	3,081	3,083	3,085	3,087	3,090
8,8	3,092	3,094	3,096	3,098	3,100	3,102	3,104	3,106	3,108	3,110
8,9	3,112	3,114	3,116	3,118	3,120	3,122	3,124	3,126	3,128	3,130
9,0	3,132	3,134	3,136	3,138	3,140	3,142	3,144	3,147	3,149	3,151
9,1	3,153	3,155	3,157	3,159	3,161	3,163	3,165	3,166	3,168	3,170
9,2	3,172	3,174	3,176	3,178	3,180	3,182	3,184	3,186	3,188	3,190
9,3	3,192	3,194	3,196	3,198	3,200	3,202	3,204	3,206	3,208	3,210

III 13 – Preparação de folhas para a medição da brancura ISO

“ISO 3688 – “Pulps – Preparation of laboratory sheets for the measurement of diffuse blue reflectance factor (ISO brightness)”

Procedimento:

- Pesar cerca de 4 gramas de pasta seca, de forma a produzir duas folhas de ensaio com gramagem de 200g/m²;
- Num copo de vidro junta-se a pasta pesada com 1L de água destilada e 2 mL de EDTA, e deixa-se desintegrar durante 30 minutos, com auxílio de um agitador;
- Com a ajuda de um medidor de pH (com leitura a 0,1 unidades), verifica-se se o pH da suspensão obtida é aproximadamente 5 (4,9 - 5). Caso não esteja, ajusta-se o pH a este intervalo por meio de adições de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L ou de solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L, agitando sempre cuidadosamente com o eléctrodo;
- Depois de acertado o pH, agitar bem a suspensão (pode agitar-se cuidadosamente com o eléctrodo) e dividir em duas porções idênticas (2 x 500 mL), contendo cada uma 2 g de pasta seca;
- Colocar um papel de filtro espesso no funil de *Büchner* (o qual deve ter um diâmetro interno de 115 a 150 mm) e molhá-lo com água;
- Colocar o funil de modo a que o fundo permaneça na posição horizontal e verter uma das suspensões de pasta;
- Deixar escorrer a água com sucção, evitando que passe uma quantidade apreciável de ar através da folha formada;
- Retirar a folha, virando o funil ao contrário e soprando no bico, recebendo a folha sobre uma folha de papel de filtro fina. Proceder da mesma forma para a segunda folha;
- Prensar as folhas (até 6 folhas), empilhadas segundo a sequência: disco metálico, dois mata-borrões secos, a folha de ensaio coberta pelos papéis de filtro, dois mata-borrões secos, disco metálico, dois mata-borrões secos, a segunda folha de ensaio coberta pelos papéis de filtro e assim sucessivamente, durante 1 minuto de maneira a que seja aplicada às folhas uma pressão de cerca de 400 kPa, tendo o cuidado de verificar que elas se encontram bem centradas debaixo do prato compressor;
- Depois da prensagem, retirar com cuidado o papel de filtro espesso e colocá-lo novamente junto à folha de modo a protegê-la;
- Secar as folhas de ensaio à temperatura ambiente dentro da “estufa” durante 2h30 a 4h, até atingir uma humidade de 5 a 15%.
- Após a secagem prensar novamente as folhas durante 30 segundos, usando desta vez só 1 mata-borrão.

IV – Autorização Imagem

Autorização do uso de imagem

[Voltar a mensagens](#) |

[2 mensagens](#) | [0 não lida\(s\)](#) | [Mostrar tudo](#)

Dmitry Evtyugin Adicionar aos contactos
Para Cláudia esteves

13-02-2013

Responder ▾

Cara Cláudia,
Podes utilizar daquela figura sem problemas.
Prof. Dmitry

Cláudia esteves
Para dmitry@dq.ua.pt, mgc@eq.uc.pt

12-02-2013

Responder ▾

Boa noite,

sou aluna do departamento de engenharia química da Universidade de Coimbra e realizei recentemente a minha tese de mestrado na área do branqueamento de pastas *kraft* de eucalipto onde gostaria de incluir uma imagem que o professor Dmitry apresenta no artigo "Characterization of an acetylated heteroxylan from *Eucalyptus globulus* Labill". Venho por isso, por este meio, pedir a autorização para usar a imagem da estrutura da xilana presente no *E. globulus* apresentada pelo professor no artigo a cima mencionado.

Saudações Académicas
Cláudia Esteves