



Carolina Tavares Pinheiro

Aplicação de xilanases em pastas *kraft* não branqueadas de eucalipto

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

Setembro 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Carolina Tavares Pinheiro

Aplicação de xilanases em pastas *kraft* não branqueadas de eucalipto

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

Supervisor:

Prof^a. Doutora M. Graça V. S. Carvalho

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 Fatores de Competitividade (COMPETE): Projeto PTDC / EQU-EQU / 113547/2009.

Coimbra
2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*'If you'll not settle for anything less than your best,
you will be amazed at what you can accomplish in your lives.'*

- Vince Lombardi

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Prof. Doutora Maria da Graça Carvalho, por me ter introduzido à área da pasta e do papel e a este tema que adorei desenvolver. Obrigada por todo o apoio, disponibilidade, amizade, incentivo, orientação e conhecimentos transmitidos, não só ao longo destes últimos meses como ao longo do curso.

À Mestre Eva Domingues e especialmente à Mestre Ana Moura por toda a ajuda no laboratório e pelo bom ambiente de trabalho.

Ao grupo Portucel Soporcel e ao grupo Altri - Celtejo pelo fornecimento das pastas cruas e deslenhificada com oxigénio.

À Novozymes® pela disponibilização das xilanases e ao Doutor Pedro Loureiro por toda a disponibilidade demonstrada.

Ao RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e Papel) pelo fornecimento de dióxido de cloro e pela disponibilização dos equipamentos para determinação da brancura e sua reversão.

À FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) e EU – FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) através do programa operacional fatores de competitividade (COMPETE) no âmbito do Projeto PTDC / EQU-EQU / 113547 / 2009 pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e ao meu irmão, sem eles não seria possível concretizar esta jornada. Um muito obrigada pelo apoio incondicional, por partilharem as minhas conquistas com orgulho, por me ajudarem a ultrapassar os momentos menos bons e por terem muita paciência comigo.

Aos meus amigos, que de uma forma ou outra me ajudaram neste percurso e tornaram estes últimos cinco anos memoráveis. Obrigada Tânia Marques e Cátia Gaspar pela vossa amizade, por serem um grande apoio e partilharem comigo muitas peripécias ao longo do curso. Um agradecimento especial à Tânia Martins, pela grande amizade e tolerância às minhas constantes ausências nos últimos tempos, por estar sempre presente e pelo apoio incondicional.

Obrigada a todos!

RESUMO

A indústria da pasta e do papel é um importante segmento da economia portuguesa que tem de acompanhar de perto os desenvolvimentos tecnológicos de forma a responder à crescente procura, manter os padrões de qualidade, diminuir custos e ser capaz de lidar com a constante pressão para reduzir as emissões ambientais. A biotecnologia tem emergido com grande potencial na definição de estratégias diferentes de branqueamento através da utilização de xilanases, nomeadamente para reduzir a emissão de compostos organoclorados nos efluentes.

O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do desempenho de duas xilanases (suspensões líquidas X1 e X2) em pastas *kraft* não branqueadas de *Eucalyptus globulus* e consequente poupança de reagentes, ganho de brancura e sua estabilidade. Foram usadas quatro pastas cruas e uma pré-deslenhificada com oxigénio recolhidas em diferentes unidades industriais nacionais, (pastas 1 a 5), com diferentes características, de forma a avaliar também a influência da variabilidade das pastas no desempenho enzimático.

O branqueamento das pastas fabris recolhidas com a sequência DE revelou que as diferenças específicas do processo *kraft* em cada unidade industrial conferem às pastas diferentes branqueabilidades. As pastas cruas com IK~15 foram aquelas que apresentaram maior ganho de brancura face à carga de dióxido de cloro usada.

Considerando que o tratamento enzimático (X) poderia ser aplicado à escala industrial nas torres de armazenamento de pasta que antecede a linha de branqueamento, as xilanases foram usadas numa gama alargada de condições operatórias de pH (7 a 9), temperatura (65 a 85°C), com tempo de retenção fixo em 30 min e uma carga enzimática fixa (200 mL/tAD para X1 e 900 mL/tAD para X2). Para todas as condições foi efectuado um ensaio de controlo (sem adição de enzima). Em alguns ensaios, acompanhou-se a evolução da absorvância do filtrado a um comprimento de onda de 280 e 457 nm, dando indicações da remoção de lenhina residual e de cromóforos que foram dissolvidos, e determinou-se o índice kappa, a brancura e a reversão de brancura das pastas tratadas. Concluiu-se que a xilanase X1 apresenta maior atividade em condições mais suaves, 70°C e pH 7, levando a um aumento da brancura ISO da pasta até 1,9 % ISO, verificando-se também uma ligeira redução do índice kappa.

Para avaliar o efeito do estágio X na poupança de dióxido de cloro (D) em estágios subsequentes e na brancura e sua estabilidade, as pastas foram branqueadas com uma sequência XDE e comparadas com as pastas sem tratamento enzimático (pastas DE). Verificou-se que a xilanase X1 impulsiona o desenvolvimento de brancura (designado *bleach boosting*), obtendo-se ganhos de brancura de ~3 a 4 % ISO nas condições mais suaves (pH 7, 70°C), para todas as pastas

cruas (1 a 4), o que demonstra que o efeito da xilanase é independente da origem da pasta. Apesar do tratamento enzimático a 70°C e pH 7 para a pasta 1, provocar uma perda rendimento em pasta cerca de 0,5%, permite uma poupança de ClO₂ que ronda os 36%. A xilanase X2 apresentou maior robustez a temperaturas elevadas e maior tolerância a pH alcalino, indicando atividade a 85°C e pH 9, enquanto a xilanase X1 tornou-se inativa a temperaturas superiores a 80°C e pH 8,5. Estes resultados permitem sublinhar a importância da seleção da xilanase mais adequada às condições fabris.

O tratamento enzimático com as xilanasas X1 e X2 causa ainda a redução do índice kappa (~1 unidade) das pastas XDE, a diminuição da reversão da brancura (de 1,6 para 1,1 como *PC number*) e alterações pouco significativas na viscosidade, independentemente da pasta utilizada, sendo este efeito tanto maior quanto maior for a atividade enzimática. A redução do índice kappa deveu-se a uma diminuição do teor de ácidos hexenurónicos e de lenhina residual, como resultado da quebra de ligações na cadeia de xilana e consequente dissolução de fragmentos que os contêm.

ABSTRACT

The pulp and paper industry is an important segment of the economy that has to closely follow technological developments in order to meet growing demand, maintain quality standards, reduce costs and be able to deal with constant pressure to reduce environmental emissions. Biotechnology has emerged with great potential in defining different bleaching strategies by using xylanases to reduce the emission of organochlorine compounds in the effluents.

The aim of this study was to evaluate the performance of two xylanases (X1 and X2 liquid suspensions) applied in unbleached kraft pulps of *Eucalyptus globulus* and resulting reagent savings, brightness gain and its stability. Four unbleached pulps and a pulp pre-delignified with oxygen collected in different national industrial units (pulps 1 to 5) were used, with different characteristics, in order to also evaluate the influence of pulp variability on enzyme performance.

The bleaching of the different unbleached pulps with the DE sequence revealed that the specific differences of the kraft process in each industrial unit lead to different pulp bleachability. The unbleached pulps with kappa number around 15 exhibited more brightness gain regarding the charge of chlorine dioxide used.

Considering that the enzymatic treatment (X) could be applied on an industrial scale in the unbleached pulp storage tanks, xylanases were used over a wide range of operating conditions of pH (7 to 9) and temperature (65 to 85°C), with a fixed retention time of 30 min and a fixed enzyme charge (200 mL/tAD for X1 and 900 mL/tAD for X2). For all conditions a control trial was made (no enzyme addition). In some trials, the evolution of the absorbance of the filtrate at a wavelength of 280 and 457 nm was followed, giving an indication of the removal of residual lignin and chromophores that were dissolved, and determined the kappa number, brightness and reversion of the treated pulp. It was concluded that the xylanase X1 has a higher activity in milder conditions, 70°C and pH 7, leading to an increase of pulp ISO brightness up to 1.9%, simultaneous with a slight reduction in the kappa number.

To evaluate the effect of the X stage on chlorine dioxide (D) savings in subsequent stages and on brightness and its stability, the pulps were bleached with a XDE sequence and compared with pulps without enzymatic treatment (DE pulps). It was found that the xylanase X1 boosts the development of brightness (designated bleach boosting) leading to brightness gains of ~ 3 to 4% ISO in milder conditions (pH 7, 70°C), for all unbleached pulps (1 to 4), demonstrating that the xylanase effect is independent of pulp origin. Although the enzymatic treatment for pulp 1, at 70°C and pH 7, causes a yield loss of about 0.5%, it allows ClO₂ savings of around 36%. Xylanase X2 showed higher heat-resistance and higher tolerance to alkaline pH, indicating activity at 85°C and

pH 9, while xylanase X1 became inactive at temperatures above 80°C and pH 8.5. These results highlight the importance of selecting the most appropriate xylanase to use at mill conditions.

The enzymatic treatment with xylanases X1 and X2 also causes kappa number reductions (~1 unit) of XDE pulps, brightness reversion reduction (1.6 to 1.1 as PC number) and negligible changes in viscosity regardless the pulp used, being this effect greater as the enzymatic activity increases. The reduction in kappa number was due to a decrease in hexenuronic acid content and residual lignin as a result of bonds cleavage within the xylan backbone and subsequent dissolution of fragments that contain them.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Organização da Dissertação.....	4
2.	A QUÍMICA DA MADEIRA.....	5
2.1.	Celulose.....	6
2.2.	Hemiceluloses.....	7
2.3.	Lenhina.....	9
3.	O PROCESSO DE COZIMENTO KRAFT.....	11
3.1.	Reações Indesejáveis dos Polissacarídeos	13
3.1.1.	Formação de Ácidos Hexenurónicos	14
3.1.2.	Readsorção de Hemiceluloses na Superfície das Fibras.....	15
3.2.	Lenhina Residual e Complexos Lenhina-Carbohidratos (LCCs).....	15
3.3.	Formação de Cromóforos	17
4.	BRANQUEAMENTO DE PASTAS KRAFT	19
4.1.	Tratamento Enzimático.....	20
4.2.	Dióxido de Cloro	28
4.3.	Extração Alcalina	32
4.4.	Estabilidade Da Brancura.....	33
5.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
5.1.	Branqueamentos.....	35
5.1.1.	Tratamentos Enzimáticos Preliminares	36
5.1.2.	Sequência XDE Aplicada às Pastas 1 a 5	37
5.1.3.	Sequência DE Aplicada às Pastas 1 a 5	38
5.2.	Caraterização das Pastas.....	39
5.2.1.	Brancura ISO	39
5.2.2.	Reversão da Brancura.....	39
5.2.3.	Índice Kappa.....	39
5.2.4.	Viscosidade	40
5.2.5.	Ácidos Hexenurónicos	41
6.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	43
6.1.	Caracterização das Pastas Originais	43
6.2.	Pastas DE.....	44
6.3.	Tratamento Enzimático Preliminar (Estágio X)	49
6.4.	Pastas XDE.....	51
6.4.1.	Xilanase X1	52
6.4.2.	Xilanase X2	61
6.4.3.	Rendimento	66
6.5.	Poupança de Reagentes	67
7.	CONCLUSÕES.....	71

BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	85
ANEXO I. DIAGRAMA DE PROCESSO	86
ANEXO II. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	87
II.1. Preparação dos Ensaios.....	87
II.1.1. Determinação do Teor de Secura e da Quantidade de Pasta Húmida.....	87
II.1.2. Cálculo da Quantidade de Reagentes	87
II.1.3. Preparação da Solução Tampão	89
II.1.4. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Concentrado	89
II.1.5. Preparação da Solução de NaOH	92
II.1.6. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogénio Concentrado	94
II.2 Metodologia Experimental de Branqueamento	96
II.3. Filtrado	97
II.3.1. Determinação da Concentração de Dióxido de Cloro Residual.....	97
II.3.2. Determinação da Concentração de NaOH Residual.....	97
II.3.3. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogénio Residual	99
II.4. Caracterização das Pastas	101
II.4.1. Determinação do Índice Kappa (Ik)	101
II.4.2. Determinação da Viscosidade Intrínseca.....	105
II.4.3. Preparação de Folhas para Medição de Brancura ISO	108
II.4.4. Determinação de Ácidos Hexenurónicos.....	109
ANEXO III. CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	112
III.1. Tratamento Enzimático Preliminar (Estágio X)	112
III.2. Pastas DE.....	113
III.3. Pastas XDE.....	115
III.3.1. Ácidos Hexenurónicos.....	117
III.3.2. Poupança de Dióxido de Cloro	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A estrutura da celulose (adaptado de Loureiro, 2012).	6
Figura 2. Estrutura das glucomananas em folhosas (adaptado de Laine, 2005).	8
Figura 3. Estrutura das xilanas em folhosas (adaptado de Laine, 2005).	8
Figura 4. Fórmula molecular resumida da glucuronoxilanas de <i>E. globulus</i> (Evtuguin et al., 2003)	9
Figura 5. Estrutura química dos precursores da lenhina: álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (adaptado de Khan, 2011).	9
Figura 6. Principais ligações na Lenhina (adaptado de Khan, 2011).	10
Figura 7. Fases da deslenhificação e as respectivas reações dos principais componentes da madeira (adaptado de Potthast, 2006; Ek et al., 2009).	13
Figura 8. Formação de ácido hexenurónico através da perda de um grupo metanol do ácido 4-O-metilglucurónico em meio alcalino (adaptado de Loureiro, 2012).	14
Figura 9. LCCs mais comuns. a) Ligação éter-benzilo. b) Ligação éster-benzilo (adaptado de Watanabe, 2003).	17
Figura 10. Lenhina ligada quimicamente às glucomananas, às xilanas e à rede glucomanas-xilanas em pastas kraft de resinosas com diferentes índices kappa (adaptado de Ek et al., 2009).	17
Figura 11. Enzimas requeridas para a hidrólise total da xilana: 1, endo- β -1,4-xilanase; 2, β -xilosidase; 3, α -l-arabinofuranosidase; 4, α -glucuronidase; 5, feruloil esterase; 6, acetilxilana esterase; 7, glucoronoil esterase (adaptado de Yang et al., 2013).	23
Figura 12. Sequência de eventos entre a enzima e o substrato de acordo com o modelo chave-fechadura (adaptado de Tripathi, 2010).	23
Figura 13. Mecanismo de ação das xilanas que permitem o bleach boosting (adaptado de Ek et al., 2009).	25
Figura 14. Possível mecanismo da reação do dióxido de cloro com as estruturas fenólicas e não fenólicas da lenhina (adaptado de Svenson et al., 2006).	28
Figura 15. Reação inicial de oxidação das estruturas fenólicas da lenhina residual com dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).	29
Figura 16. Produtos da reação entre o dióxido de cloro e os HexA (adaptado de Carvalho, 1999).	31
Figura 17. Possíveis reações do peróxido de hidrogénio com a lenhina, em condições alcalinas (adaptado de Suess, 2010).	33
Figura 18. Metodologia experimental utilizada para a xilanase X1.	36
Figura 19. Desenvolvimento da brancura em pastas branqueadas com sequências DE, em função da carga de ClO_2	45
Figura 20. Branqueabilidade (ganho de brancura vs % ClO_2 / IK inicial) das pastas estudadas.	46
Figura 21. Evolução do IK em função da carga de ClO_2 , após uma sequência de branqueamento DE.	47
Figura 22. Evolução da viscosidade em função da carga de ClO_2 , após sequência de branqueamento DE.	48
Figura 23. Evolução do PC number em função da carga de ClO_2 , após sequência de branqueamento DE.	49

Figura 24. Efeito da temperatura e do pH na remoção de lenhina na pasta 1, avaliado a partir da medição da absorvância a 280 nm.....	49
Figura 25. Efeito da temperatura e do pH na remoção de compostos cromóforos na pasta 1, avaliado a partir da medição da absorvância a 457 nm.....	50
Figura 26. Brancura ISO das pastas 1 e 2 com sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo.	52
Figura 27. Brancura ISO das pastas 1, 2 e 3 com sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,5 % como Cl ₂ ativo.	58
Figura 28. Brancura ISO da pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio) após a sequência XDE e respetivo controlo, usando uma carga de ClO ₂ de 1,8 % como Cl ₂ ativo no estágio D.....	60
Figura 29. Brancura ISO da pasta 1 tratada com as xilanas X1 e X2 em sequências XDE e respetivos controlos, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1:200 mL/tAD; dosagem de X2: 900 mL/tAD exceto ensaio assinalado).	62
Figura 30. Brancura ISO da pasta 5 tratada com as xilanas X1 e X2 em sequências XDE e respetivos controlos, com carga de ClO ₂ de 1,8 % como Cl ₂ ativo.	64
Figura 31. Método utilizado para a determinação das poupanças de dióxido de cloro. Exemplo ilustrativo para o ensaio efetuado com a xilanase X1, na pasta 1. Condições no estágio X: 60°C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com 2,2% Cl ₂ ativo.	68
Figura I. Esquema típico da zona de lavagem de pasta após o cozimento.	86
Figura II. Espectro UV/visível obtido a partir do filtrado residual. Ensaio para a pasta 1 com tratamento enzimático com a xilanase X1. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t.....	112
Figura III. Desenvolvimento da brancura em pastas branqueadas com sequências DE, em função da carga de ClO ₂	114
Figura IV. Evolução do ganho de brancura da pasta DE em relação ao original, em função da carga de ClO ₂	114
Figura V. Evolução da diferença entre o IK da pasta original e da pasta DE, em função da carga de ClO ₂	115
Figura VI. Evolução da diferença entre a viscosidade da pasta original e da pasta DE, em função da carga de ClO ₂	115
Figura VII. Condições no estágio X: 60 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	118
Figura VIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	118
Figura IX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	119
Figura X. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	119
Figura XI. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	120
Figura XII. Condições no estágio X: 80 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	120

Figura XIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	121
Figura XIV. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	121
Figura XV. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,5% como Cl ₂ ativo.....	122
Figura XVI. Condições no estágio X: 60 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,5% como Cl ₂ ativo.....	122
Figura XVII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,5% como Cl ₂ ativo.....	123
Figura XVIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,5% como Cl ₂ ativo.....	123
Figura XIX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,5% como Cl ₂ ativo.....	124
Figura XX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 1,8% como Cl ₂ ativo.....	124
Figura XXI. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 900 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	125
Figura XXII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	125
Figura XXIII. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8,5 e dose enzimática 1530 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	126
Figura XXIV. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8,5 e dose enzimática 900 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	126
Figura XXV. Condições no estágio X: 75 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 2,2% como Cl ₂ ativo.....	127
Figura XXVI. Condições no estágio X: 85 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. Target com carga de ClO ₂ de 1,8% como Cl ₂ ativo.....	127

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição química da madeira de resinosas, folhosas e valor médio para o <i>Eucalyptus globulus</i> (em % mássica de madeira seca) (Sjöström, 1993).....	5
Tabela 2. Classificação dos principais reagentes de branqueamento e a sua reatividade em relação à lenhina e aos polissacarídeos (adaptado de Suess, 2010; Sixta et al., 2006; Bajpai, 2012).....	20
Tabela 3. Aplicação de enzimas em diversos processos na produção de pasta e papel (adaptado de Skals et al., 2008; Novozymes®, 2010).....	21
Tabela 4. Sequências de branqueamento com tratamento enzimático e respetivas vantagens (Bruce & Palfreyman, 1998; Farrell et al., 1996).....	27
Tabela 5. Condições utilizadas nos estágios X preliminares.	37
Tabela 6. Condições utilizadas nos estágios XD ₀ EP.....	38
Tabela 7. Condições utilizadas nos estágios DE.....	38
Tabela 8. Caracterização das pastas originais utilizadas.....	43
Tabela 9. Ganho de brancura e a redução correspondente do IK para as várias pastas estudadas.....	47
Tabela 10. Brancura ISO (%), IK e PC number das pastas 4 e 5 apenas com tratamento enzimático (dosagem X1: 200 mL/tAD).....	51
Tabela 11. Ganho de Brancura das pastas XDE em relação ao controlo para as pastas 1 e 2 com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	53
Tabela 12. IK das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	54
Tabela 13. Ácidos hexenurónicos após aplicação de sequências DE e XDE na pasta 1 e com a xilanase X1.....	55
Tabela 14. Viscosidade das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	56
Tabela 15. PC number das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	57
Tabela 16. Ganho de brancura das pastas XDE em relação ao controlo para as pastas 2, 3 e 4 com carga de ClO ₂ de 2,5 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	59
Tabela 17. IK das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,5 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	59
Tabela 18. Viscosidade das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,5 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	59
Tabela 19. PC number das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO ₂ de 2,5 % como Cl ₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).....	60
Tabela 20. IK e viscosidade e PC number da pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio), obtidos após branqueamento com sequência XDE, com carga de ClO ₂ de 1,8 % como Cl ₂ ativo e dosagem de X1: 200 mL/tAD.....	61
Tabela 21. Ganho de Brancura das pastas XDE em relação ao controlo para a pasta 1 com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo, usando a xilanase X2 e X1.....	63

Tabela 22. IK, viscosidade e PC number da pasta 1, obtidos após branqueamento com sequência XDE, com carga de ClO ₂ de 2,2 % como Cl ₂ ativo.	64
Tabela 23. IK e viscosidade e PC number da pasta 5, obtidos após branqueamento com sequência XDE, carga de ClO ₂ de 1,8 % como Cl ₂ ativo.	65
Tabela 24. Rendimento após aplicação de sequências X e XDE na pasta 1 com a xilanase X1.	67
Tabela 25. Poupanças de dióxido de cloro obtidas a partir de pastas tratadas com a xilanase X1 (dosagem de X1: 200 mL/tAD).	68
Tabela 26. Poupanças de dióxido de cloro obtidas a partir de pastas tratadas com a xilanase X2.	70
Tabela I. Massa de cada composto para preparar 1 L de tampão B-R.	89
Tabela II. Quantidade de cada parte (A ou B) para preparar o tampão B-R com determinado pH.	89
Tabela III. Volume de cloreto de bário a utilizar em função do volume de filtrado disponível.	98
Tabela IV. Fator d. Equação equivalente: $d = (0,89301 + 0,021456 * C)$	105
Tabela V. Massa de pasta a pesar, adequada aos valores previstos para a viscosidade da pasta.	107
Tabela VI. Produto $c[\eta]$ correspondente a diferentes rácios de viscosidade (η rácio).	108
Tabela VII. Condições e resultados obtidos a partir da medição da absorvância a 280 e 457 nm do filtrado residual para a pasta 1, xilanase X1.	112
Tabela VIII. Condições utilizadas no estágio X para as pastas 4 e 5, xilanase X1 e respetivos resultados obtidos.	113
Tabela IX. Condições utilizadas na sequência DE e respetivos resultados obtidos.	113
Tabela X. Condições utilizadas na sequência XDE e respetivos resultados obtidos.	116
Tabela XI. Resultados dos ácidos hexenurónicos.	117
Tabela XII. Condições utilizadas e resultados obtidos nos ensaios de controlo.	117

1. INTRODUÇÃO

A indústria da pasta e do papel é um importante segmento da economia em Portugal, cuja posição no mercado mundial vem sendo reforçada desde meados do século XX. Segundo os dados mais recentes, Portugal é o maior produtor europeu, e um dos maiores a nível mundial, de pasta branqueada de eucalipto BEKP - *Bleached Eucalyptus Kraft Pulp*. É, também, o maior produtor europeu de papéis finos de impressão e escrita não revestidos (UWF) e o 6º a nível mundial (Celpa, 2012).

A matéria-prima principal da indústria produtora de pastas *kraft* em Portugal é o *Eucalyptus globulus*, sendo uma espécie de crescimento rápido, com ciclos de abate curtos (7 a 12 anos) (Valente et al., 1992). Em 2012, a produção nacional de pastas de fibra virgem de Eucalipto fixou-se em 2,3 milhões de toneladas, o que representa cerca de 94% da produção nacional (Celpa, 2012). De acordo com os resultados preliminares do 6º Inventário Florestal Nacional (INF6), em 2010, o eucalipto é a espécie florestal que ocupa a maior área em Portugal continental, com 812 mil hectares, representando cerca de 21% da área florestal e 9% de Portugal Continental (ICNF, 2013).

As pastas produzidas a partir do *E. globulus*, cultivado em território nacional, são consideradas de elevada qualidade pela sua excelente aptidão papelreira (Valente et al., 1992), apresentando vantagens acrescidas no consumo específico (pasta/madeira) e sendo comercialmente competitivas com os grandes produtores mundiais, como o Brasil, que detém uma elevada capacidade de produção instalada, associada a menores custos de matéria-prima (Sêco, 2006). Assim, o fator qualidade permite marcar a diferença e garante a Portugal uma posição importante no mercado mundial da pasta e do papel. De entre os fatores diferenciadores do *E. globulus* de cultivo nacional, pode destacar-se a sua composição química, apresentando um elevado teor de celulose e baixo teor de lenhina, o que permite obter rendimentos mais elevados e menor consumo de reagentes no cozimento e no branqueamento que outras folhosas, incluindo outras espécies de eucalipto (Pinto, 2005). As características morfológicas das fibras detêm também vantagens, nomeadamente, o pequeno comprimento e a elevada espessura relativa das paredes, o que faz com que o número de fibras por unidade de massa seja elevado. Isto reflete-se no desempenho favorável das fibras na refinação, na floculação e na melhor formação de folhas com boas propriedades papelreiras, nomeadamente, a resistência mecânica e a opacidade das folhas (Kibblewhite et al., 1991; Ferreira, 2000). É a fibra de eleição para a produção de papéis de impressão e escrita.

A indústria da pasta e do papel é uma indústria de capital intensivo, que tem necessariamente de acompanhar de perto os desenvolvimentos tecnológicos de forma a responder à crescente procura, manter os padrões de qualidade e ser capaz de lidar com a constante pressão para reduzir

as emissões ambientais, devido à utilização de uma grande quantidade de produtos químicos. Um dos segmentos do processo de produção de pasta e papel que tem recebido especial atenção nesse sentido, é o branqueamento.

O processo de branqueamento sofreu um desenvolvimento significativo nos últimos dois séculos. No século XIX predominou um processo que se focava na aplicação de apenas um composto químico - o hipoclorito. A partir dos finais dos anos vinte do século XX, introduziu-se a utilização de cloro como agente de branqueamento e desenvolveram-se processos multi-estágios, seguindo-se a aplicação de um estágio de extração alcalina para remoção da lenhina oxidada, sendo a sequência CEH (onde C-Cloro, E-Extração alcalina e H-Hipoclorito), o procedimento de branqueamento padrão até meados dos anos 70. Com o aumento da capacidade de produção, os efeitos da poluição tornaram-se cada vez mais perceptíveis. As fábricas de pasta química branqueada que utilizavam cloro e/ou hipoclorito de sódio como agentes de branqueamento, foram descarregando níveis elevados destes compostos nos cursos de água. Em meados da década de 60, estudos associaram a presença de dioxinas e compostos organoclorados nos efluentes, que apresentam efeitos tóxicos, mutagénicos, persistentes e carcinogénicos, à utilização de cloro elementar (Suess, 2010; Bajpai, 2012). Desde então tem sido feito um esforço nas fábricas em todo o mundo para eliminar a utilização de cloro elementar em sequências de branqueamento ECF – *Elemental Chlorine Free* ou a eliminação total de cloro em sequências TCF – *Totally Chlorine Free*, através da utilização de oxigénio, peróxido de hidrogénio ou ozono como substituintes (Bajpai, 2012). Em termos de impacto ambiental, as sequências TCF permitem uma maior redução de compostos organoclorados nos efluentes (quantificados como AOX – *Adsorbable Organic Halogen*) (Vidal & Diez, 2003). Contudo, os reagentes usados nas sequências TCF apresentam uma menor seletividade, levando a uma maior despolimerização da celulose, o que resulta numa diminuição da resistência mecânica das pastas (Lachenal et al., 1995; Young & Akhtar, 1998). Além disso, a utilização de energia é maior (*footprint*) (NCASI, 2013). Assim, nas últimas décadas as sequências ECF tornaram-se o estado da arte do branqueamento (Suess, 2010).

Apesar de estabilizada a utilização de reagentes de branqueamento em sequências ECF ou TCF, a biotecnologia tem emergido com grande potencial na definição de estratégias diferentes de branqueamento através da utilização de enzimas, sendo o pré-tratamento com xilanases, o mais relatado na literatura (Beg et al., 2001; Dhiman et al., 2008; Garg et al., 2011; Lin et al., 2013; Bajpai, 2014; Gangwar et al., 2014). A aplicação das xilanases permite às fábricas atingir um melhor desempenho ambiental, através da diminuição dos níveis de AOX nos efluentes, reduzir os custos, reduzir as quantidades de reagentes de branqueamento e/ou aumentar a brancura final das pastas em sequências ECF e TCF, aumentar a capacidade de produção para fábricas com

capacidade de produção de ClO_2 limitada e melhorar as propriedades do papel (Nguyena et al., 2008), sem a necessidade de grandes investimentos em equipamento ou alterações no processo. Estudos indicam que o pré-tratamento com xilanases resulta, normalmente, em reduções de 20-25% na utilização de reagentes à base de cloro em *hardwoods* e 10-15% em *softwoods*, e ao mesmo tempo diminui os AOX em 12-25% (Shatalov & Pereira, 2008).

Este pré-tratamento com xilanases é correntemente referido como ‘*bleach boosting*’ pois amplifica os efeitos dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes (Bajpai, 1997). As xilanases não removem diretamente a lenhina mas, através da remoção de parte das xilanas, facilita o acesso dos reagentes de branqueamento à lenhina residual anteriormente inacessível (Roncero et al., 2005; Woolridge, 2014). As xilanas, a hemicelulose predominante em pastas *kraft* de Eucalipto (Sjöström, 1993), são relevantes no branqueamento de pasta para papel:

- Estudos sugerem que grande parte da lenhina, principal responsável pela coloração da pasta, está covalentemente ligada tanto às glucomanas como às xilanas (LCC – *Lignin Carbohydrates Complex*) em pastas *kraft* (Lawoko et al., 2004);
- Os ácidos hexenurónicos, compostos responsáveis pelo aumento do consumo de reagentes de branqueamento e reversão da brancura das pastas (Suess, 2010), encontram-se também associados às xilanas;
- O cozimento *kraft* é responsável pela precipitação de pequenas cadeias de xilanas na superfície das fibras. Estas xilanas redepositam-se nas fibras e agem como uma barreira física à penetração dos reagentes de branqueamento (Kantelinen et al., 1993), o que resulta num aumento do consumo de dióxido de cloro no primeiro estágio de branqueamento (Shobhit et al., 2005).

Assim, a hidrólise das xilanas em pastas não branqueadas, num estágio prévio ao branqueamento, através da aplicação de xilanases é vantajosa, apesar da conhecida diminuição de rendimento a que conduz (Bajpai, 2012) e a sua aplicação em pastas *kraft* de *E. globulus* é a motivação para este estudo.

Face ao exposto, os principais objetivos desta dissertação são:

- Avaliar o desempenho da aplicação de xilanases em pastas *kraft* não branqueadas de Eucalipto, posteriormente branqueadas com a sequência DE (obtendo-se pastas XDE);
- Por comparação com as pastas DE, avaliar o potencial de poupança de reagentes através da aplicação do estágio enzimático em pastas não branqueadas, em sequências XDE;
- Avaliar o efeito da variabilidade das pastas no desempenho do estágio enzimático por utilização de pastas não branqueadas recolhidas em diferentes fábricas nacionais.

1.1. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Após uma breve introdução onde se faz o enquadramento ao tema e indicam-se os principais objetivos, apresenta-se uma resenha bibliográfica dos temas relacionados com o trabalho desenvolvido. Assim, o Capítulo 2 descreve os principais componentes da madeira, do ponto de vista químico, com especial enfoque na madeira de folhosas, e em particular no eucalipto.

No Capítulo 3 descreve-se de forma breve o cozimento *kraft*, explicitando as principais reações dos reagentes de cozimento com os constituintes da madeira e a sua influência no branqueamento da pasta.

No Capítulo 4 aborda-se o processo de branqueamento de forma geral e especifica-se, com algum detalhe a aplicação de xilanases no biobranqueamento, o seu objetivo, vantagens, modo de atuação e aplicação à escala industrial. Neste capítulo descreve-se também a forma de atuação e o efeito dos reagentes de branqueamento, como o dióxido de cloro e o peróxido de hidrogénio usados neste trabalho, e por fim uma pequena referência à reversão da brancura.

O quinto capítulo é dedicado à componente experimental do trabalho, onde se descreve a metodologia experimental adotada nos branqueamentos, e de uma forma breve, os métodos de caracterização das pastas.

O capítulo 6 inicia-se com a caracterização básica das pastas recolhidas, seguindo-se a apresentação dos resultados do seu branqueamento com a sequência DE (obtendo-se pastas DE). A mesma sequência foi usada após a aplicação do estágio X (obtendo-se pastas XDE) ou após o estágio de controlo (sem enzima). Por comparação com as pastas DE, faz-se uma avaliação do ganho de brancura e respetivo potencial de poupança de reagentes pela aplicação do estágio enzimático em pastas cruas.

No capítulo 7 resumem-se as principais conclusões e formulam-se algumas sugestões de trabalhos futuros que possam complementar este estudo.

Por fim, a secção dos anexos compreende alguns resultados obtidos, cálculo das poupanças de reagentes e procedimentos experimentais detalhados.

2. A QUÍMICA DA MADEIRA

A madeira é uma estrutura biológica complexa, altamente organizada a nível molecular e celular, um compósito de diversos tipos de células que atuam em conjunto para servir as necessidades da planta (Rowell, 2012).

A composição química da madeira varia com a zona da árvore (raízes, tronco ou ramos), tipo de madeira (folhosa ou resinosa), localização geográfica, clima, condições do solo, etc. (Pettersen, 1984). A sua composição elementar é, em média, 50% de Carbono, 43% de Oxigénio, 6% de Hidrogénio e os restantes 1% de Azoto e compostos inorgânicos (Fengel & Wegener, 1989). A nível molecular, há que distinguir entre compostos de elevado peso molecular, como os polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) e a lenhina, e os compostos de baixo peso molecular, seja material orgânico (extratáveis) ou material inorgânico (cinzas) (Sjöström, 1993). As proporções de cada um destes compostos e a composição química da lenhina e das hemiceluloses diferem, dependendo da origem da madeira, enquanto a celulose é semelhante em todas as madeiras (Fengel & Wegener, 1989).

Como já referido, o *Eucalyptus globulus* é a matéria-prima de eleição para a produção de pasta e papel em Portugal. Quando comparado com outras espécies de folhosas (*hardwood*), incluindo entre o género *Eucalyptus*, a madeira de *E. globulus* é reconhecida por possuir um desempenho técnico superior durante o cozimento *kraft* e durante os processos de branqueamento (Pettersson et al., 2002; Pinto et al., 2005). Estas diferenças na resposta entre espécies são influenciadas pela morfologia, densidade e composição química da madeira, estando portanto intimamente relacionadas com as características estruturais dos biopolímeros que constituem a matéria-prima (Carvalho et al., 2003; Pinto et al., 2005). A Tabela 1 apresenta as proporções dos principais constituintes da madeira de folhosas e resinosas e também de *E. globulus*.

Tabela 1. Composição química da madeira de resinosas, folhosas e valor médio para o *Eucalyptus globulus* (em % mássica de madeira seca) (Sjöström, 1993).

	Resinosas	Folhosas	<i>E. globulus</i>
Celulose	33-42	38-51	51,3
Lenhina	27-32	21-31	21,9
Glucomanana	14-20	1-4	1,4
Glucuronoxilana	5-11	14-30	19,9
Outros Polissacarídeos	3-9	2-4	3,9
Extratáveis	2-5	1-5	1,3

De forma a compreender o comportamento da pasta no branqueamento, assim como as propriedades que apresenta, é indispensável ter um conhecimento básico da composição química

da madeira. Nas secções seguintes faz-se uma pequena referência aos principais constituintes da madeira: a celulose, as hemiceluloses e a lenhina.

2.1. CELULOSE

A celulose é o composto orgânico natural mais abundante à face da Terra. É um polissacarídeo com elevado grau de polimerização e peso molecular, composto por unidades β -D-glucopiranosose repetidas, as quais estão ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (O processo de polimerização elimina uma molécula de água entre o hidroxilo do C-1 e o hidroxilo do C-4 no açúcar adjacente, com uma única ligação de oxigénio entre as duas unidades) (Sjöström, 1993). Este tipo de ligação faz com que a unidade de repetição da celulose seja, na realidade, a celobiose (duas unidades β -D-glucopiranosose), como podemos ver representado na Figura 1.

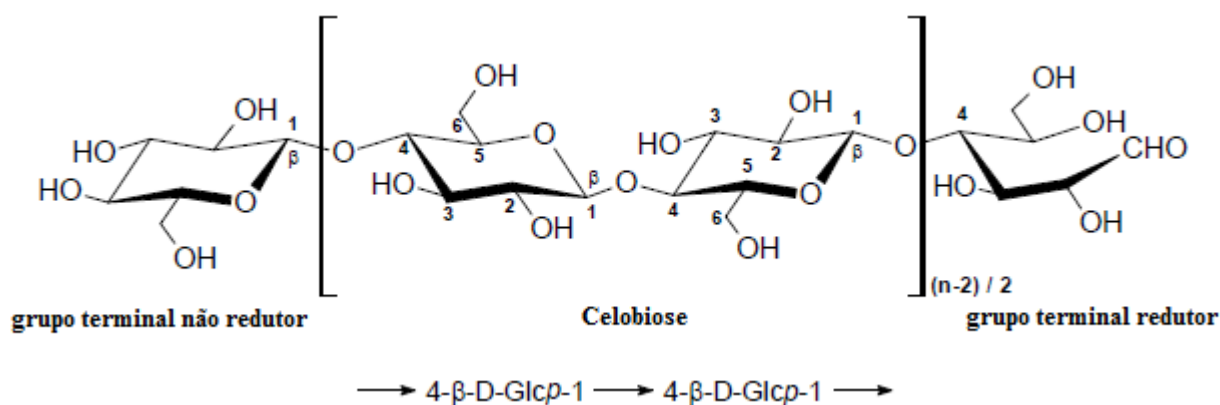


Figura 1. A estrutura da celulose (adaptado de Loureiro, 2012).

Os dois grupos residuais terminais diferem um do outro na sua reatividade química: um apresenta uma estrutura hemiacetal na posição C-1, sendo denominado por grupo terminal redutor, enquanto o outro contém um grupo hidroxilo adicional na posição C-4, designando-se por grupo terminal não redutor (Walker, 2006).

As moléculas de celulose formam um homopolímero linear que se orientam de forma aleatória e têm uma forte tendência para formar pontes de hidrogénio quer intermoleculares quer intramoleculares pelos grupos hidroxilo presentes (Sjöström, 1993). A agregação das moléculas de celulose origina microfibrilas, nas quais regiões altamente ordenadas (cristalinas) alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). Estima-se que na madeira cerca de 50-90% da celulose esteja na forma cristalina (Sjöström, 1993). As microfibrilas, por sua vez, agregam-se para formar as fibrilas, que constituem as camadas celulósicas da parede celular.

Como consequência da sua estrutura fibrosa cristalina, a celulose apresenta elevada rigidez, tem uma forte resistência à tração, baixa reatividade química e é insolúvel na maioria dos

solventes. Estas características afetam as propriedades físicas e químicas das fibras, que por sua vez afetam as propriedades da pasta e do papel (Fengel & Wegener, 1989; Rowell, 2012).

2.2. HEMICELULOSES

Originalmente acreditava-se que as hemiceluloses eram compostos intermediários na síntese biológica da celulose, de onde provém a sua denominação. Na realidade, as hemiceluloses são formadas por vias biossintéticas completamente diferentes (Sjöström, 1993).

As hemiceluloses são o segundo composto orgânico mais abundante e, tal como a celulose, são polissacarídeos cujas unidades de repetição estão ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Contudo, estas diferem da celulose por serem constituídas por diferentes unidades de repetição (monossacarídeos), apresentarem cadeias mais curtas e, em geral, ramificadas, um menor peso molecular e uma estrutura amorfa, o que as tornam mais reativas (Fengel & Wegener, 1989; Hon & Shiraishi, 1991). As hemiceluloses encontram-se situadas entre a lenhina e as fibrilas de celulose, contribuindo para o fortalecimento e flexibilidade das paredes das fibras (Kuhad & Sigh, 2007).

Na sua constituição podem estar presentes diversas combinações de monómeros: hexoses, como a D-glucose, D-manose e D-galactose; pentoses, como a D-xilose e L-arabinose; resíduos acídicos, como o ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico, e pequenas quantidades de deoxi-hexoses (L-ramnose e L-fucose) (Sjöström, 1993). As hemiceluloses apresentam diferenças estruturais significativas em termos de tipo e proporção da unidade de repetição, dependendo da espécie de madeira e, dentro da mesma espécie, com o tipo de células e com o posicionamento na parede celular (Rydholm, 1985). A denominação que lhes é atribuída é, então, função do monómero presente em maior quantidade (Rowell, 2012). Nas folhosas, as glucomanas e as xilanas constituem praticamente a totalidade (99%) das hemiceluloses presentes (Sjöström, 1993).

As glucomanas (Figura 2) são constituídas por unidades de β – D – glucopirranose e de β – D – manopirranose unidas por ligações β (1 \rightarrow 4). Possuem uma estrutura linear, com poucas ramificações e com uma razão molar entre a glucose e a manose que varia entre 1:2 e 1:1, dependendo da espécie de madeira (Sjöström, 1993; Rowell, 2012).

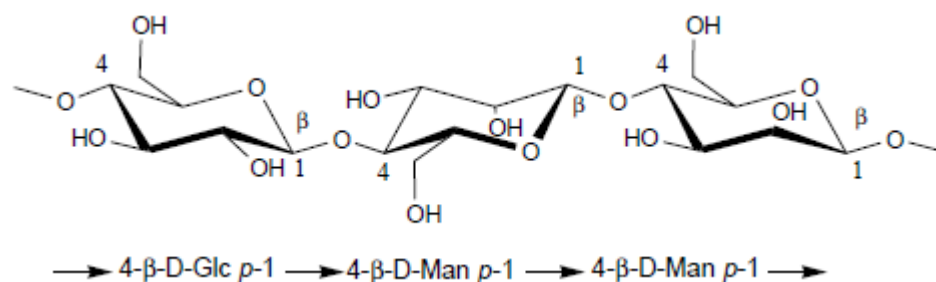


Figura 2. Estrutura das glucomananas em folhosas (adaptado de Laine, 2005).

A xilana possui uma cadeia principal constituída por unidades de β -D-xilopiranosil unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) e ramificadas com substituintes como ácidos metilglucurónicos e grupos acetilo (Figura 3). Nas folhosas a xilana contém como grupo substituinte unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurónico associados à cadeia principal da xilana por ligações α -(1 \rightarrow 2), com uma frequência média de um grupo por dez unidades de xilose. Contém, também, grupos acetilo nas posições C-2 e C-3 da xilose com uma média de sete por cada dez unidades de xilose, sendo então uma O-acetil-4-O-metilglucurono- β -D-xilana. Apesar de haver diferenças estruturais em termos de tipo e proporção de grupos substituintes, as xilanas das folhosas são designadas por glucuronoxilanas (Sjöström, 1993; Rowell, 2012).

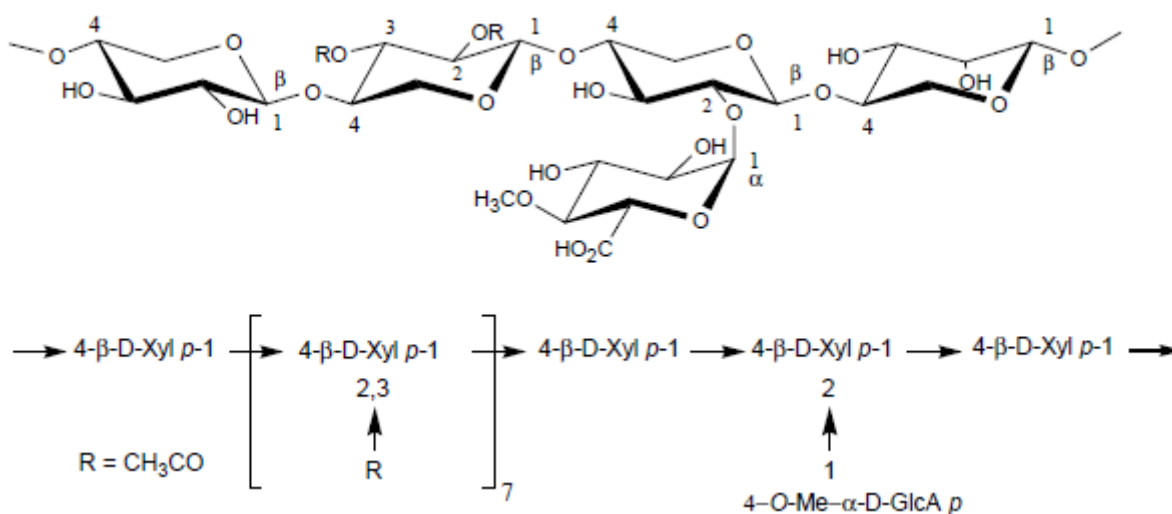


Figura 3. Estrutura das xilanas em folhosas (adaptado de Laine, 2005).

A estrutura da glucuronoxilana de *E. globulus* crescido em Portugal revelou ser peculiar (Figura 4), observando-se em 30% dos grupos de ácido glucurónico ligações adicionais de galactose e glucose, provenientes de cadeias de ramnoarabinogalactanas e glucanas, respetivamente. Apresenta, também, um grau de acetilação de 0,61. (Evtuguin et al., 2003).

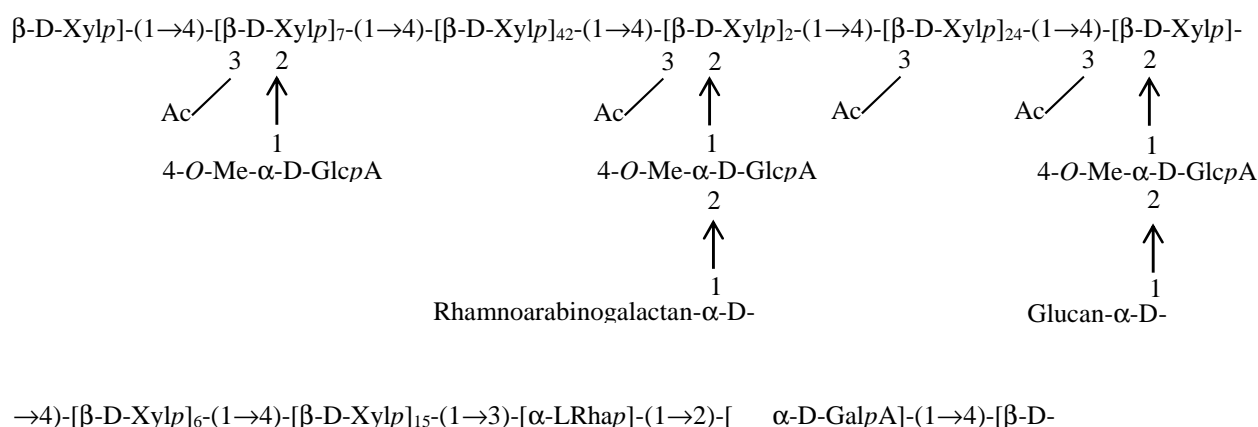


Figura 4. Fórmula molecular resumida da glucuronoxilanas de *E. globulus* (Evtuguin et al., 2003)

2.3. LENHINA

A lenhina é o terceiro composto macromolecular mais abundante na madeira. Encontra-se depositada principalmente na lamela média e na parede celular, conferindo-lhe firmeza, rigidez, e mantendo as células ligadas entre si (Sjöström & Alén, 1999). É um polímero fenólico amorfo, com uma estrutura tridimensional complexa, altamente ramificada, cujas unidades precursoras primárias são provenientes do fenilpropano. Estas unidades precursoras são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, (Figura 5) os quais originam as subunidades hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) e seringilo (S), respetivamente, conforme possuam nenhum, um ou dois grupos metoxilo (Fengel & Wegener, 1989; Boudet et al., 1995).

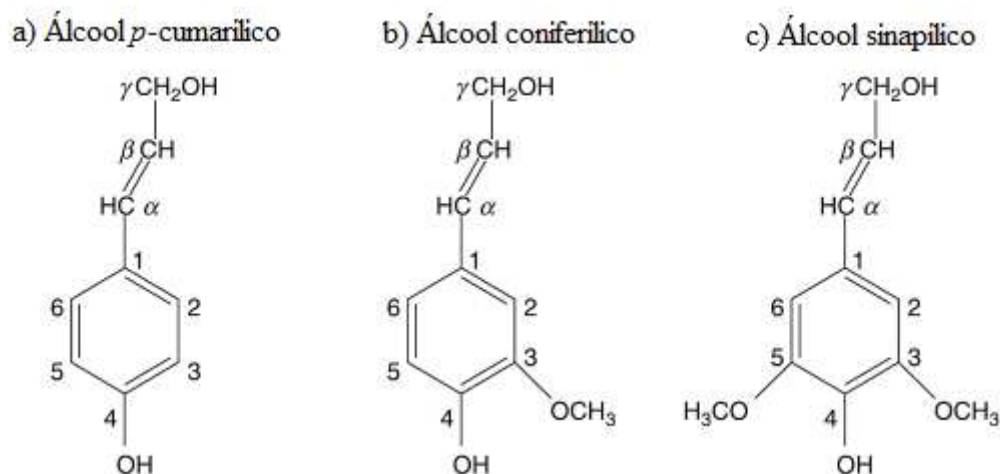


Figura 5. Estrutura química dos precursores da lenhina: álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (adaptado de Khan, 2011).

Nas resinosas predominam os grupos guaiacilo (G) e nas folhosas os grupos seringilo/guaiacilo (S/G), numa razão (S/G) de 4:1 e 1:2 em função do tipo de madeira, sendo o grupo hidroxifenilo (H) um precursor menor tanto nas resinosas como nas folhosas (Biermann,

1996; Rowell, 2012). As unidades de fenilpropano estão ligadas entre si, bem como a diversos grupos funcionais, formando uma estrutura extremamente complexa. Os principais grupos funcionais são os grupos metoxilo, hidroxilo fenólico, carbonilo, álcool benzílico e alguns aldeídos, os quais revelam ter um grande impacto no comportamento químico da lenhina (Ragauskas, 2007). As ligações entre as unidades precursoras são do tipo alquilo-arilo ou alquilo-alquilo, dando origem a ligações éter, tais como β -O-4 e α -O-4 e a ligações C-C, nomeadamente β - β , β -5, β -1, β - α ou do tipo arilo-arilo como as ligações 4-O-5 e 5-5 (Figura 6). A frequência a que estas ligações ocorrem têm grande influência na reatividade química da lenhina no processo de deslenhificação (Sjöström, 1993; Ragauskas, 2007).

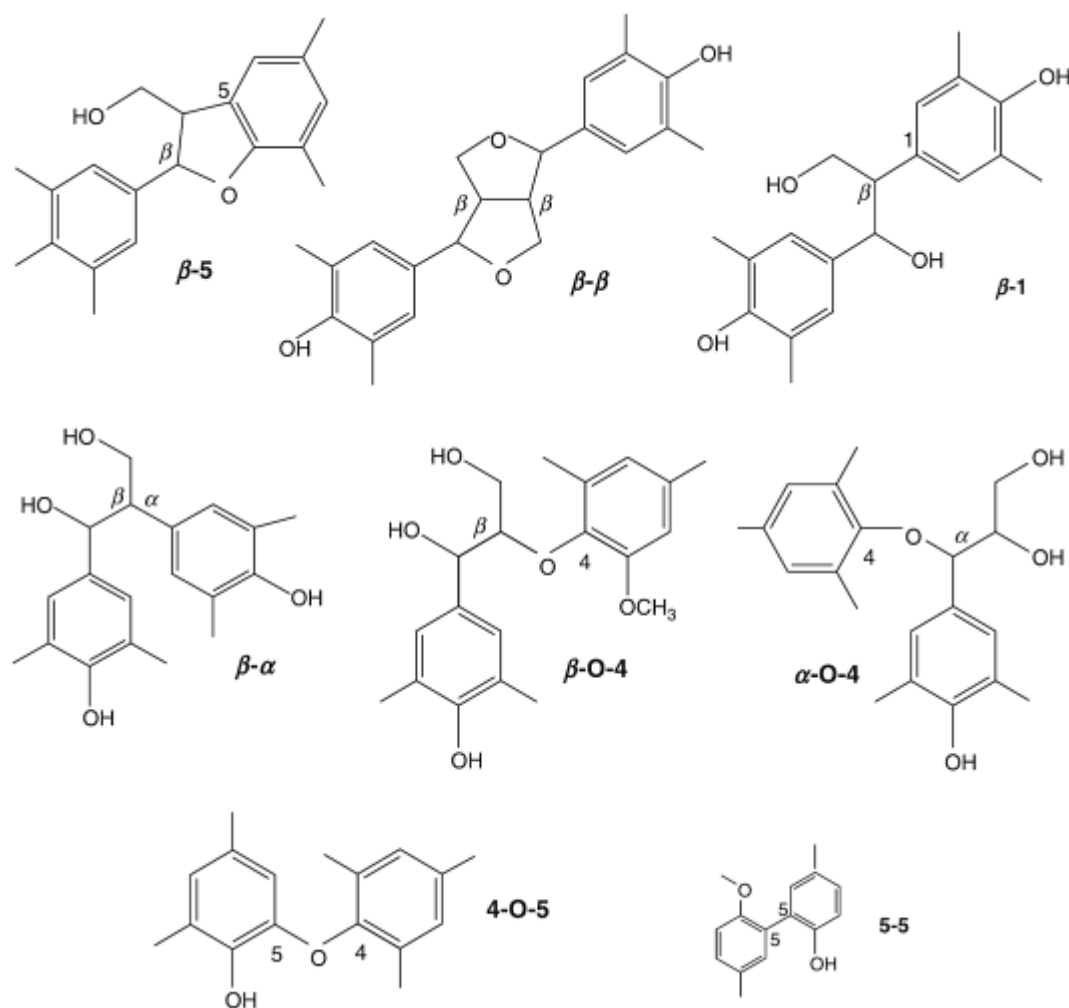


Figura 6. Principais ligações na Lenhina (adaptado de Khan, 2011).

As ligações β -O-4 e α -O-4 constituem um total de aproximadamente 65% das ligações dos grupos fenilpropano em folhosas e cerca de 51% em resinosas. Estas ligações são facilmente fragmentadas em meio alcalino, o que faz com que as folhosas sejam mais facilmente deslenhificadas que as resinosas durante o cozimento *kraft* (Bolton, 2008).

3. O PROCESSO DE COZIMENTO *KRAFT*

Os processos químicos são os mais comuns para a obtenção de pastas, de entre os quais se destaca o ‘processo ao sulfato’, vulgarmente conhecido como ‘processo *kraft*’ devido à elevada resistência físico-mecânica das pastas produzidas (*kraft* significa resistente em alemão e sueco) e é atualmente o processo mais utilizado em todo o mundo (80% do total das pastas químicas) (Biermann, 1996; Carvalho, 1999; Kirk et al., 2005; Bajpai, 2012). Neste processo de cozimento, os reagentes solubilizados em água (licor) são adicionados à madeira na forma de estilhas (ou aparas) num vaso reacional (digestor) durante 1 a 3 h a 150-170°C (Sjöström, 1993). De entre as diversas vantagens que apresenta, comparativamente a outros processos químicos, pode destacar-se (Grace et al., 1989; Walker, 2006):

- a maior resistência e flexibilidade das pastas produzidas;
- a aplicabilidade a diversas espécies de madeira, independentemente das suas características físico-químicas;
- a gama alargada de aplicações das pastas;
- a capacidade de recuperação eficiente dos produtos químicos usados no cozimento, compensando os elevados custos de capital, o que o torna economicamente mais viável e competitivo.

Os agentes químicos ativos empregues no processo *kraft* são o hidróxido de sódio (NaOH) e sulfureto de sódio (Na₂S) (a designação ‘processo ao sulfato’ deve-se ao facto de se adicionar sulfato de sódio para reposição dos reagentes químicos perdidos), os quais conduzem à fragmentação e dissolução da lenhina para libertação das fibras de celulose (Bajpai, 2012). Contudo, os reagentes de cozimento não são completamente seletivos para com a lenhina e ocorrem, também, reações indesejáveis dos polissacarídeos, principalmente hemiceluloses, que pela sua estrutura química são bastante suscetíveis ao ataque químico.

As propriedades químicas e mecânicas das pastas resultantes têm grande influência na branqueabilidade da pasta e são influenciadas, como já referido, pelas variáveis inerentes à própria madeira, bem como pelas variáveis associadas ao processo de cozimento. Estas últimas estão relacionadas com as condições de operação do digestor (temperatura e tempo), com o licor (razão líquido/madeira, carga alcalina e índice de sulfureto) e com a manipulação da matéria-prima (impregnação e dimensões das aparas) (Carvalho, 1999; Potthast, 2006).

De uma forma resumida, a deslenhificação ocorre através da alteração da estrutura de lenhina de duas maneiras: pela fragmentação da lenhina através da quebra das ligações entre unidades e

pela introdução de grupos hidrofílicos na cadeia principal e nos seus fragmentos aumentando a sua solubilidade no licor de cozimento (Gierer, 1985).

Em relação ao conteúdo e reações que ocorrem com a lenhina, celulose e hemiceluloses, o cozimento *kraft* apresenta três etapas distintas – inicial, principal e residual (Gustafson et al., 1983; Grace et al., 1989; Carvalho, 1999; Potthast, 2006):

- A **fase inicial** decorre durante o período de tempo em que a temperatura aumenta até cerca de 140°C. É caracterizada pela perda substancial de hidratos de carbono, remoção de pequenas quantidades de lenhina (15 a 25% do total) e alto consumo de carga alcalina.
- A **fase principal** inicia-se a partir do momento em que a temperatura atinge aproximadamente 140°C. Nesta etapa a deslenhificação é mais seletiva e ocorre mais rapidamente, sendo cerca de 70% da lenhina dissolvida. Dá-se uma degradação apenas ligeira dos polissacarídeos e uma pequena diminuição da alcalinidade efetiva.
- Atingido um certo grau de deslenhificação (cerca de 90%), a velocidade de deslenhificação diminui subitamente e o prolongamento do cozimento resulta na **fase residual** de deslenhificação. Verifica-se um maior consumo de reagentes e domina a degradação dos polissacarídeos. A baixa seletividade na fase final do cozimento *kraft* convencional é um fator limitante, uma vez que a perda de rendimento e a diminuição do peso molecular da celulose são indesejáveis. Consequentemente, o cozimento deve ser interrompido previamente à fase residual.

A Figura 7 representa as reações que ocorrem com os principais componentes da madeira no cozimento *kraft*, algumas das quais demonstram ter grande influência na branqueabilidade das pastas, uma vez que alteram quimicamente os diferentes componentes da madeira, e serão descritas com maior detalhe nas secções seguintes.

Sendo a deslenhificação da madeira o objetivo do processo de cozimento, a sua eficiência pode ser avaliada pelo teor de lenhina residual na pasta produzida. Uma das metodologias utilizadas é a determinação do índice kappa (IK) que se baseia na reação redox do permanganato de potássio com a lenhina. No entanto, como se verá mais adiante, a presença de outros compostos na pasta pode induzir uma sobrevalorização deste índice.

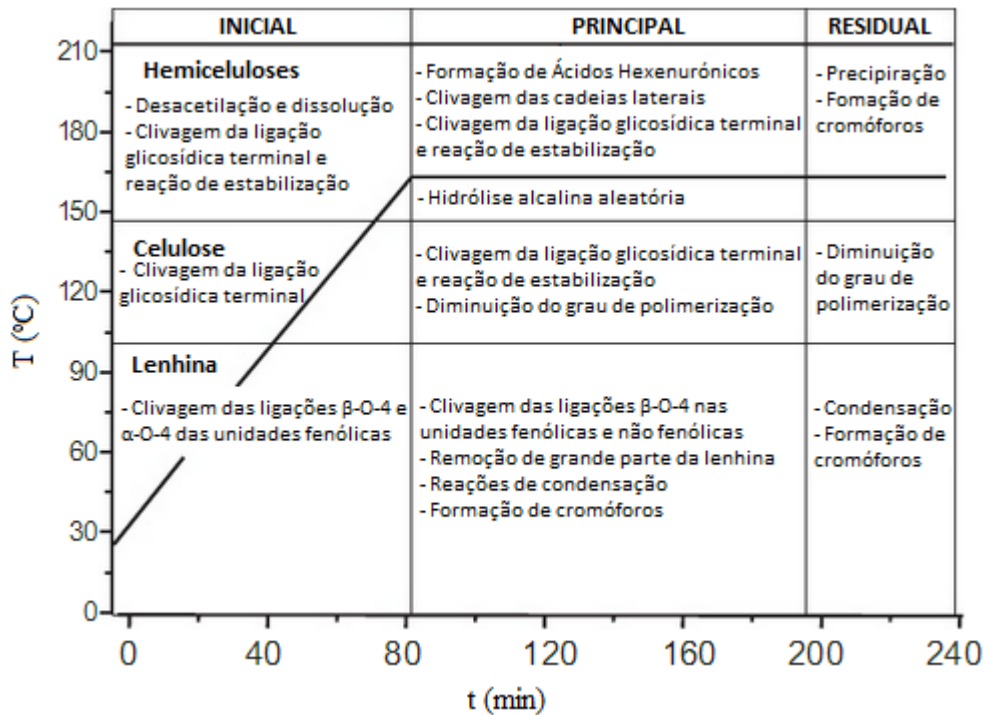


Figura 7. Fases da deslenhificação e as respectivas reações dos principais componentes da madeira (adaptado de Potthast, 2006; Ek et al., 2009).

3.1. REAÇÕES INDESEJÁVEIS DOS POLISSACARÍDEOS

Ao longo do processo de cozimento *kraft* para além da lenhina, os polissacarídeos são também degradados pelos reagentes de cozimento. A reatividade dos polissacarídeos depende altamente das suas características estruturais como a morfologia, a cristalinidade e o grau de polimerização, ocorrendo em geral reações complexas, entre as quais se destacam (Rydholm, 1985; Potthast, 2006):

- Hidrólise dos grupos acetilo das xilanas ($T > 70^{\circ}\text{C}$);
- Dissolução de compostos de baixo peso molecular;
- *Peeling* (cisão da ligação glicosídica terminal) e *stopping* (reação de estabilização) ($T > 80^{\circ}\text{C}$);
- Hidrólise aleatória das ligações glicosídicas não terminais ($T > 140^{\circ}\text{C}$);
- Fragmentações;
- Formação de ácidos hexenurónicos;
- Readsorção de hemiceluloses na superfície das fibras;
- Formação de cromóforos.

No global, a perda total de polissacarídeos pode atingir 20% do peso total da madeira inicial (Grace et al., 1989). A principal causa para a perda de polissacarídeos a temperaturas inferiores a 150°C é a degradação terminal (*peeling*) (Rydholm, 1985; Grace et al., 1989).

A celulose é mais resistente ao meio alcalino e é degradada em menor extensão que as hemiceluloses, devido ao grau de polimerização elevado e à dificuldade de acesso dos reagentes a zonas cristalinas, perdendo cerca de 10% da celulose original (Gustavsson & Al-Dajani, 2000). Ainda assim, o grau de polimerização diminui cerca de dez vezes em relação ao da madeira, principalmente devido à hidrólise aleatória das ligações glicosídicas. Por sua vez, as hemiceluloses são facilmente degradadas devido ao menor grau de polimerização e ao seu estado amorfo (Carvalho, 1999). As glucomananas são praticamente degradadas na totalidade, enquanto cerca de 50% das xilanas presentes na madeira são preservadas, apesar da diminuição do grau de polimerização e perda de grupos laterais (Sjöström, 1989).

A formação de ácidos hexenurónicos, a reabsorção de hemiceluloses na superfície das fibras e a formação de cromóforos têm especial impacto no branqueamento, sendo descritos com maior detalhe nas secções seguintes.

3.1.1. FORMAÇÃO DE ÁCIDOS HEXENURÓNICOS

Os ácidos 4-O-metilglucurónicos, grupos laterais presentes ao longo da cadeia das xilanas, são facilmente degradados a temperaturas elevadas, restando cerca de 25% da quantidade inicial (Buchert et al., 1995). Parte destas unidades são transformadas em grupos insaturados – os ácidos hexenurónicos – através da eliminação de metanol (Figura 8). A formação e a estabilidade dos ácidos hexenurónicos são fortemente influenciadas pela temperatura e carga alcalina do cozimento, como demonstrado para o *E. globulus* (Daniel et al., 2003; Pedroso & Carvalho, 2003).

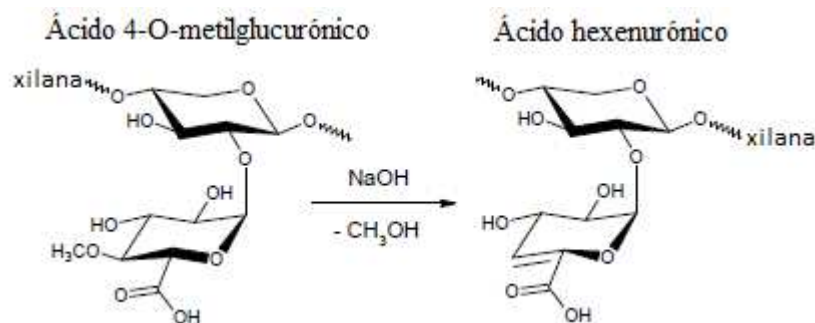


Figura 8. Formação de ácido hexenurónico através da perda de um grupo metanol do ácido 4-O-metilglucurónico em meio alcalino (adaptado de Loureiro, 2012).

Os ácidos hexenurónicos contribuem para o índice kappa, uma vez que consomem permanganato de potássio (Li & Gellerstedt, 1997). Uma unidade de kappa é equivalente a

aproximadamente 11 μmol de ácido hexenurónico (HexA), podendo o índice kappa ser representado até 50% por ácidos hexenurónicos, em pastas cruas de folhosas (Pedroso & Carvalho, 2003; Potthast, 2006; Suess, 2010). A Equação 1 desenvolvida por Pedroso e Carvalho (2003) para pastas *kraft* de *E. globulus* nacional mostra esta dependência, sendo LT a lenhina total residual na pasta:

$$\text{IK} = 5,6 \text{ LT} + 0,09 \text{ HexA} \quad (1)$$

válida na gama $7,5 \leq \text{IK} \leq 69$; $1,2 \leq \text{LT} \leq 12$ (% mássica na pasta) e $18 \leq \text{HexA} \leq 61$ (mmol/kg pasta).

A presença dos ácidos hexenurónicos afeta o desempenho dos reagentes de branqueamento e as propriedades da pasta após o branqueamento. Estes grupos aumentam o consumo de reagentes de branqueamento devido à ligação dupla que os torna reativos com os reagentes eletrofílicos (Jiang et al., 2000), retêm iões metálicos por quelação, e são geralmente relacionados com a reversão da brancura (Cadena et al., 2010).

3.1.2. READSORÇÃO DE HEMICELULOSES NA SUPERFÍCIE DAS FIBRAS

Devido à diminuição da alcalinidade do licor e consequente diminuição do pH na fase final do cozimento, as hemiceluloses (principalmente as xilanas) podem precipitar na superfície das microfibrilas. Após a remoção dos grupos substituintes laterais, a configuração das unidades de xilose permite um contacto próximo entre a xilana e a celulose, tendo a tendência a cristalizar ou a ser absorvidas na superfície das microfibrilas. As xilanas com baixo conteúdo em ácidos urónicos são preferencialmente adsorvidas (Viikari et al., 1994). A reprecipitação das xilanas tem um efeito positivo na ligação interfibras, sendo as propriedades mecânicas e a qualidade da pasta afetadas, para além de aumentar o rendimento. A estrutura da xilana altera, também, as características de adsorção das fibras em grande extensão, tendo influência na refinação da pasta (Potthast, 2006). Porém, a readsorção de xilanas na superfície das fibras restringe a passagem de lenhina de alto peso molecular, formando uma barreira física à sua extração pelos reagentes de branqueamento, o que faz aumentar o consumo destes (Kantelinen et al., 1993; Viikari et al., 1994).

3.2. LENHINA RESIDUAL E COMPLEXOS LENHINA-CARBOHIDRATOS (LCCs)

A lenhina nativa sofre alterações estruturais durante o cozimento, as quais são influenciadas pela extensão das reações de deslenhificação, bem como pelas condições inerentes ao processo, estando o seu conhecimento longe de absoluto (Gellerstedt & Gustafsson, 1987). A reatividade e as propriedades da lenhina residual durante os estágios subsequentes de deslenhificação ou

branqueamento dependem fortemente das características estruturais e dos grupos funcionais presentes. Os principais fatores que influenciam a solubilização e remoção da lenhina residual são o teor de grupos hidrofílicos presentes (principalmente os grupos fenólicos e carboxílicos) e o tamanho dos fragmentos de lenhina (Lachenal et al., 1995).

Todos os tipos de ligação entre as unidades fenilpropano podem ser encontradas na lenhina residual, embora em diferentes proporções relativas (Gellerstedt & Lindfors, 1984; Gierer, 1985). Estudos efetuados em pasta *kraft* de *E. globulus* revelam que a lenhina residual sofre condensação durante o cozimento, surgindo estruturas α -5, e o teor de estruturas 5-5 e 4-O-5 aumentam também. Simultaneamente, há uma diminuição de estruturas β -O-4 (cerca de 15% da encontrada na madeira correspondente) (Pinto et al., 2002). Pastas com baixo teor de lenhina apresentam menor quantidade de grupos hidroxilo alifáticos e estruturas β -O-4. Por outro lado, pastas com teor de lenhina mais elevadas apresentam maiores quantidades de grupos hidroxilos fenólicos, ácidos carboxílicos e estruturas condensadas (Froass et al. 1998). Para além destas alterações estruturais, a grande maioria da lenhina residual (cerca de 90%) em pastas *kraft* encontra-se ligada aos polissacarídeos, principalmente às hemiceluloses (Lawoko et al., 2005).

As ligações covalentes entre a lenhina e os hidratos de carbono, que dão origem aos denominados complexos lenhina-carbohidratos (LCCs- *Lignin-Carbohydrate Complexes*), têm sido sugeridas como sendo existentes tanto na madeira como em pastas químicas, apesar da ambiguidade na quantidade, no tipo e frequência em que ocorrem (Lawoko et al., 2005). Foram sugeridos diferentes tipos de ligação entre a lenhina e os carbohidratos, entre os quais ligações do tipo éster-benzilo, éter-benzilo e fenilo-glicosídicas (Watanabe, 2003). As ligações do tipo éster-benzilo e éter-benzilo são as mais frequentes na parede celular (Figura 9), o que está intimamente relacionado com a biossíntese da lenhina (Watanabe, 1995).

As ligações éster-benzilo são instáveis nas condições alcalinas próprias do cozimento e portanto facilmente degradadas, enquanto as éter-benzilo parecem ser estáveis nas mesmas condições (Watanabe, 1995). De facto, a prevalência de ligações estáveis em alcali nas pastas tem demonstrado contribuir em parte para a diminuição da velocidade de deslenhificação (Figura 7) na fase final do cozimento pois a ligação éter inibe a clivagem das ligações β -O-4 (Lawoko et al., 2003).

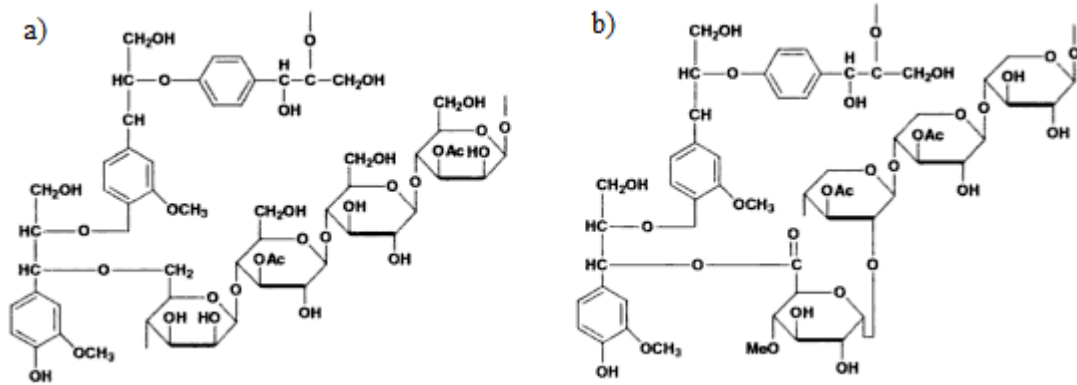


Figura 9. LCCs mais comuns. a) Ligação éter-benzilo. b) Ligação éster-benzilo (adaptado de Watanabe, 2003).

Além dos LCCs existentes na madeira, existem LCCs produzidos durante o processo de cozimento *kraft*. Quase a totalidade da lenhina residual na pasta *kraft* (ca. 90%) está ligada covalentemente aos polissacarídeos, na sua maioria hemiceluloses (Gellerstedt, 2007). Alguns estudos reportam as quantidades relativas de lenhina ligada covalentemente às hemiceluloses como as glucomanas, as xilanas e a agregados destas, e sua dependência do grau de deslenhificação – Figura 10 (Ek et al., 2009).

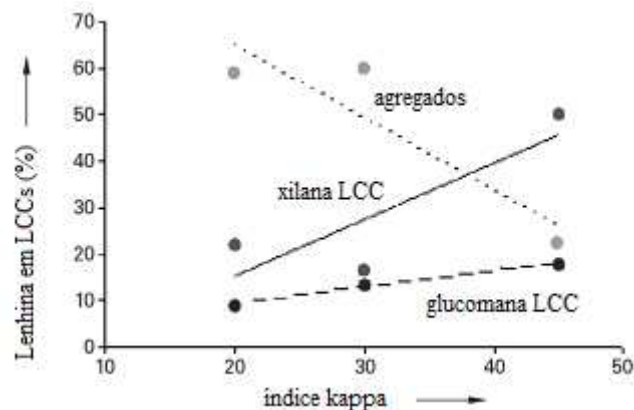


Figura 10. Lenhina ligada quimicamente às glucomanas, às xilanas e à rede glucomanas-xilanas em pastas *kraft* de resinosas com diferentes índices kappa (adaptado de Ek et al., 2009).

3.3. FORMAÇÃO DE CROMÓFOROS

Os grupos cromóforos são compostos que absorvem luz na região do ultravioleta ou visível conferindo cor à pasta (Sêco, 2006). Em comparação com outros processos de obtenção de pastas químicas, a pasta *kraft* apresenta um coeficiente de absorção específico superior ao da madeira original, o que comprova a formação de agentes cromóforos ao longo do processo de cozimento (Sjöström, 1993; Potthast, 2006).

As estruturas cromóforas podem ter origem nas frações aromáticas da lenhina conjugadas com as ligações duplas das cadeias laterais, nos extratáveis e nos polissacarídeos (como as estruturas insaturadas dos ácidos hexenurónicos) e nos produtos de degradação destes componentes. Os LCCs têm sido referidos como a principal fonte de cromóforos em pasta *kraft* (Watanabe, 1995) tendo recentemente sido identificadas estruturas polinsaturadas pertencentes aos complexos xilana-lenhina (Loureiro et al., 2010; Loureiro et al., 2011). Embora as estruturas exatas dos cromóforos não sejam todas conhecidas, tem sido sugerido que as ligações duplas conjugadas com anéis aromáticos, a oxidação pelo ar do catecóis (provenientes da desmetilação da lenhina S ou G), os estilbenos, as quinonas, as metileno quinonas e outras estruturas fenólicas altamente conjugadas formadas ao longo do cozimento desempenham um papel preponderante na contribuição para a cor castanha da pasta crua (Gierer, 1970; Gellerstedt & Lindfors, 1984; Dence & Reeve, 1996; Niemelä, 1989a; Lachenal et al., 2005; Rosenau et al., 2007). Na presença de metais, produz-se uma cor mais intensa, por oxidação dos estilbenos originando derivados das quinonas, ou de catecóis originando complexos metal-catecol (Potthast, 2006; Suess, 2010). Os grupos carbonilo conjugados (aldeídos e cetonas) são também agentes cromóforos (Ehara et al., 1998; Carreira, 2009).

A formação dos cromóforos, em conjunto com as alterações da lenhina residual, são uma das razões para a diminuição da branqueabilidade das pastas *kraft* e a sua oxidação no branqueamento pode resultar em estruturas que afetam a eficiência do branqueamento (Potthast, 2006).

4. BRANQUEAMENTO DE PASTAS KRAFT

Como resultado do processo de cozimento, dissolve-se no licor cerca de 45 % da madeira de folhosas, sendo a pasta constituída principalmente por celulose (cerca de 76%) e hemiceluloses (cerca de 21 %). Após o cozimento, a pasta *kraft* de folhosas contém ainda cerca de 1,5-4% de lenhina, apresentado uma cor castanha acentuada (Sixta et al., 2006). Além disso, a pasta crua contém outros componentes que conferem cor, tais como extratáveis, impurezas e sujidade que provém da própria madeira (casca, incozidos, etc.), do processo de cozimento, ou de fontes externas (ferrugem, areias, etc.) (Potthast, 2006). A continuação do cozimento para diminuir o teor de lenhina, conduz a uma diminuição significativa da qualidade da pasta, devido à acentuada degradação da celulose. Desta forma, para remover seletivamente as estruturas cromóforas presentes na pasta e aumentar a sua brancura é necessário recorrer a reagentes mais seletivos que oxidem a lenhina. A brancura, segundo a *International Organisation for Standardisation* (ISO), é definida como a refletância, quando se faz incidir um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm (Sixta et al., 2006).

O branqueamento é um processo multi-estágios, principalmente devido à diferente reatividade e/ou localização do material colorido na pasta, o qual não pode ser eliminado num só estágio de branqueamento sem dar origem a uma degradação significativa dos polissacarídeos, o que torna os reagentes incapazes de combinar a ação de branqueamento com a eficiente remoção de material oxidado. Assim, a aplicação de pequenas quantidades de reagentes em estágios sucessivos permite atingir brancuras mais elevadas e é mais eficiente (Grace et al., 1989; Bajpai, 2012).

Os primeiros estágios de uma sequência de branqueamento são, na realidade, etapas de deslenhificação, onde grande parte da lenhina residual é removida. As fases posteriores na sequência eliminam os cromóforos para obter um grau de brancura elevado (Sixta et al., 2006). Cada estágio do processo de branqueamento tem uma notação atribuída de acordo com um protocolo padrão como a TAPPI *Technical Information Sheet* (TIPS) TIP 0606-21 “*Recommended pulp bleaching stage designation method*” (Loureiro, 2012). A Tabela 2 apresenta os reagentes químicos típicos utilizados no branqueamento.

Tabela 2. Classificação dos principais reagentes de branqueamento e a sua reatividade em relação à lenhina e aos polissacarídeos (adaptado de Suess, 2010; Sixta et al., 2006; Bajpai, 2012).

Notação	Reagente de branqueamento	Tipo de Reação	pH	Locais de Reação
C	Cloro (Cl ₂)	Eletrofílica	Ácido	Lenhina: estruturas oleofínicas; aromáticas Polissacarídeos: HexA
D	Dióxido de Cloro (ClO ₂)	Eletrofílica	Ácido	Lenhina: grupos fenólicos livres; ligações duplas Polissacarídeos: HexA
H	Hipoclorito (NaOCl)	Nucleofílica	Alcalino	Lenhina: grupos carbonilo; ligações duplas conjugadas
P	Peróxido de Hidrogénio (H ₂ O ₂)	Nucleofílica	Alcalino	Lenhina: grupos carbonilo; ligações duplas conjugadas
O	Oxigénio (O ₂)	Eletrofílica	Alcalino	Lenhina: grupos fenólicos livres; ligações duplas
Z	Ozono (O ₃)	Eletrofílica	Ácido	Lenhina: estruturas oleofínicas; aromáticas Polissacarídeos: HexA

A escolha da sequência de branqueamento ótima deve ter em conta o custo dos reagentes, o custo de investimento nos equipamentos, custos energéticos, entre outros. Para além disto, as propriedades da madeira, o processo de obtenção das pastas e as características finais desejadas (brancura e propriedades mecânicas) são também fatores importantes a ter em consideração.

No presente trabalho, a pasta foi semi-branqueada (apenas três estágios) com uma sequência constituída por um tratamento enzimático com xilanases (X), seguindo-se um estágio de dióxido de cloro (D) e, por fim, uma extração alcalina (E) reforçada com peróxido de hidrogénio (P), designando-se a sequência por XD₀EP, ou, por simplificação XDE. A forma de atuação e o efeito destes estágios no branqueamento será descrito em maior detalhe nas secções seguintes.

4.1. TRATAMENTO ENZIMÁTICO

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos, produzidas por todos os seres vivos e essenciais ao desenvolvimento e manutenção da vida, cuja constituição pode ascender a uma combinação de até 20 aminoácidos diferentes. Através da variação da sua estrutura e, em alguns casos, pela adição de cofatores como iões metálicos ou moléculas orgânicas, é possível obter centenas de enzimas com diversas funções (Kirk et al., 2005). Em 1833, Duclaux sugeriu a designação das enzimas de acordo com a natureza da reação química que catalisam ou a substância transformada, através da adição do sufixo ‘-ase’. São também classificadas por números EC

(*Enzyme Commission*) em função da reação química que catalisam, segundo a *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (Moss, 2014).

As enzimas têm demonstrado um papel importante em diversos processos de produção, desde os tempos antigos, como na produção de pão, vinho, queijo, etc. Nas últimas décadas, a biotecnologia – incluindo os processos enzimáticos – tem emergido como alternativa, ou suplemento aos processos químicos numa variedade de setores industriais, devido à sua elevada especificidade e eficácia que são muitas vezes superiores às alternativas convencionais em termos de matéria-prima, consumo de energia, rendimento e qualidade do produto final (Skals et al., 2008). As suas aplicações industriais variam desde a produção de detergentes, cosméticos, biocombustíveis, bebidas, alimentação, têxteis e também a produção de pasta e papel (Kirk et al., 2002). No setor da pasta e papel, são diversas as potenciais aplicações da adição de enzimas, tanto no cozimento químico, mecânico, bem como na reciclagem de papel, algumas das quais são atualmente implementadas à escala industrial, outras estão correntemente a ser testadas à escala piloto e outras testadas laboratorialmente (Tabela 3) (Skals et al., 2008).

Tabela 3. Aplicação de enzimas em diversos processos na produção de pasta e papel (adaptado de Skals et al., 2008; Novozymes®, 2010).

Processo	Enzima	Função
<i>Bleach Boosting</i>	Xilanase	Poupança de reagentes químicos através da degradação das xilanas e melhor extração da lenhina.
Remoção de Peróxido	Catalase	Aumento da vida útil dos equipamentos, impedindo a corrosão (remoção de H ₂ O ₂).
Modificação da superfície das fibras	Lacase, Celulase	Aumento da resistência mecânica do papel.
Refinação de PTM*	Celulase	Poupança de energia pela suavização da superfície das fibras.
Controlo de <i>Pitch</i> ** em PTM*	Lipase	Diminuição dos tempos de paragem e poupança de agentes de limpeza por hidrólise do <i>pitch</i> .
Remoção de amido	Amilase	Poupança de químicos de destintagem e aumento da eficiência.
Destintagem	Celulase	Poupança de químicos de destintagem convencionais pela hidrólise da celulose e libertação da tinta
Controlo de <i>Stickies</i> ***	Esterase	Poupança de químicos e energia durante os tempos de paragem pela hidrólise de PVAc (Poliacetato de vinilo).
Drenagem	Celulase, Hemicelulase	Poupança de energia na drenagem pela melhoria da estrutura das fibrilas.
Preparação de amido	Amilase	Preparação de amido para revestimento por modificação da estrutura do amido.
Controlo de lamas	Protease	Redução do consumo de biocidas pela degradação de bactérias ligadas à superfície das fibras.

* PTM – pastas termomecânicas.

** *Pitch* – material resinoso que forma aglomerados causando problemas nos equipamentos e diminuindo a qualidade do papel.

*** *Stickies* – material proveniente de adesivos, revestimentos ou ligantes que contêm grandes quantidades de PVAc que se deposita nos equipamentos.

A utilização de xilanases para efeitos de *bleach boosting* é a aplicação biotecnológica mais usada e melhor estabelecida para a produção de pasta e papel (Bajpai, 2012). O pré-tratamento com xilanases conduz a uma redução de AOX nos efluentes e da concentração de dioxinas devido à redução de dióxido de cloro necessário nas etapas subsequentes do branqueamento (Kuhad & Sigh, 2007).

As xilanases são as enzimas que catalisam a hidrólise da xilana (Valls et al., 2010; Valenzuela et al., 2013). Devido à complexidade e heterogeneidade da cadeia da xilana (como se descreveu na secção 2.2), a sua hidrólise completa requer uma grande variedade de enzimas que atuam sinergicamente (Figura 11). Estas enzimas são a endo- β -1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), a β -xilosidase (EC 3.2.1.37), a α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), a α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), a feruloil esterase (EC 3.1.1.73), a acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72) e a glucuronoil esterase (EC correntemente não atribuído) (Dhiman et al., 2008; Yang et al., 2013; Bajpai, 2014). De entre estas, as duas principais responsáveis pela hidrólise da xilana são as endo- β -1,4-xylanases (ou apenas endo-xilanases) que atuam na cadeia principal da xilana (Figura 11), produzindo xilo-oligómeros (Ahmed et al., 2009) e as β -xilosidases que atuam nesses xilo-oligómeros libertando xilose (Knob et al., 2010). Este facto pode ser explicado parcialmente pela química do cozimento *kraft*: a remoção de parte dos grupos laterais da xilana ao longo do cozimento pode tornar desnecessária a utilização das restantes enzimas para a hidrólise total da xilana (Ek et al., 2009).

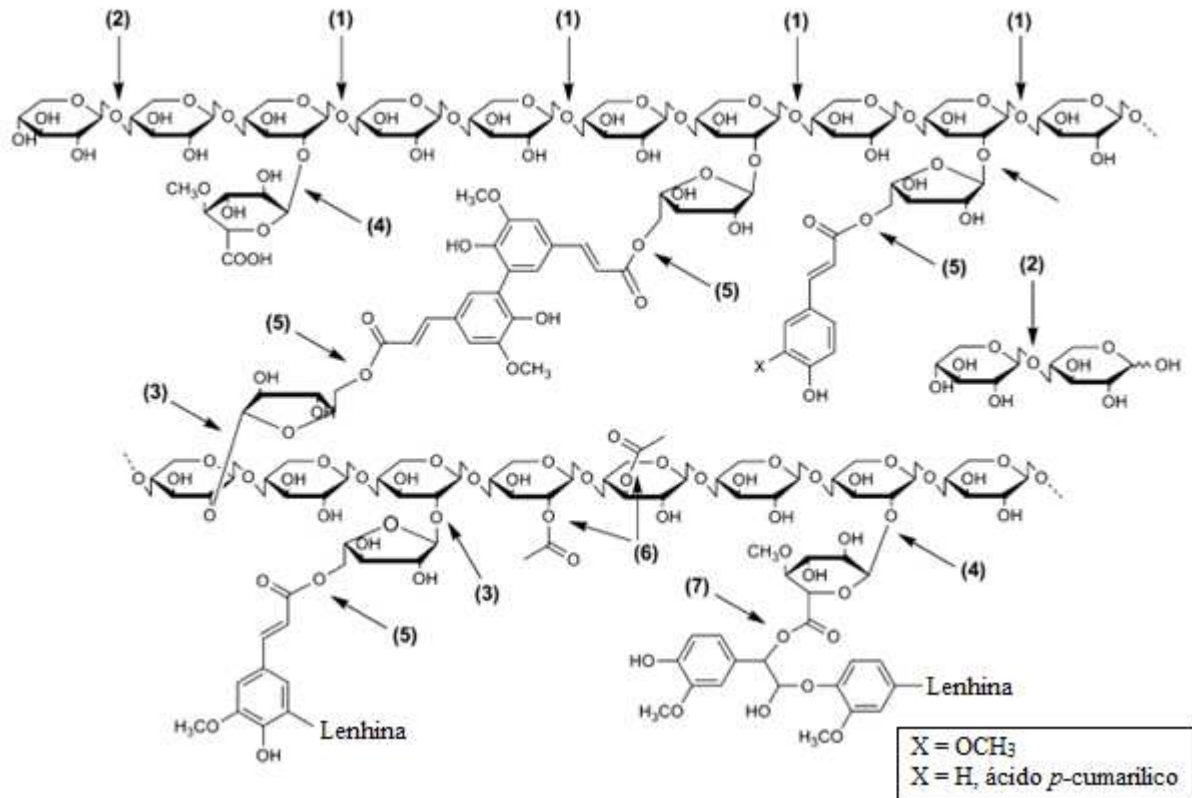


Figura 11. Enzimas requeridas para a hidrólise total da xilana: 1, endo- β -1,4-xilanase; 2, β -xilosidase; 3, α -l-arabinofuranosidase; 4, α -glucuronidase; 5, feruloil esterase; 6, acetilxilana esterase; 7, glucuronil esterase (adaptado de Yang et al., 2013).

Em 1986, Viikari e os seus colaboradores reportaram pela primeira vez o efeito positivo no branqueamento do pré-tratamento de pastas com xilanases (Viikari et al., 1994). O mecanismo de atuação das xilanases, de modo a favorecer o branqueamento, não é totalmente conhecido. Contudo, sabe-se que não degradam ou modificam a lenhina diretamente, devido à sua elevada seletividade para com a xilana. Esta especificidade típica das enzimas em relação a um substrato foi explicada por Fisher, em 1890, que propôs o modelo chave-fechadura (Figura 12).

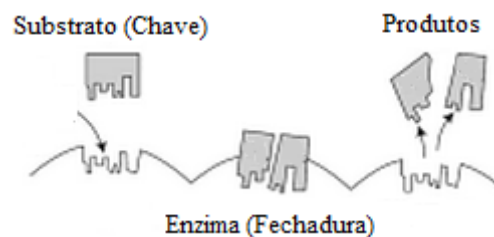


Figura 12. Sequência de eventos entre a enzima e o substrato de acordo com o modelo chave-fechadura (adaptado de Tripathi, 2010).

Segundo este modelo, o substrato apresenta uma forma complementar à da enzima, encaixando perfeitamente no seu centro ativo (tal como uma chave encaixa na fechadura), para que os grupos funcionais se alinhem apropriadamente. Após a reação catalítica o(s) produto(s) são

libertados e o centro ativo da enzima fica livre para uma nova reação (Tripathi, 2010). Desta forma, a reação catalítica não será iniciada na presença de um substrato com uma forma incompatível à da enzima, dando origem à elevada seletividade das enzimas.

O mecanismo de ação das xilanases que permite o *bleach boosting*, não é ainda totalmente conhecido apesar de esta ser a aplicação de enzimas no processo de produção de pasta e papel mais estudada (Dhiman et al., 2008). Todavia, estudos indicam que o índice kappa, diminui após o tratamento com xilanases, o que sugere a contribuição da xilanase para a deslenhificação da pasta, através da quebra das xilanas que se encontram ligadas covalentemente à lenhina (complexos LCC) produzindo moléculas mais pequenas e mais fáceis de remover (Figura 13.a), os quais como referido na secção 3.2 são, segundo alguns autores, a maior fonte de cromóforos em pastas *kraft* pelo que a sua remoção faz aumentar a brancura da pasta (Bajpai, 2014). Por outro lado, a quebra de parte das xilanas permite também a remoção de ácidos hexenurónicos formados ao longo do cozimento *kraft*, o que diminui o consumo de reagentes eletrofílicos de branqueamento (secção 4.2.) e a reversão da brancura (Figura 13.b) (Ek et al., 2009; Bajpai, 2014). Outra hipótese de atuação das enzimas baseia-se no facto de parte das xilanas precipitarem ao longo do cozimento *kraft* (secção 3.1.2). Esta re-precipitação aprisiona fisicamente alguma lenhina residual, pelo que a sua remoção permitirá uma melhor penetração dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes (Figura 13.c) (Beg et al., 2001; Ek et al., 2009). A predominância de cada um destes mecanismos está relacionada com as propriedades intrínsecas da madeira e do processo de obtenção de pastas, que influenciam a sua composição química, podendo em cada caso específico, a atuação das xilanases ser explicada por um ou mais dos mecanismos propostos.

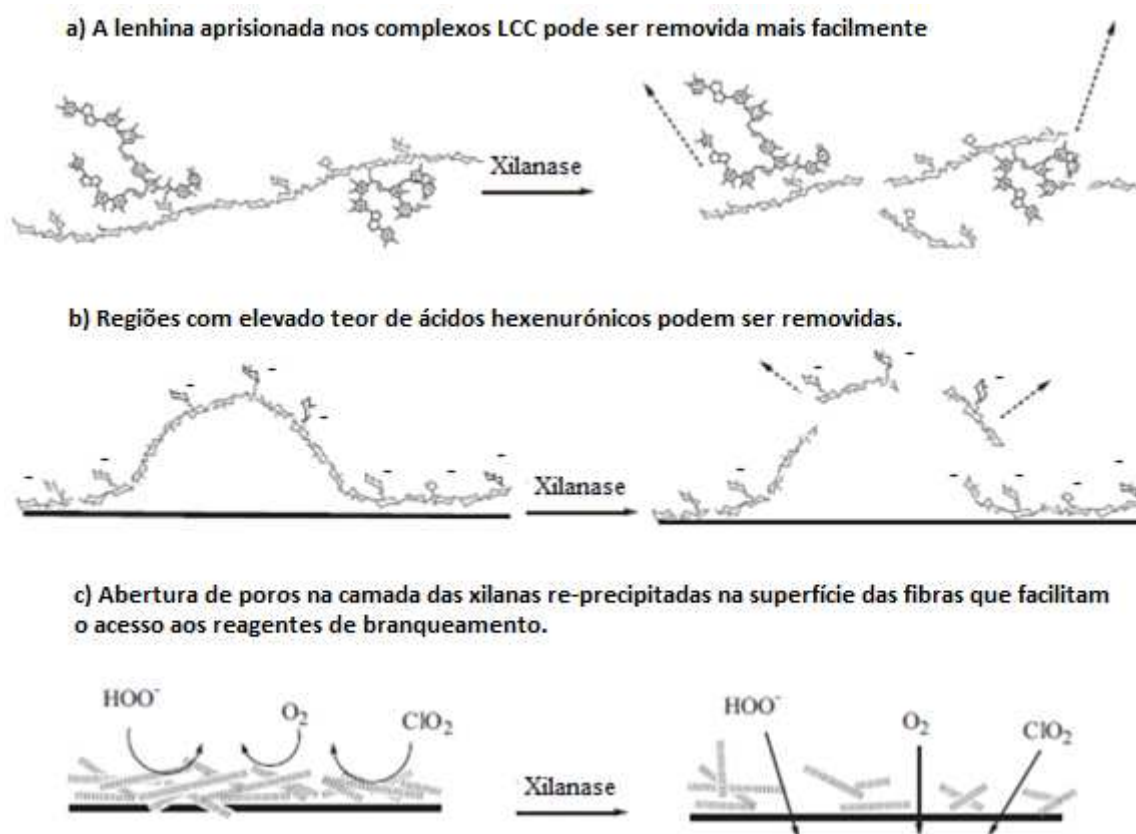


Figura 13. Mecanismo de ação das xilanases que permitem o bleach boosting (adaptado de Ek et al., 2009).

As xilanases são produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, algas, fungos, leveduras, entre outros (Esteghlalian et al., 2008; Bajpai, 2012). A implementação de xilanases à escala industrial, iniciada em 1991 (Viikari et al., 1994), aumentou a atenção para a produção de xilanases que se adaptem às condições industriais. Os fungos filamentosos são particularmente interessantes do ponto de vista industrial, devido ao facto de secretarem grandes quantidades de enzimas xilanólíticas para o meio, em comparação com as bactérias ou leveduras (Bajpai, 2012; Guimarães et al., 2013; Bajpai, 2014). Os fungos conhecidos por produzirem xilanases incluem *Aspergillus*, *Coniothyrium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Thermomyces lanuginosus*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Neocallimastix*, *Trichoderma*, etc (Bajpai, 2012). Por outro lado, a estabilidade térmica e a tolerância ao alcali são atributos desejados para a aplicação no biobranqueamento, uma vez que as enzimas são normalmente incubadas com a pasta crua em torres de armazenamento a alta consistência, onde o pH varia, em geral, de 7 a 11, dependendo da eficiência da lavagem, e temperaturas de 60 a 90°C, por forma a eliminar a necessidade de ajustar o pH ou a temperatura (Lundgren et al., 1994; Esteghlalian et al., 2008). As xilanases produzidas por bactérias adaptam-se melhor a temperaturas e pH mais elevados, o que as torna mais adequadas para ambientes industriais (Bajpai, 2012). Pode-se destacar as xilanases produzidas por espécies de *Bacillus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Talaromyces emersonii*, *T. lanuginosus*, *Melanocarpus*

albomyces, *Sporotrichum*, *Thermotoga* sp. etc (Bajpai, 2012). Outra condição essencial na escolha das enzimas para produção de xilanases é o facto de haver contaminação com celulases, o que tem implicações económicas devido à elevada perda de rendimento, degradação da qualidade da pasta e aumentos de custos para tratamento de efluentes devido à maior carga orgânica dissolvida (Bajpai & Bajpai, 1997). Mesmo não havendo atividade celulolítica há um aumento no efluente de BOD de 2 a 5 kg/ton de pasta resultante da libertação de xilanases de baixo peso molecular. Este BOD é de natureza facilmente degradada no tratamento secundários, não sendo necessárias alterações no sistema de tratamento (Bajpai, 2012).

As enzimas são extremamente sensíveis às condições do meio, sendo necessário um controlo apertado de diversos aspetos que influenciam a sua atividade. A atividade ótima varia em função da enzima e da sua origem. Os fatores que mais influenciam a hidrólise enzimática das xilanas são (Bajpai & Bajpai, 1997; Beg et al., 2001; Bajpai, 2014):

- A concentração e tipo de substrato – que influencia a velocidade inicial e o rendimento da hidrólise enzimática. Como sugere a cinética de *Michaelis-Menten*, a partir de um determinado ponto, o aumento da concentração não conduz a um aumento da velocidade inicial, indicando a saturação da enzima. Este é o passo limitante da catálise enzimática (Purich & Allison, 2000).
- O pH – a eficiência da hidrólise enzimática está fortemente relacionada com o pH de atuação. Fora do intervalo de pH ótimo, as enzimas reduzem ou, em casos extremos, podem perder totalmente a sua atividade, refletindo-se na diminuição da sua eficiência.
- A temperatura – que poderá ter o mesmo efeito que o pH. O afastamento da temperatura do ótimo de atuação causa a diminuição ou perda de atividade.
- A concentração de inibidores – provenientes da própria madeira, ou formados ao longo do cozimento, podem condicionar a atividade xilanolítica através do bloqueio dos centros ativos, conduzindo à inibição total ou parcial da enzima e à consequente diminuição da atividade.

Para além destes, existem outros fatores que têm grande influência na atividade enzimática. A carga enzimática, a dispersão de xilanase no substrato, a consistência e o tempo de reação são outros fatores importantes (Beg et al., 2001). As características estruturais da pasta podem criar barreiras físicas à ação enzimática, como o tamanho das partículas, a porosidade e o volume de poros (Yang et al., 2013) que, dependendo do tamanho da xilanase (Saake et al., 1995), podem dificultar a sua acessibilidade à xilana, e também o grau de polimerização e a cristalinidade dos polissacarídeos (Yang et al., 2013). A ação enzimática é também influenciada pelas interações

eletroquímicas entre as fibras e as enzimas. Os grupos carboxílicos presentes (responsáveis pelo intumescimento da fibra) e a carga superficial têm grande efeito na ação das xilanases. Quanto mais negativa for a superfície da fibra maior será a atividade enzimática (Figura 13.b) (Kuhad & Sigh, 2007; Simeonova et al., 2007).

O estágio enzimático pode ser introduzido em sequências de branqueamento tradicionais, ECF ou TCF (Tabela 4), sendo o desempenho da xilanase também influenciado pela sequência de branqueamento (Bajpai, 2009).

Tabela 4. Sequências de branqueamento com tratamento enzimático e respectivas vantagens (Bruce & Palfreyman, 1998; Farrell et al., 1996).

Sequência	Exemplos	Vantagens
Convencional	XCEDED	Redução no consumo de Cl ₂ Redução de AOX nos efluentes
	X(CD)EDED	
	OX(CD)ED	
ECF	XDED	Redução no consumo de ClO ₂ Redução de AOX nos efluentes Aumento da produtividade (para produção de ClO ₂ limitada)
	OXDED	
	OXDP	
	X(E _{OP})D(E _{OP})D	
TCF	X(EP)	Aumento da brancura final Redução no consumo de reagentes de branqueamento Preservação das propriedades de resistência mecânica
	ZX(E _P)	
	OXZP	
	OXQPZP	

O estágio enzimático é tipicamente introduzido no início da sequência de branqueamento, com a pasta crua, ou após o estágio de oxigénio, como se pode observar nos exemplos da Tabela 4, e tal como se procedeu neste trabalho. As poupanças obtidas antes ou após o estágio de oxigénio são semelhantes, evitando-se a necessidade de arrefecimento e neutralização da mistura antes do estágio de oxigénio (Tolan & Guenette, 1997). Os principais objetivos deste posicionamento estão relacionados com a redução do consumo de reagentes de branqueamento através do efeito de *bleach boosting* das xilanases ou o aumento da brancura e a redução de emissões de AOX nos efluentes (em sequências convencionais ou ECF) (Farrell et al., 1996; Bajpai, 2014; Gangwar et al., 2014).

Por outro lado, o tratamento enzimático pode ser aplicado no final do branqueamento, denominando-se pós-tratamento. Este pode ser aplicado no último estágio, tendo como objetivo principal promover uma maior estabilidade da brancura, em comparação com os reagentes normalmente utilizados (dióxido de cloro ou peróxido de hidrogénio) ou imediatamente antes do último estágio, obtendo-se maior estabilidade da brancura e ainda poupança de reagentes de branqueamento no último estágio (Simeonova et al., 2007; Sousa, 2012; Esteves, 2013). Estes

fenômenos devem-se possivelmente devido à remoção de ácidos hexenurônicos e estruturas cromóforas estáveis que de outra forma se mantêm na pasta (Gangwar et al., 2014). Sousa (2012) estudou a aplicação de xilanases em pastas DED, concluindo que o tratamento enzimático é mais vantajoso antes do último estágio de branqueamento (DEDXP ou DEDXD em vez de DEDPX ou DEDDX), em termos da brancura atingida e reversão.

4.2. DIÓXIDO DE CLORO

O dióxido de cloro é um dos reagentes de branqueamento mais eficazes para atingir brancuras elevadas e o mais utilizado em sequências ECF, principalmente devido à sua elevada seletividade (Ek et al., 2009). A reação do dióxido de cloro com a lenhina, em meio ácido, é caracterizada por uma etapa inicial rápida onde predomina a oxidação das estruturas aromáticas e alguma cloração, e uma etapa subsequente mais lenta, onde ocorre essencialmente a oxidação da lenhina (Schwanninger, 2006). O dióxido de cloro reage mais facilmente com a lenhina residual, se esta tiver na sua composição uma maior fração de grupos fenólicos livres (Carvalho, 1999). A partir das reações complexas deste reagente com os diversos componentes da pasta, há um aumento na fração de grupos carboxilo, alguns carbonilo, e mantém-se praticamente inalterado o teor de grupos hidroxilo alifáticos nas pastas (Lachenal et al., 1995).

A oxidação da lenhina é iniciada a partir da adição eletrofílica de dióxido de cloro aos núcleos aromáticos dos grupos fenólicos e não fenólicos, o que resulta na formação de íons clorito e de radicais intermediários correspondentes. Estes radicais são posteriormente oxidados pelo dióxido de cloro para formar uma variedade de produtos de oxidação e ácido hipocloroso (Figura 14) (Kolar et al., 1983; Suess, 2010).

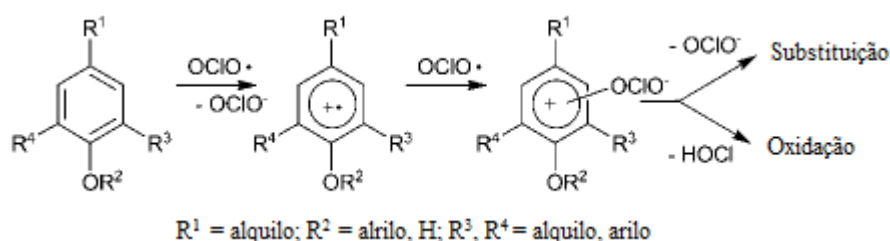


Figura 14. Possível mecanismo da reação do dióxido de cloro com as estruturas fenólicas e não fenólicas da lenhina (adaptado de Svenson et al., 2006).

No caso dos grupos fenólicos ($\text{R}^2 = \text{H}$), estes radicais intermediários perdem facilmente um próton, originando radicais fenoxilo os quais reagem seguidamente com o dióxido de cloro, originando a abertura dos anéis aromáticos com formação de ácido mucónico ou a eliminação de cadeias laterais com a formação de quinonas como produtos secundários (Figura 15). No caso de

estruturas não fenólicas ($R^2 =$ alquilo ou arilo), os radicais intermediários existem em várias formas do ião oxônio (Suess, 2010; Schwanninger, 2006). Os compostos fenólicos reagem com o dióxido de cloro cerca de 10^5 vezes mais rápido que com os compostos não fenólicos, sendo as unidades fenólicas oxidadas primeiro. (Svenson et al., 2006).

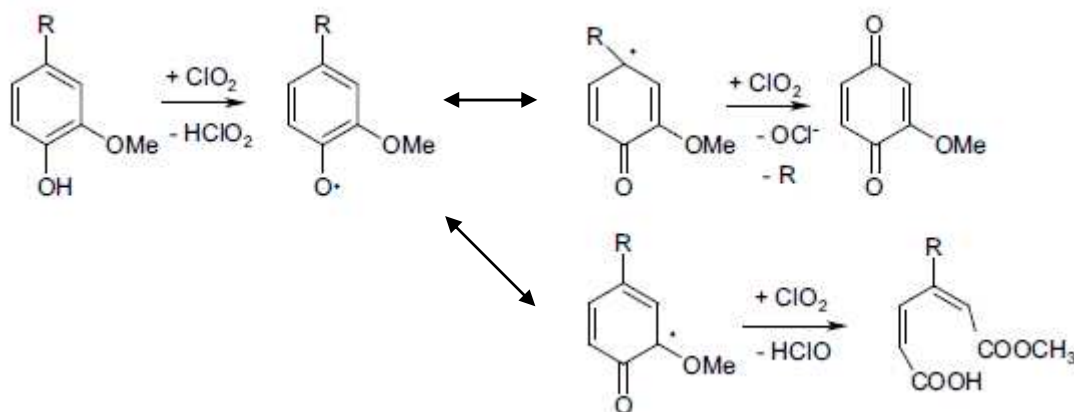
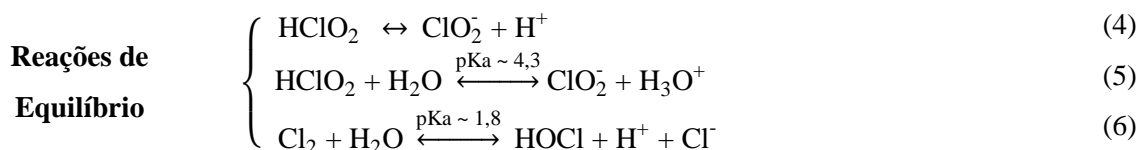
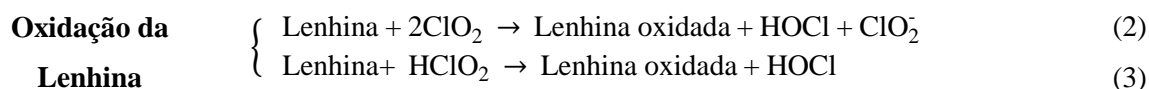
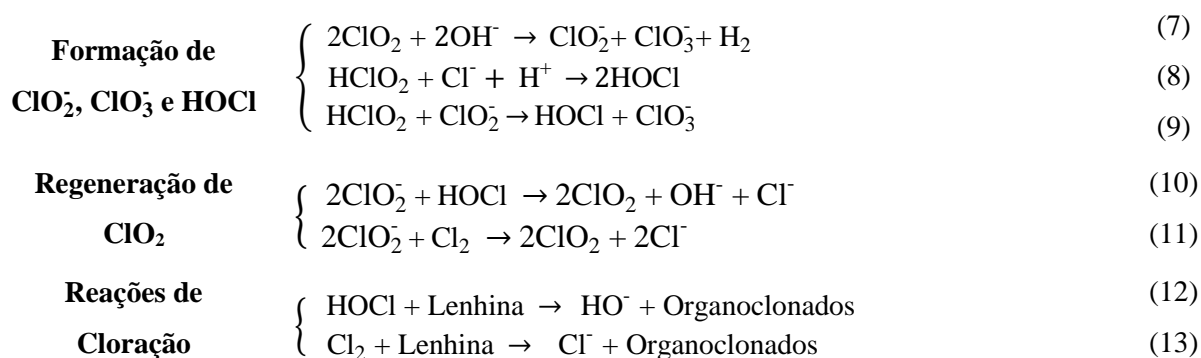


Figura 15. Reação inicial de oxidação das estruturas fenólicas da lenhina residual com dióxido de cloro (adaptado de Suess, 2010).

As reações que envolvem o dióxido de cloro são diversas e complexas, estando longe de serem totalmente conhecidas. O dióxido de cloro pode formar um conjunto de outras espécies inorgânicas derivadas do cloro (clorato, clorito, hipoclorito, cloro, cloreto), o que diminui significativamente a sua eficiência e têm grande importância no branqueamento. A perda do poder de oxidação do cloro (+4 na forma ClO_2 para -1 na forma Cl^-) conduz a um aumento nos custos de branqueamento.

O clorito (ClO_2^-) e o ácido hipocloroso (HOCl) formados durante as reações iniciais com a lenhina estão envolvidos em diversas reações secundárias, uma pequena parte dessas reações estão apresentadas nas Eqs. 2 a 13 para efeitos demonstrativos (Kolar et al., 1983; Svenson et al., 2006; Schwanninger, 2006; Lehtimaa et al., 2010; Suess, 2010). A eficiência global do branqueamento com dióxido de cloro está diretamente relacionada com a quantidade de espécies inorgânicas formadas, as quais são dependentes da estrutura da lenhina residual e do pH do estágio de branqueamento (Svenson et al., 2006).





O ácido cloroso (HClO_2) formado a partir do dióxido de cloro também reage com a lenhina e está envolvido em diversas reações secundárias, p. e. Eqs. 3, 4, 5, 8 e 9 (Kolar et al., 1983; Suess, 2010).

Em condições alcalinas, o dióxido de cloro dá origem a iões clorito e clorato (Eq.7). O clorito sofre reações de dismutação que originam clorato (ClO_3^-) e ácido hipocloroso, segundo a Eq. 9. Os iões clorato são ineficazes no processo de deslenhificação/branqueamento (Schwanninger, 2006). Em condições ácidas o ácido cloroso pode decompor-se e formar ácido hipocloroso e clorato (Eq. 9) (Kolar et al., 1983; Lehtimaa et al., 2010). A produção de ácido hipocloroso aumenta a eficiência do branqueamento devido à regeneração do dióxido de cloro através da oxidação do clorito, conforme ilustrado na Eq. 10) (Schwanninger, 2006). A perda do poder de oxidação faz com que esta reação constitua um passo fundamental para o melhor desempenho do dióxido de cloro em condições ácidas.

O ácido hipocloroso, assim como o cloro reagem com a lenhina para formar compostos organoclorados (Eqs. 12 e 13). O ácido hipocloroso está em equilíbrio com o cloro de acordo com a Equação (6). Assim, em condições ácidas (na gama $\text{pH} < 2$) o equilíbrio da Eq. 6 desloca-se para a esquerda e uma quantidade significativa de cloro elementar está presente, o que facilita a despolimerização da lenhina (Schwanninger, 2006). A desvantagem da produção de cloro é o aumento de compostos organoclorados nos efluentes devido à formação de clorolenhinas (por adição de átomos de cloro à lenhina) nefastas para o ambiente.

Assim, para a eficácia do estágio de dióxido de cloro, é importante encontrar condições menos favoráveis à formação de clorato, mais favorável à degradação da lenhina e simultaneamente sem geração de demasiada matéria orgânica clorada (Suess, 2010). Recomenda-se que o pH no primeiro estágio de dióxido (D_0) termine com um valor entre 2,5 e 3, de modo a que todo o cloro ativo (i.e., dióxido de cloro, clorito, ácido hipocloroso e cloro) seja consumido (Kolar et al., 1983; Suess, 2010).

A principal vantagem do branqueamento com dióxido de cloro é, sem dúvida, a sua elevada seletividade. Tem sido demonstrado que a seletividade do estágio de dióxido de cloro, quando

aplicado à pasta crua, é independente do índice kappa ou da viscosidade da pasta à entrada do estágio D₀. No entanto, se for usada uma primeira etapa de deslenhificação com oxigênio, as espécies químicas reagentes geradas neste estágio competem com o mesmo tipo de estruturas da lenhina que o dióxido de cloro (Gierer, 1986). Consequentemente, a lenhina residual após um estágio de oxigênio é mais resistente ao dióxido de cloro quando comparada com a lenhina residual de pasta *kraft* crua. Barroca e colaboradores demonstraram que, a maior degradação dos polissacarídeos durante uma sequência OD (estágio de oxigênio seguido de um estágio com dióxido de cloro) não pode ser atribuída apenas à ação do oxigênio (Barroca et al., 2001).

Relativamente aos extratáveis que resistiram ao cozimento, estes são oxidados pelo dióxido de cloro. Os produtos da reação compreendem uma mistura de produtos de oxidação que contêm grupos hidroxilo, carboxilo ou carbonilo que são mais hidrofílicos do que os compostos originais e, são facilmente removidos em posteriores lavagens ou em extrações alcalina (Gierer, 1986).

A perda de viscosidade em branqueamentos com dióxido de cloro é insignificante se as condições foram moderadas, podendo ocorrer uma maior degradação dos polissacarídeos em condições mais agressivas (pH 2, temperaturas superiores a 80°C e concentração de ClO₂ elevada) (Bajpai, 2012). Esta degradação dos polissacarídeos por parte do dióxido de cloro aos polissacarídeos tem como alvo preferencial os aldeídos dos grupos terminais redutores, oxidando-os a grupos carboxilo. Também os carbonos na posição C-2 e C-3 do anel sofrem oxidação (Lemeune et al., 2004). As estruturas contendo os grupos carbonilos formados podem provocar a hidrólise dos polissacarídeos durante a extração alcalina subsequente (Gierer, 1986), diminuindo o seu grau de polimerização.

Além disso, o dióxido de cloro reage com os ácidos hexenúricos presentes nas xilanas de forma indireta, através dos compostos secundários cloro e ácido cloroso, o que conduz à formação de ácidos dicarboxílicos clorados e não clorados (Figura 16) (Daniel et al., 2003). Os ácidos dicarboxílicos são formados principalmente quando o branqueamento decorre a pH ~2,5, o que acontece no estágio D₀ (Azevedo, 2011).

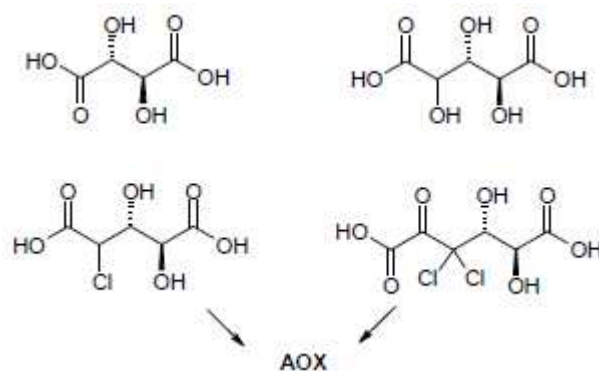


Figura 16. Produtos da reação entre o dióxido de cloro e os HexA (adaptado de Carvalho, 1999).

4.3. EXTRAÇÃO ALCALINA

A oxidação de estruturas cromóforas com dióxido de cloro produz uma grande quantidade de compostos oxidados que devem ser removidos para reativar a lenhina residual para posterior oxidação e reduzir a quantidade de oxidantes nos estágios subsequentes. Os cromóforos oxidados de baixo peso molecular são facilmente solúveis em água, de modo que uma simples lavagem remove estes compostos. No entanto, a baixa solubilidade em condições ácidas dos compostos com peso molecular superior, não permite a sua dissolução, aumentando a sua solubilidade em condições alcalinas. Desta forma, a oxidação electrofílica é normalmente seguida por uma extração alcalina (notação E), geralmente com hidróxido de sódio (Gierer, 1986; Suess, 2010; Bajpai, 2012).

O pH é uma variável importante num estágio de extração alcalina, uma vez que determina a quantidade de compostos dissolvidos e está relacionado com a carga de hidróxido de sódio aplicada. Devido ao efeito tampão que ocorre no sistema, são improváveis variações bruscas de pH, tornando suficiente o controlo do processo através do pH final. Estudos indicam que o pH final não deve ser inferior a 10,5 devendo o estágio terminar a valores próximos deste (Suess, 2010).

A carga de hidróxido de sódio aplicada está relacionada com o índice kappa inicial e com a carga de dióxido de cloro aplicada no estágio D_0 pois determina a quantidade de compostos a serem solubilizados. A carga de dióxido de cloro a aplicar, de modo a atingir determinado grau de brancura no fim deste estágio, é possível ser reduzida através do reforço da extração alcalina com a adição de outros reagentes de branqueamento (Biermann, 1996). Os mais utilizados são o oxigénio e o peróxido de hidrogénio. Nos ensaios realizados neste trabalho, a extração alcalina foi reforçada com peróxido de hidrogénio.

Em condições alcalinas, o peróxido de hidrogénio está em equilíbrio com o anião hidroperóxido, o composto ativo nas reações de branqueamento (Eq.14).



O anião hidroperóxido atua como um nucleófilo – elimina as cadeias laterais da lenhina e reage com as estruturas quinonas (Figura 17). Os compostos oxidados resultantes, nomeadamente ácidos carboxílicos, são mais hidrofílicos e solúveis, facilitando a extração.

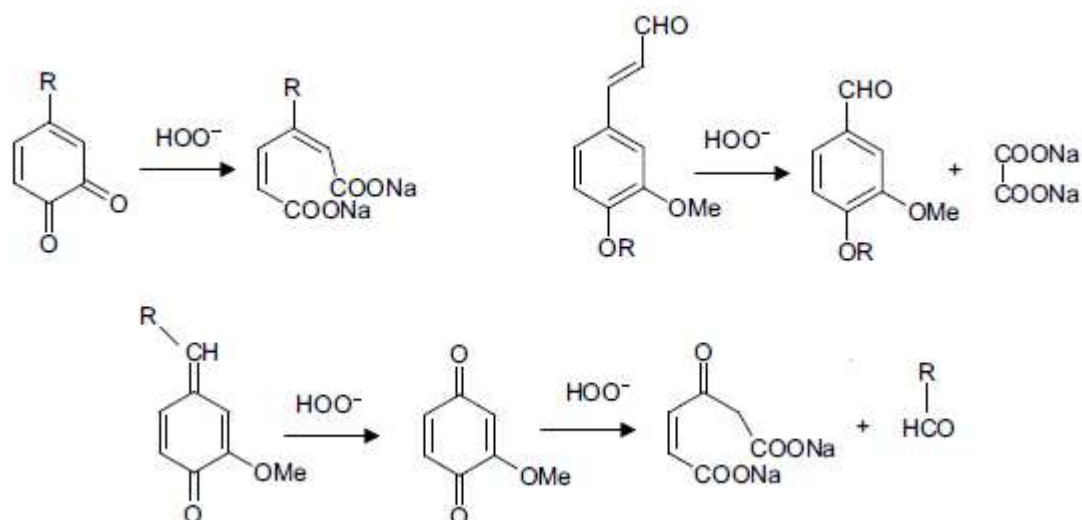
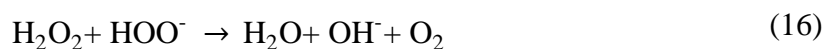


Figura 17. Possíveis reações do peróxido de hidrogénio com a lenhina, em condições alcalinas (adaptado de Suess, 2010).

Simultaneamente às reações com a lenhina, o peróxido de hidrogénio pode decompor-se em água e oxigénio, devido à sua elevada instabilidade (Eq. 15) (Suess, 2010).



As condições de operação influenciam fortemente a decomposição do peróxido de hidrogénio. A pH muito alcalino ($\text{pH} > 11,6$), o peróxido reage com o anião hidroperóxido, tal como se demonstra na Eq. (16) (Schwanninger, 2006).



A temperaturas elevadas ($> 110^\circ\text{C}$) dá-se a clivagem homolítica em radicais hidroxilo (Eq.17). O impacto da formação de radicais na qualidade da pasta é significativo e conduz à diminuição da viscosidade (Suess, 2010).



Além destas reações, que diminuem a quantidade de peróxido disponível no processo de branqueamento, a decomposição do peróxido de hidrogénio é acelerada por metais de transição como o cobre, ferro, manganês. É comum a aplicação de um estágio quelante prévio para desativar a atividade catalítica dos metais. As condições acídicas de um estágio D_0 permitem a remoção da maior parte destes metais pelo que a sua presença residual não é muito problemática numa sequência ECF.

4.4. ESTABILIDADE DA BRANCURA

A estabilidade da brancura das pastas totalmente branqueadas pode ser seriamente afetada ao longo da secção de secagem e, para pastas para mercado, durante o transporte e armazenamento

dos fardos, para além do natural envelhecimento ao longo do tempo (Sêco, 2006). Este fenómeno é conhecido como reversão da brancura e a extensão em que afeta a brancura é dependente da estrutura química da pasta e da interação de fatores externos como a temperatura, humidade, ou até mesmo a luz (Sêco et al., 2008) com as estruturas cromóforas provenientes da lenhina, de estruturas de polissacarídeos oxidadas, dos ácidos hexenurónicos, de metais ou dos extratáveis (Maltha et al., 2011; Loureiro, 2012).

A reversão da brancura é analisada através da comparação entre a brancura da pasta e a brancura da pasta após um processo de reversão artificial. Existem vários métodos para investigar a reversão, entre os quais se pode destacar o método de reversão húmido-térmico que é efetuado a uma temperatura de 100°C e humidade de 100% (Suess, 2010). Este método é considerado o mais fiável para medir e prever a estabilidade de pastas kraft pois as condições reais a que a pasta está sujeita na secção de secagem, transporte e armazenamento de fardos correspondem a temperatura e humidade elevadas (Liitiä & Tamminen, 2007; Loureiro, 2012).

As incertezas em relação às causas da reversão da brancura por parte dos investigadores devem-se à pequena quantidade de cromóforos em pastas totalmente branqueadas, dificultando a sua acessibilidade e análise (Loureiro, 2012). Como referido anteriormente, os ácidos hexenurónicos presentes nas xilanas têm sido apontados como um dos principais responsáveis pela reversão da brancura (El-Sakhawy, 2005; Eiras et al., 2008), sendo a aplicação de xilanases antes do branqueamento favorável à sua remoção, diminuindo conseqüentemente a reversão da brancura (Bajpai, 2014). Contudo, este efeito dos HexA na reversão de brancura não recebe a concordância de outros estudos (Liitiä & Tamminen, 2007; Eiras et al., 2008; Loureiro et al., 2010). De facto, a introdução de um estágio final com peróxido de hidrogénio no branqueamento em substituição do típico dióxido de cloro, em seqüências ECF, melhora a estabilidade da brancura em pastas *kraft* de eucalipto totalmente branqueadas, apesar da maior quantidade de ácidos hexenurónicos. Neste contexto, foi também demonstrado que o histórico de branqueamento e especialmente o estágio final tem grande influência na estabilidade da brancura (Eiras et al., 2008; Loureiro et al., 2010). Este facto pode ser explicado pela facilidade que o peróxido de hidrogénio elimina as estruturas quinonas, enquanto o dióxido de cloro provoca a sua formação (Suess, 2010).

Apesar de neste trabalho não ser usada uma seqüência de branqueamento completa para atingir brancuras equivalentes a pastas de mercado, os aspetos da brancura e sua estabilidade foram considerados nas pastas produzidas segundo a seqüência XDE. Do ponto de vista tecnológico a eficiência da ação de xilanases foi também avaliada recorrendo à determinação do índice kappa enquanto ao nível económico e ambiental, foi determinada a poupança de reagente clorado por comparação com a seqüência DE para igual nível de brancura atingida.

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A metodologia experimental utilizada nos branqueamentos das pastas é descrita nesta secção, bem como as condições experimentais utilizadas e os métodos de caracterização das pastas, das soluções de reagentes e dos filtrados.

5.1. BRANQUEAMENTOS

Nos ensaios realizados foram utilizadas cinco pastas *kraft* de *E. globulus* (designadas por pasta 1, 2, 3, 4 e 5), cedidas por diferentes unidades industriais portuguesas e recolhidas imediatamente antes ou após a torre de armazenamento de pasta crua (consoante as disponibilidades fabris), exceto para a pasta 5 que foi recolhida após o estágio de pré-deslenhificação com oxigénio. As pastas foram lavadas em laboratório, com água destilada, para aumentar a sua estabilidade no tempo. Foram depois armazenadas a 4°C sem exposição à luz.

Sendo o objetivo deste trabalho aplicar um estágio enzimático logo no início da sequência de branqueamento de forma a reduzir o consumo total de ClO_2 , fez-se um levantamento das condições operatórias nas torres de armazenamento de pasta crua, conforme esquematizado na Figura I (Anexo I). Na transposição para a escala industrial, estas torres poderiam ser usadas como estágio X sem necessidade de investimento em equipamentos desta natureza.

Foram utilizadas duas soluções enzimáticas sob a forma de suspensões líquidas, fornecidas pela Novozymes®: uma xilanase comercial que será designada doravante por X1; uma xilanase experimental que será designada doravante por X2. O primeiro passo teve como objetivo identificar as condições onde a xilanase X1 apresentava maior atividade, através da realização de estágios enzimáticos preliminares e análise da absorvância do filtrado residual por espectrofotometria UV/visível. Os resultados destas análises permitiram identificar as condições de temperatura e pH com maior potencial para aplicação no estágio X e avançar para sequências de branqueamento XDE na pasta 1, onde se avaliou uma gama alargada de condições. De seguida, conhecendo a gama das condições operatórias das torres de armazenamento de cada uma das unidades industriais de onde foram recolhidas as pastas, foram selecionadas as condições com maior interesse industrial para efetuar os branqueamentos com sequências XDE. Simultaneamente, foram efetuados ensaios com as pastas originais em sequências DE para efeitos de comparação com as sequências XDE e avaliação das poupanças em dióxido de cloro. Estas pastas foram posteriormente caracterizadas tal como se indica na Figura 18.

Com a xilanase experimental X2 foi possível, dentro do tempo disponível, efetuar apenas alguns ensaios com sequências XDE nas pastas 1 (crua) e 5 (pré-deslenhificada com oxigénio)

para comparação do efeito de *bleach boosting* com a xilanase X1, uma vez que a xilanase X2 revelou ser mais resistente a condições agressivas como as existentes nalgumas das torres de armazenamento fabris.

Todos os ensaios de branqueamento foram efetuados a 10% de consistência, sendo a pasta e os reagentes de cada estágio colocados em sacos de polietileno, fechados, homogeneizados à mão e imersos num banho (vai-vém) com controlo de temperatura e agitação durante o tempo estipulado. Após cada estágio foram recolhidos os filtrados, a pasta lavada com água destilada e colocada novamente em sacos de polietileno para prosseguir na sequência de branqueamento, ou, por fim, armazenada no frigorífico para posterior caracterização. Os procedimentos experimentais dos estágios X, D e E_P são semelhantes e encontram-se descritos de forma mais pormenorizada no Anexo II.2, e no Anexo II.1 descreve-se a preparação dos ensaios, incluindo a preparação de soluções, determinação das concentrações dos reagentes químicos e das massas a pesar.

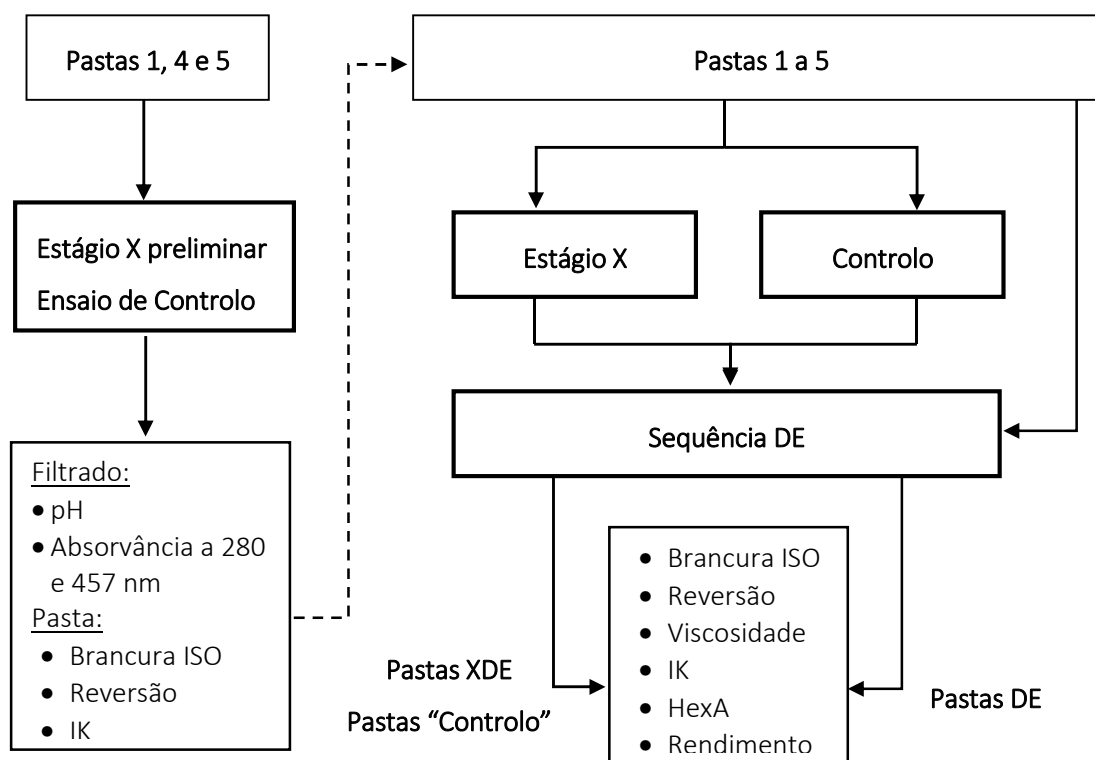


Figura 18. Metodologia experimental utilizada para a xilanase X1.

5.1.1. TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS PRELIMINARES

Os tratamentos enzimáticos preliminares foram efetuados apenas para a xilanase X1 e com a pasta 1 de forma a minimizar o número de ensaios e com o objetivo de avaliar a ação enzimática numa gama alargada de condições. Para tal, foram efetuados ensaios onde se estudou a variação da temperatura e pH, com carga enzimática e tempo fixos (Tabela 5). A carga enzimática e o tempo utilizados foram sugeridos pela *Novozymes*® para ensaios laboratoriais. O resultado da ação

enzimática sobre as pastas foi avaliado a partir da medição da absorvância do filtrado residual, a 280 e 457 nm. A absorção a 280 nm é atribuída à presença de unidades de fenilpropano que constituem a lenhina (quanto maior a absorvância a 280 nm, maior a libertação de lenhina provocada pelo tratamento enzimático). A absorvância a 457 nm indica a quantidade de material colorido (cromóforos) no filtrado que absorve na zona do azul e emite radiação visível na zona do amarelo (Fengel & Wegener, 1989; Silveira & Milagres, 2009 ; Li, 2011). O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro ScanSpec da Scansci. Em todos os tratamentos enzimáticos o pH do residual foi registado.

Tabela 5. Condições utilizadas nos estágios X preliminares.

Xilanase	Pasta	Dosagem (mL/tAD)*	Tempo (min)	T (°C)	pH
X1	Pasta 1	200	30	70; 75; 80	7; 8; 8,5

*mL de solução enzimática (tal qual como é fornecida) por tonelada de pasta “seca ao ar” (AD – *air dry*, correspondente a uma pasta com teor de humidade de 10 %).

5.1.2. SEQUÊNCIA XDE APLICADA ÀS PASTAS 1 A 5

A partir dos resultados obtidos com os ensaios preliminares, e conhecidas as condições fabris das torres de armazenamento foram selecionadas as gamas de temperatura e de pH a utilizar no estágio X com a xilanase X1, para cada uma das pastas. A temperatura e o pH utilizados nos ensaios com a xilanase X2 foram determinados em função das condições usadas com a xilanase X1, para comparação entre si, e das condições fabris. O tempo e a dose enzimática foram sugeridos pela *Novozymes*®.

A carga de dióxido de cloro utilizada teve em conta o índice kappa (IK) da pasta de origem (expressa como % em pasta ou kg reagente/100 kg de pasta, em base seca). É comum exprimir a massa de dióxido de cloro em cloro ativo, multiplicando pelo fator 2,63, cuja demonstração se encontra no Anexo II.1.4. Numa sequência típica laboratorial DEDED para eucalipto nacional é vulgar usar a seguinte regra geral: $0,27 * IK =$ carga total de dióxido de cloro na linha de branqueamento (como cloro ativo), a qual costuma ser repartida pelos três estágios D na forma 65% no D₀, 25% no D₁ e 10% no D₂. Como tal, no estágio D₀ usou-se aproximadamente 65% da carga total. O pH do filtrado após o estágio D₀ foi determinado para verificar se se encontrava próximo de 2,5, assim como a concentração residual de dióxido de cloro (Anexo II.3.1).

Relativamente às cargas de NaOH e H₂O₂ foram definidas com base em valores típicos da indústria (Sêco, 2006). O pH do filtrado após o estágio E_P foi também determinado para verificar se se encontrava acima de 10,5, assim como a concentração residual de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio (Anexos II.3.2. e II.3.3). O tempo e a temperatura da sequência DE foram

determinados em função das condições utilizadas à escala industrial (Suess, 2010; Carvalho, 1999). As condições usadas nestes estágios encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Foram também efetuados ensaios tratados nas mesmas condições que os descritos mas sem a adição de enzima (denominados por controlo) para conhecer a ação exclusiva da xilanase, subtraindo o efeito do pH e da temperatura.

Tabela 6. Condições utilizadas nos estágios XD₀EP.

Xilanase	Pasta	Dosagem (mL/tAD)	Estágio X*		Estágio D ₀ **	Estágio EP ***	
			T (°C)	pH	Cl ₂ ativo (%) ^(a)	NaOH (%) ^(a)	H ₂ O ₂ (%) ^(a)
X1	Pasta 1	200	60; 70; 75; 80	7; 8; 8,5	2,2	1,4	0,3
	Pasta 2	200	60; 70	7; 8,5	2,2; 2,5	1,2	0,3
	Pasta 3	200	70	7; 8; 8,5	2,5	1,2	0,3
	Pasta 4	200	70	7	2,5	1,2	0,3
	Pasta 5	200	70; 80; 85	7; 8	1,8	1,2	0,3
X2	Pasta 1	900; 1530	70; 75	7; 8,5; 9	2,2	1,4	0,3
	Pasta 5	900	85	9	1,8	1,2	0,3

*tempo = 30 min ; **tempo = 30 min, T = 60°C ; ***tempo = 80 min, T = 70°C.

(a) Carga – massa de reagente químico por massa de pasta seca, em percentagem.

5.1.3. SEQUÊNCIA DE APLICADA ÀS PASTAS 1 A 5

Os procedimentos experimentais dos estágios DE são semelhantes aos indicados anteriormente, assim como a determinação das condições para o estágio EP. No estágio D fez-se variar a carga de ClO₂ (Tabela 7), para avaliar o aumento da carga de dióxido de cloro necessária para se atingir a mesma brancura que com um estágio XDE, podendo deste modo ser desenhada uma “curva de branqueamento”.

Tabela 7. Condições utilizadas nos estágios DE.

Pasta	Estágio D ₀ *	Estágio EP **	
	Cl ₂ ativo (%)	NaOH (%)	H ₂ O ₂ (%)
Pasta 1	2,2 - 3,1	1,4	0,3
Pasta 2	2,2 - 3,7	1,2	0,3
Pasta 3	2,2 - 3,4	1,2	0,3
Pasta 4	2,5 - 3,4	1,2	0,3
Pasta 5	1,8 - 2,5	1,2	0,3

*tempo = 30 min, T = 60°C ; **tempo = 80 min, T = 70°C.

5.2. CARATERIZAÇÃO DAS PASTAS

As pastas semi-branqueadas foram posteriormente caracterizadas, como se indica na Figura 18. As subsecções seguintes apresentam de forma resumida os métodos utilizados.

5.2.1. BRANCURA ISO

A brancura ISO é definida como a refletância da luz visível, quando se faz incidir um feixe de luz azul monocromático, para um comprimento de onda de 457 nm. A sua determinação foi efetuada segundo a norma ISO 2469, num espectrofotómetro L&W Elrepho Modelo SE 070-1, disponível no RAIZ (Eixo, Aveiro), sendo feitas quatro medições de brancura distribuídas por duas folhas de pasta de 200 g/m² de gramagem, produzidas segundo a norma ISO 3688 (Anexo II.4.3).

5.2.2. REVERSÃO DA BRANCURA

Utilizou-se o método térmico-húmido como método de envelhecimento acelerado, no qual as folhas de pasta são dispostas numa grelha no interior de uma câmara durante uma hora, a uma temperatura de 100°C e 100% de humidade, conforme o procedimento TAPPI 260. Após este período de tempo as folhas secam numa câmara ventilada durante mais uma hora, até às condições da sala condicionada (23 ± 1°C, 50 ± 2% de humidade), sendo depois prensadas. Por fim determina-se novamente a brancura ISO, como descrito na secção 5.2.1.

Os resultados da reversão foram avaliados através do *Post Color number* (PC number), determinado pela diferença de k/s antes e após o envelhecimento (k é o coeficiente de absorção específica e s é o coeficiente de dispersão específico):

$$PC\ number = 100 \times \left\{ \left(\frac{k}{s}_{\text{após reversão}} - \frac{k}{s}_{\text{antes reversão}} \right) \right\} \quad (18)$$

k/s, segundo a teoria de Kubelka-Munk é dado por:

$$\frac{k}{s} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 \times R_{\infty}} \quad (19)$$

onde R_{∞} é o fator de refletância intrínseco ($\lambda = 457$ nm) de um macete de folhas suficientemente espesso para ser opaco. Este procedimento foi efetuado nas instalações do RAIZ.

5.2.3. ÍNDICE KAPPA

Os primeiros estágios de branqueamento são considerados etapas de deslenhificação, sendo importante acompanhar a evolução da quantidade de lenhina residual, traduzida como índice

kappa. A lenhina é suscetível de sofrer oxidação por vários agentes de oxidação. Segundo a norma NP 9186 utiliza-se o permanganato de potássio (KMnO_4), em condições ácidas, como agente oxidante. O consumo de permanganato depende da temperatura, do tempo, da concentração inicial e final de permanganato, sendo que as condições do ensaio têm de ser bem definidas de modo a gastar-se cerca de 50% da quantidade de permanganato inicial. Desta forma, o índice kappa é definido como os mL de uma solução de KMnO_4 (0,1 N) consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas (25°C, 10 min), sendo o resultado corrigido para um consumo de 50%. Neste estudo, como o teor de lenhina residual é baixo denomina-se este parâmetro como índice micro-kappa. No Anexo II.4.1 encontra-se a descrição detalhada do procedimento experimental.

5.2.4. VISCOSIDADE

A viscosidade intrínseca é um parâmetro importante na caracterização das pastas que está relacionado com o grau de polimerização dos polissacarídeos. É determinado em conformidade com a norma ISO 5351, segundo a qual se compara o tempo de escoamento de um determinado volume de solução de pasta celulósica, num viscosímetro capilar, com o tempo de escoamento do solvente puro. Utiliza-se a Cuprietenodiamina (CED) como solvente, que é um complexo de cobre e amina e um dos mais poderosos solventes capazes de solubilizar a celulose, que devido ao seu elevado peso molecular e propriedades estruturais é praticamente insolúvel na maioria dos solventes. A viscosidade varia com a concentração da solução, devendo ser determinada no limite quando a concentração tende para zero (em que a interação entre as moléculas do soluto é desprezável). Assim, o resultado é apresentado em mL/g:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{\text{rel}} - 1}{C} \right) \quad (20)$$

onde C é a concentração do soluto em g/mL, $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0$, sendo η e η_0 a viscosidade da solução e do solvente, respetivamente. 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:

$$\eta_{\text{rel}} - 1 = [\eta] C e^{k'[\eta]C} \quad (21)$$

onde k' é uma constante empírica que toma o valor 0,30 para o sistema celulose-CED. A descrição detalhada do procedimento para a determinação da viscosidade encontra-se descrito no Anexo II.4.2.

5.2.5. ÁCIDOS HEXENURÓNICOS

A quantificação dos ácidos hexenurónicos é baseada na sua hidrólise com uma solução de cloreto de mercúrio e acetato de sódio, combinada com espectrofotometria U.V do hidrolisado, sendo a sua concentração determinada a partir da Eq. 22.

$$C_{\text{HexA}}(\text{mmol/kg}) = \frac{0,287 \times (A_{260} - 1,2 \times A_{290}) \times V_{\text{hidrolisado}}}{m_{\text{pasta seca}}} \quad (22)$$

onde A_{260} e A_{290} é a absorvância a 260 e 290 nm, respetivamente. A descrição detalhada deste método, que foi adaptado por Pedroso e Carvalho (2003) para pastas de eucalipto, encontra-se no Anexo II.4.4.

6. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O desempenho da aplicação de xilanases foi avaliado em pastas cruas *kraft* de Eucalipto recolhidas em diferentes fábricas nacionais que utilizam condições operatórias ou equipamentos distintos, conferindo características químicas específicas às pastas. Este capítulo inicia-se por uma caracterização básica das pastas recolhidas, seguindo-se a apresentação dos resultados do seu branqueamento com a sequência DE (obtendo-se pastas DE). A mesma sequência foi usada após a aplicação do estágio X (obtendo-se pastas XDE) ou após o estágio de controlo (sem enzima). Por comparação com as pastas DE, foi assim possível avaliar o ganho de brancura e respetivo potencial de poupança de reagentes pela aplicação do estágio enzimático em pastas cruas. Foi também usada neste estudo uma pasta pré-deslenhificada com oxigénio.

6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PASTAS ORIGINAIS

A Tabela 8 apresenta as características iniciais das diferentes pastas estudadas.

Tabela 8. Caracterização das pastas originais utilizadas.

Pasta	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)
Pasta 1*	12,7	1333	39,7	42,4
Pasta 2*	14,9	1213	35,8	37,7
Pasta 3*	14,6	1203	31,8	34,1
Pasta 4*	16,4	1339	35,9	37,6
Pasta 5**	9,2	1027	65,0	61,8

*pasta crua; ** pasta deslenhificada com oxigénio (O-O).

Na Tabela 8 é possível observar a diversidade nas características entre pastas de eucalipto, provenientes do mesmo tipo de cozimento (*kraft*) em diferentes unidades fabris. A variabilidade nas condições de cozimento, dos equipamentos utilizados, da própria matéria-prima e os objetivos de cada unidade industrial, conferem diferentes características às pastas e conduzem a diferentes graus de deslenhificação (índices kappa, IK, distintos). Por exemplo, as pastas 2 e 3 exibem um IK semelhante, na ordem de 15, e viscosidades idênticas, mas com coloração diferente (transcrita no valor da brancura ISO), apesar de terem sido lavadas em laboratório. Estes resultados poderão indicar que as condições de cozimento na unidade industrial levam à produção de maior número de cromóforos durante o cozimento. A pasta 4 exibiu um IK de 16, o que indica menor extensão do cozimento (menor remoção de lenhina) e consecutivamente menor ataque aos polissacarídeos (com viscosidade 100 pontos superior às pastas 2 e 3) apresentando, no entanto, o mesmo grau de brancura que a pasta 2, mais deslenhificada. É interessante verificar que a pasta 1, que apresenta o

menor IK (de entre as pastas cruas) e por conseguinte a maior brancura, atinge uma viscosidade superior à das pastas 2 e 3, o que indica, aparentemente, uma maior seletividade do cozimento na unidade industrial. Para uma avaliação mais rigorosa e completa, seria necessário determinar a composição da pasta (celulose e hemiceluloses) e avaliar se uma diminuição do teor em hemiceluloses poderia justificar o maior valor de viscosidade, por serem os polissacarídeos de menor peso molecular. Relativamente à pasta deslenhificada com oxigénio (pasta 5), era espectável a diminuição do IK diminui e o aumento de brancura, com prejuízo na viscosidade devido ao maior ataque dos polissacarídeos pelo oxigénio, que é um reagente de branqueamento pouco seletivo (Gierer, 1985).

A brancura após reversão foi também determinada nas pastas originais (Tabela 8). Ao contrário do que sucede nas pastas brancas, nas pastas 1, 2, 3 e 4, a brancura após o processo de envelhecimento revelou ser superior à brancura inicial, devido ao facto das pastas cruas conterem grande quantidade de cromóforos que, com a exposição à temperatura e humidade elevadas são parcialmente removidos. Já no caso da pasta 5, com um nível mais elevado de brancura, a diminuição desta com o envelhecimento é um resultado esperado.

6.2. PASTAS DE

De forma a traçar curvas de branqueamento e poder avaliar a poupança de reagentes, quando se usa um pré-tratamento enzimático (sequências XDE apresentadas na secção 6.3) foram efetuados branqueamentos com sequências DE nas pastas originais. Estes ensaios permitem também comparar o desempenho e branqueabilidade das diferentes pastas estudadas. Há que ter em conta que a pasta 5 é pré-deslenhificada com oxigénio, sendo necessária uma análise distinta das restantes pastas que são cruas, e que na pasta 1 foi utilizada uma carga de NaOH no estágio E_p 0,2% superior às restantes.

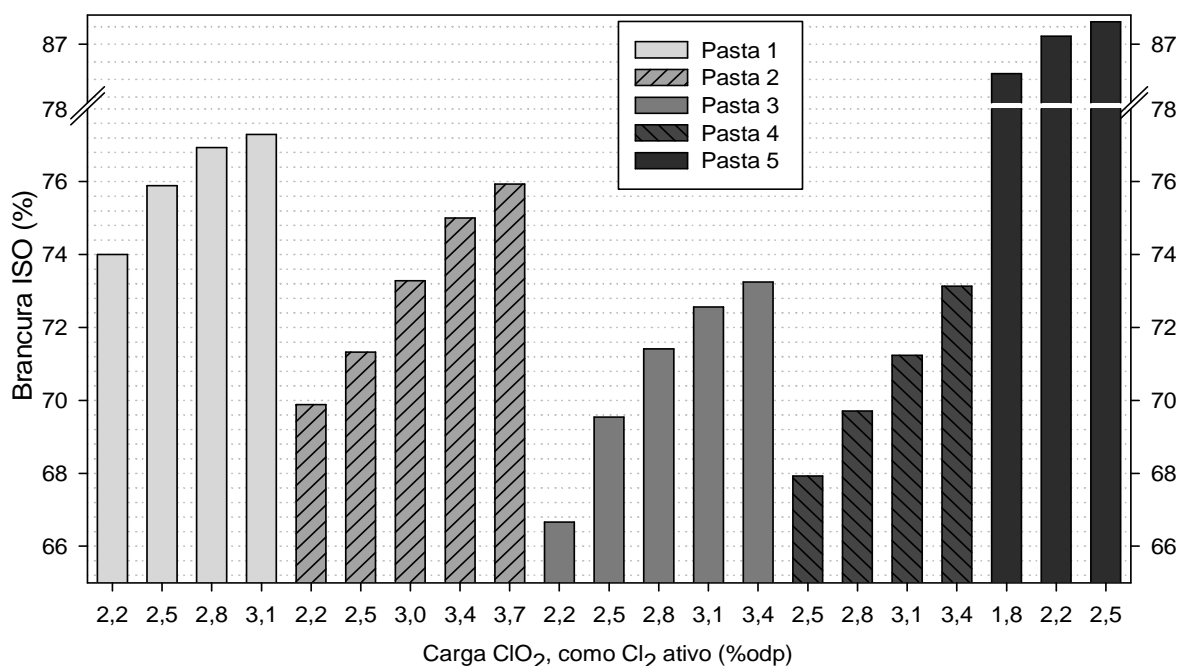


Figura 19. Desenvolvimento da brancura em pastas branqueadas com sequências DE, em função da carga de ClO₂.

A Figura 19 mostra a resposta ao branqueamento de pastas *kraft* oriundas de fábricas distintas, em termos de desenvolvimento da brancura em função da carga de dióxido de cloro. A brancura atingida para a pasta 1 é superior pois exibiu um IK inicial menor (~13). No extremo oposto, encontra-se o desenvolvimento da brancura da pasta 4 como consequência do maior IK. É evidente também que o ganho de brancura por unidade de reagente aplicado varia primeiro linearmente à medida que aumenta a carga de ClO₂, e depois vai diminuindo (a curva de branqueamento tende para um patamar, mais evidente no caso das pastas 1, 3 e 5 – Figura 20), sendo este um dos motivos que justificam o branqueamento multi-estágios (Suess, 2010).

A branqueabilidade pode ser definida como a facilidade da pasta ser branqueada (Carvalho, 1999) e foi determinada através da divisão entre a carga de ClO₂ (como Cl₂ ativo) pelo IK inicial e representada em função do ganho de brancura atingido, permitindo assim efetuar estudos comparativos independentemente do grau de deslenhificação e da brancura da pasta original (Figura 20). As diferenças observadas estão relacionadas com a própria variabilidade da matéria-prima, com as modificações que ocorrem na lenhina durante o cozimento, e com a composição de polissacarídeos, nomeadamente no teor de ácidos hexenurónicos, hemiceluloses e LCCs (Daniel, 2003). Os extratáveis lipofílicos também consomem dióxido de cloro afetando a branqueabilidade (Neto et al., 2002). A lenhina reprecipitada na superfície das fibras também pode estar relacionada com problemas de branqueabilidade (Baptista, 2006). A diferenças específicas do processo *kraft* em cada unidade industrial apresentam grande influência na branqueabilidade, como por exemplo

entre pastas produzidas por processos modificados, aditivados ou pelo processo convencional (Colodette et al., 1999).

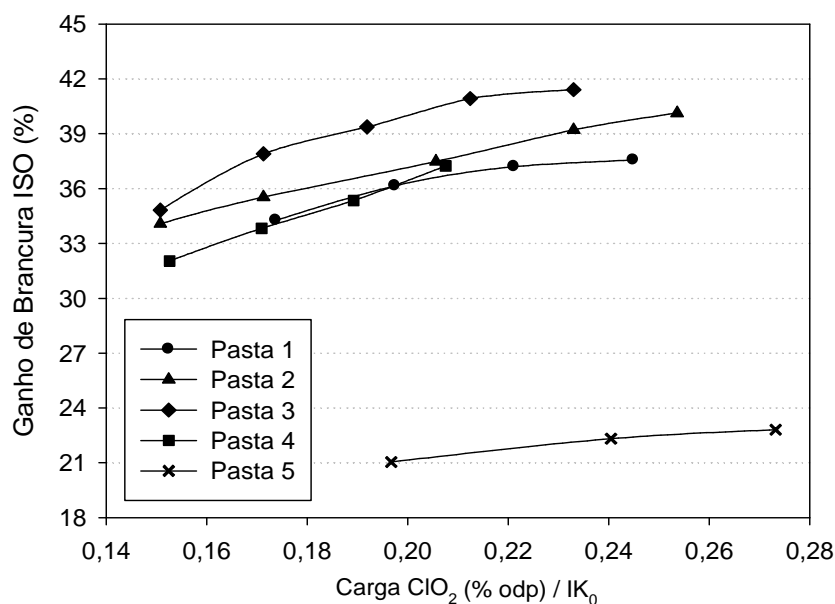


Figura 20. Branqueabilidade (ganho de brancura vs % ClO₂ / IK inicial) das pastas estudadas.

As pastas 3 e 2 (com IK ~14,5 a 15) são as que exibem maior branqueabilidade, enquanto a pasta crua mais deslenhificada (pasta 1, IK ~12,5) e a pasta crua menos deslenhificada (pasta 4, IK ~16) são as que exibem menor branqueabilidade, indiciando um valor óptimo de IK com que se deve terminar o processo de cozimento da madeira de eucalipto nacional (IK ~14,5 a 15). No caso da pasta 1, por comparação com as pastas 2 e 3, para se obter o mesmo ganho de brancura, a quantidade relativa de oxidante requerido por unidade de IK aumenta, diminuindo a branqueabilidade, o que demonstra que as estruturas oxidáveis pelo ClO₂ (que contribuem para o IK) tornam-se menos reativas em função da diminuição do seu conteúdo na pasta. Este comportamento está relacionado com o aumento do grau de condensação e a diminuição de estruturas β-O-4 na lenhina residual (Neto et al., 2002).

Relativamente à pasta 5, a aplicação de um estágio de pré-deslenhificação com oxigénio aumenta significativamente a brancura da pasta (Tabela 8). Contudo, o ganho de brancura após aplicação de dióxido de cloro não é tão elevado como quando aplicado em pastas cruas (Figura 20). Esta menor capacidade de branqueamento pode ser explicada pelo facto da quantidade de lenhina disponível ser inferior, e porque a lenhina torna-se mais resistente ao ataque por agentes eletrofilicos após a aplicação de um estágio de oxigénio (Gierer, 1986). De facto, o oxigénio reage principalmente com os grupos fenólicos livres da lenhina, restando, por isso, poucos sítios ativos para o estágio subsequente com dióxido de cloro. Por este motivo, o branqueamento com dióxido de cloro é menos eficiente que em pastas cruas (Dence & Reeve, 1996).

A evolução do teor de lenhina residual na pasta, tal como se pode observar na Figura 21, apresenta um comportamento inverso ao observado na brancura, tal como esperado, diminuindo o IK com o aumento da carga de ClO_2 aplicada. As pastas 1 e 5 apresentam uma diminuição menos acentuada do IK devido ao menor teor de lenhina inicial presente. A posição relativa das pastas traduzidas nas curvas da evolução do IK não segue a mesma ordem que a evolução da brancura. A pasta 3, com uma carga de ClO_2 de 3,1% (como Cl_2 ativo) atinge um IK próximo ao da pasta 1, apesar da brancura ser 4,6 % ISO inferior (Figura 19), o que indica que os compostos que dão cor à pasta (cromóforos) não estão diretamente traduzidos pelo valor de IK.

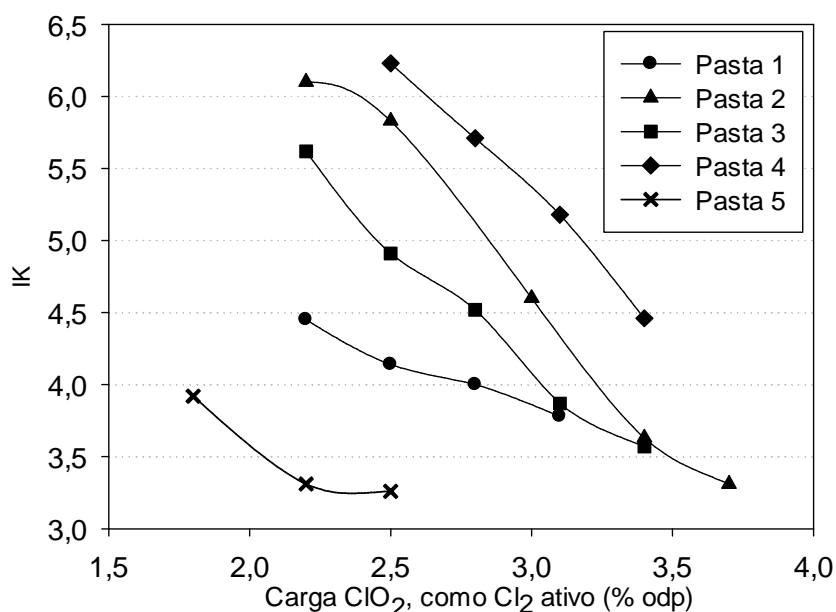


Figura 21. Evolução do IK em função da carga de ClO_2 , após uma sequência de branqueamento DE.

A Tabela 9 mostra a razão entre o ganho de brancura e a redução correspondente do IK para as várias pastas estudadas.

Tabela 9. Ganho de brancura e a redução correspondente do IK para as várias pastas estudadas.

Carga ClO_2 (% odp)*	$\Delta\text{Brancura}/\Delta\text{IK}$				
	Pasta 1 $\text{IK}_0=12,7$	Pasta 2 $\text{IK}_0=14,9$	Pasta 3 $\text{IK}_0=14,6$	Pasta 4 $\text{IK}_0=16,4$	Pasta 5 $\text{IK}_0=9,2$
1,8	-	-	-	-	4,02
2,2	4,17	4,01	3,88	-	3,82
2,5	4,24	4,06	3,92	3,16	3,87
2,8	4,30	-	3,91	3,17	-
3,0	-	3,75	-	-	-
3,1	4,23	-	3,82	3,16	-
3,4	-	3,58	3,76	3,12	-
3,7	-	3,56	-	-	-

*como Cl_2 ativo.

Enquanto a redução de uma unidade de IK corresponde a 3 unidades de ganho de brancura para a pasta 4, já no caso da pasta 1, registou-se um ganho de 4 unidades de brancura por unidade de IK. Nesta pasta, o reagente ClO_2 atua mais intensivamente na reação com os compostos cromóforos (de diferentes origens) do que na remoção dos compostos que contribuem para o IK (principalmente derivados da lenhina, ácidos hexenurónicos).

A evolução do grau de degradação dos polissacarídeos foi avaliada pela alteração na viscosidade intrínseca de soluções de pasta. O processo de branqueamento apenas com dois estágios (DE_P) diminui a viscosidade em relação à original (Tabela 8), em média, mais de 100 pontos, para qualquer uma das pastas estudadas, podendo atingir perdas de mais de 200 pontos, como é o caso da pasta 1. De entre os reagentes utilizados, o dióxido de cloro é conhecido pela sua elevada seletividade. No entanto, a extração alcalina aditivada com peróxido de hidrogénio contribui para a degradação dos polissacarídeos. Apesar de haver uma diferença na viscosidade de ~120 pontos entre as pastas cruas, essas diferenças reduzem-se para ~50 pontos após o branqueamento, sendo este valor próximo da margem de erro experimental (50 pontos).

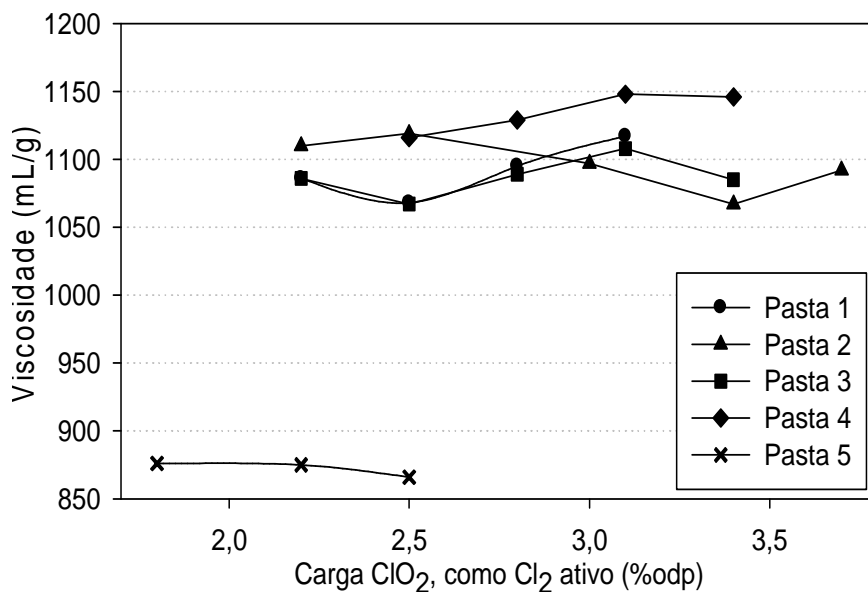


Figura 22. Evolução da viscosidade em função da carga de ClO_2 , após sequência de branqueamento DE.

Avaliando a reversão da brancura nas pastas DE, há uma clara tendência para a diminuição do *PC number* em todas as pastas, sendo que a pasta 5 apresenta o menor *PC number*, seguindo-se a pasta 1, e por fim as pastas 2, 3 e com 4 com *PC number* relativamente semelhantes entre si, o que é intuitivo em função dos resultados já apresentados. Esta diminuição da reversão está relacionada com o aumento da extração de estruturas potenciadoras da reversão, como as quinonas, lenhina, hexenurónicos e outros cromóforos, com o aumento da carga de ClO_2 (Suess, 2010).

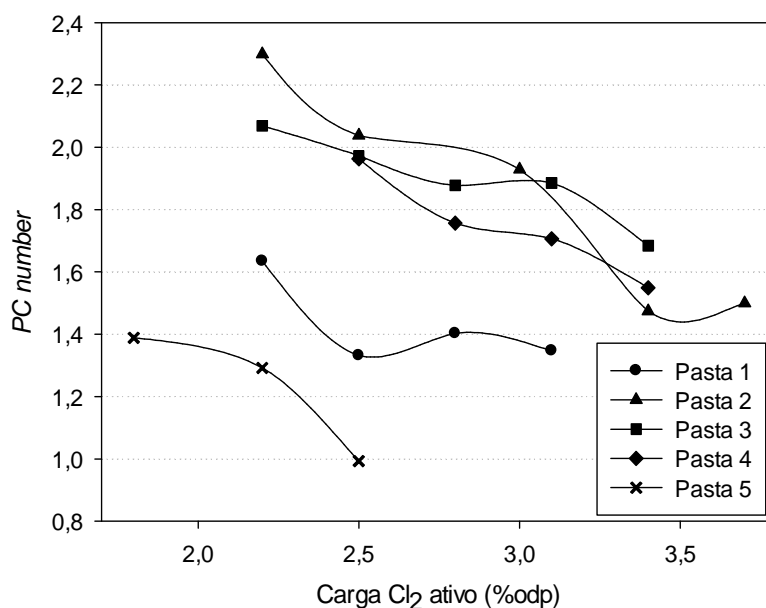


Figura 23. Evolução do *PC number* em função da carga de ClO₂, após sequência de branqueamento DE.

6.3. TRATAMENTO ENZIMÁTICO PRELIMINAR (ESTÁGIO X)

A espectrofotometria UV/visível é uma ferramenta útil para monitorizar, numa primeira fase, o efeito do tratamento enzimático na pasta. Usando um comprimento de onda de 280 nm, esta técnica fornece indicações sobre a remoção de lenhina residual, dissolvida no filtrado, e a 457 nm possibilita ter a noção do material colorido que absorve radiação visível na zona do azul. As Figuras 24 e 25 apresentam os resultados das leituras nos filtrados, recolhidos a partir dos ensaios nas condições indicadas na Tabela 5, a um comprimento de onda de 280 e 457 nm respetivamente.

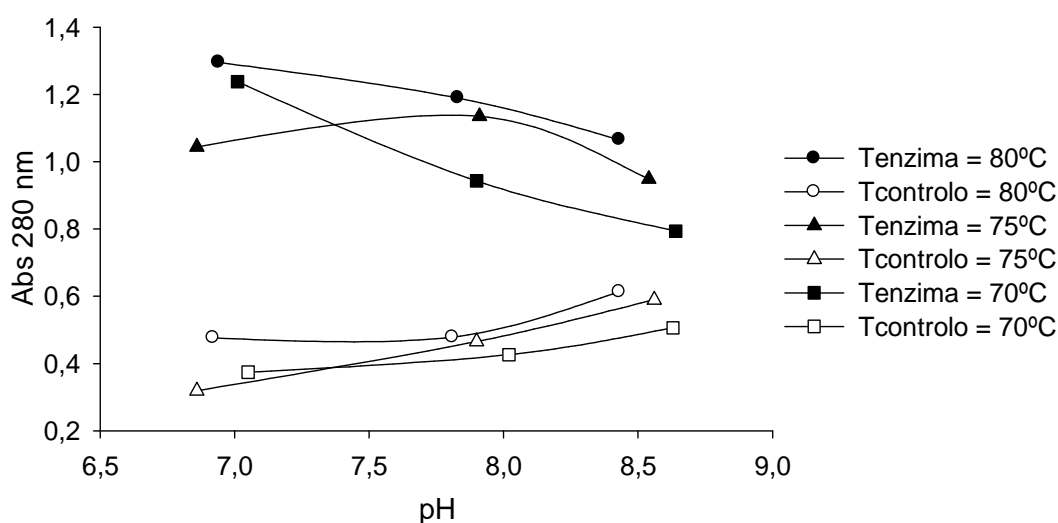


Figura 24. Efeito da temperatura e do pH na remoção de lenhina na pasta 1, avaliado a partir da medição da absorvância a 280 nm.

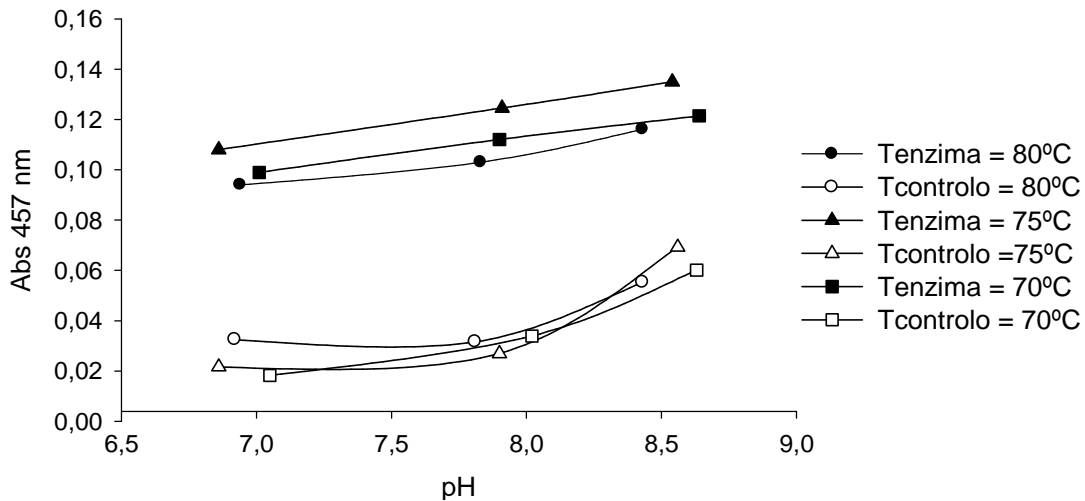


Figura 25. Efeito da temperatura e do pH na remoção de compostos cromóforos na pasta 1, avaliado a partir da medição da absorvância a 457 nm.

O efeito do tratamento enzimático deve ser comparado com o respetivo controlo, uma vez que, mesmo sem a adição de enzima, é visível o aumento da absorvância com o aumento do pH e da temperatura, o que aponta para a remoção de lenhina apenas com a “lavagem” da pasta, principalmente com o aumento do pH. O aumento da absorvância em relação ao controlo após o tratamento enzimático é devido à degradação da xilana, o que resulta na libertação de lenhina (280 nm) e cromóforos (457 nm) das fibras (Figuras 24 e 25), o que é visível em todos os ensaios efetuados. Contudo, com o aumento do pH, observa-se uma diminuição da diferença entre as absorvâncias do ensaio enzimático e do respetivo controlo, o que indica uma diminuição da atividade enzimática e, por sua vez, uma diminuição da remoção da lenhina e cromóforos da pasta. Daqui é possível inferir que a 70°C e pH 7 a enzima apresenta atividade máxima. Apesar de haver uma tendência da absorvância aumentar com o aumento da temperatura, para um valor de pH fixo, a temperatura neste estudo preliminar tem um efeito menos notável comparativamente ao pH: de facto, as diferenças entre as absorvâncias para a mesma temperatura são muito mais pequenas do que as diferenças encontradas entre p.e. pH 8 e pH 8,5.

Resumindo, o efeito do tratamento enzimático é visível em todos os ensaios preliminares efetuados sendo no entanto mais pronunciado a pH e temperaturas mais suaves. Há que notar que os mecanismos de ação das xilanases na pasta são variados (ver secção 4.1) e portanto a remoção de lenhina e cromóforos são apenas uma parte do fenómeno que permite o efeito de *bleach boosting*, sendo necessário aplicar os reagentes de branqueamento para avaliar efetivamente o efeito de atuação da xilanase.

De modo a avaliar o efeito direto da xilanase na brancura, teor de lenhina residual e *PC number* (Tabela 10), numa pasta crua e numa pasta pré-deslenhificada com oxigénio, as pastas 4

e 5 também foram tratadas com um estágio enzimático (Estágio X). Comparando com as pastas originais (Tabela 8), verifica-se um aumento da brancura ~3% ISO. Este aumento é mais diminuto quando se faz a comparação com o ensaio de controlo: o tratamento enzimático aumenta a brancura da pasta em 1,5 e 1,9 % ISO, nos ensaios a 70°C, pH 7 para as pastas 4 e 5, respetivamente. No ensaio a 80°C, pH 8 o aumento é de 1,1% ISO para a pasta 5. O efeito da ação da xilanase também é visível numa ligeira redução do IK da pasta, o que pode ser explicado pela remoção de parte dos ácidos hexenurónicos agregados às xilanas e/ou de complexos lenhina-carbohidratos (LCC) que reduz o teor de lenhina na pasta e os cromóforos associados (Shatalov & Pereira, 2008). Além disso, o *PC number* da pasta tratada com enzima é inferior ao do controlo, devido à remoção de compostos responsáveis pela instabilidade da brancura. Esta característica só foi analisada na pasta 5, uma vez que, tal como apresentado na secção 6.1, nas pastas cruas, o processo de envelhecimento aumenta a sua brancura.

Tabela 10. Brancura ISO (%), IK e *PC number* das pastas 4 e 5 apenas com tratamento enzimático (dosagem X1: 200 mL/tAD).

Pasta	T (°C)	pH	Brancura ISO (%)		IK		<i>PC number</i>	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta 4 crua	-	-	35,4		16,4		-	
Pasta 4	70	7	38,9	37,4	14,59	15,06	-	-
Pasta 5 crua	-	-	65,0		9,2		3,2	
Pasta 5	70	7	67,7	65,8	7,26	7,76	2,8	3,7
	80	8	67,6	66,5	8,13	8,21	2,3	2,9

6.4. PASTAS XDE

O objetivo principal desta dissertação é a avaliação do potencial da aplicação de xilanases em pastas não branqueadas de eucalipto. Para tal foram efetuados branqueamentos com sequências XDE nas cinco pastas estudadas, para avaliar o efeito de *bleach boosting*, variando as condições de temperatura e pH no estágio X de forma a avaliar a sua influência nas características das pastas, em termos de brancura, IK, viscosidade e *PC number* e rendimento. Na pasta 1 a gama de condições estudadas para o estágio X foi mais alargada.

Como referido anteriormente, as enzimas são extremamente sensíveis às condições do meio. A sua aplicação à escala industrial no início da sequência de branqueamento em unidades já existentes é dependente das condições das torres de armazenamento de pasta, onde são incubadas, de modo a evitar demasiadas alterações de pH e temperatura, que acarretam custos acrescidos na produção. Para tal é imprescindível selecionar de forma adequada a xilanase mais indicada às

condições existentes. Neste subcapítulo encontram-se os resultados obtidos com as xilanases X1 e X2, sendo este dividido em função da carga de ClO_2 aplicada no estágio D₀.

6.4.1. XILANASE X1

- Pasta 1 e 2 - Carga de ClO_2 de 2,2 % (como Cl_2 ativo)

Na Figura 26 estão apresentadas as brancuras obtidas com sequências XDE e respectivos controlos, para as pastas 1 e 2, com diferentes condições de temperatura e pH no estágio X. Em ambas as pastas foi utilizada a mesma dose enzimática no estágio X (200 mL/t), e a mesma carga de ClO_2 no estágio D₀ (2,2 % como Cl_2 ativo) – Tabela 6.

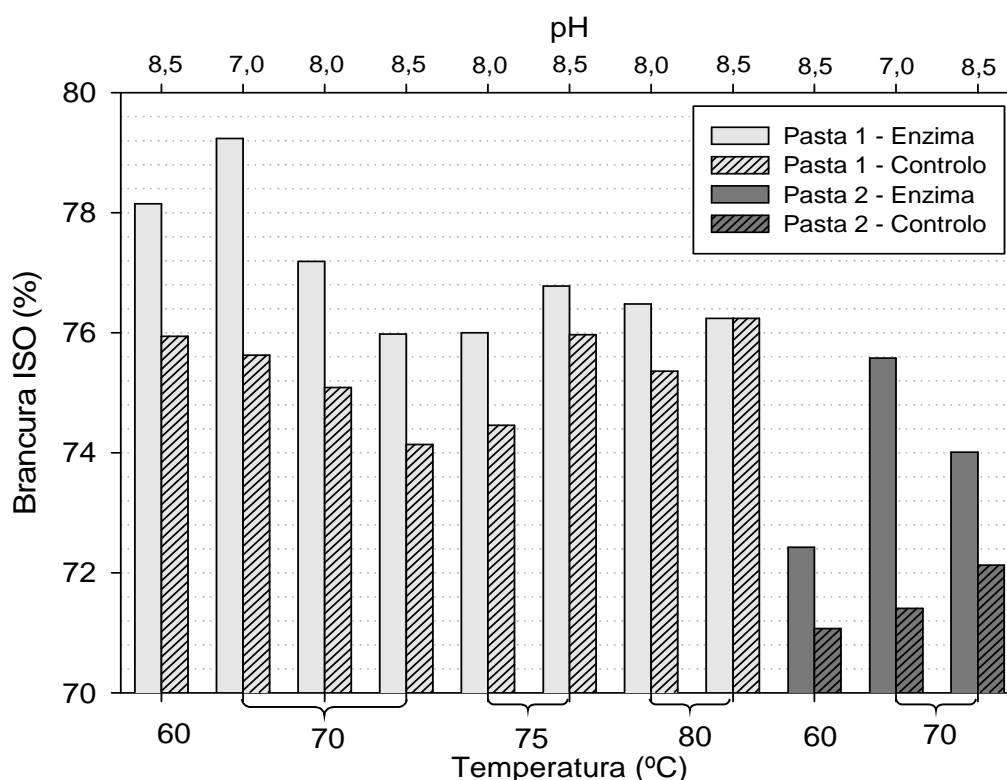


Figura 26. Brancura ISO das pastas 1 e 2 com sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO_2 de 2,2 % como Cl_2 ativo.

Avaliando a variabilidade das pastas (Figura 26), o efeito do IK residual das pastas cruas na grandeza da brancura atingida é visível. A pasta 1 com um IK inferior (= 12,7) atinge graus de brancura superiores em comparação com a pasta 2, que apresenta um IK superior (= 14,9), tal como foi observado nas pastas DE (secção 6.2).

Analisando o efeito do pH (a temperatura constante) e o efeito da temperatura (a pH constante) na brancura das pastas tratadas com enzima, verifica-se uma tendência para a diminuição da brancura com o aumento destas variáveis. No entanto, nas condições mais agressivas, este comportamento nem sempre se verifica. De facto, é de salientar, que a análise dos

valores absolutos de brancura atingida pelas pastas XDE, tal como é apresentado na Figura 26, não é linear pois a remoção de lenhina e cromóforos sem a adição de enzima (pastas de controlo), em condições mais agressivas ao longo do tempo, faz também aumentar a brancura. Por exemplo, o efeito do pH na brancura das pastas de controlo é visível: na pasta 1 o aumento do pH de 8 para 8,5 tanto a 75°C como a 80°C aumenta a brancura. É importante, por este motivo, avaliar a brancura obtida com o tratamento enzimático em relação ao respetivo controlo de forma a evitar a sub ou sobrevalorização do efeito do tratamento enzimático, o que resultaria em conclusões incorretas.

Analizando então as diferenças entre as brancuras da pasta tratada com enzima e do respetivo controlo, para a pasta 1 apresentada na Tabela 11, pode verificar-se que todos os ensaios com tratamento enzimático resultaram num aumento do ganho da brancura em relação ao controlo, exceto a uma temperatura de 80 °C e pH 8,5. Este último resultado indicia inatividade da xilanase para esta conjugação de condições mais agressivas. Contudo, para temperaturas mais suaves, o tratamento enzimático a pH 8,5 resulta numa variação de brancura crescente com a diminuição da temperatura. No caso específico do ensaio efetuado a 70 °C e pH 8, a variação de brancura é comparável ao ensaio efetuado a 60 °C e pH 8,5 (2,1 e 2,2 respetivamente), o que indica que o aumento do pH de 8 para 8,5 é compensado pela diminuição da temperatura de 70 para 60 °C. Comparando os resultados obtidos para pH 7 e 8, verifica-se uma diminuição da variação da brancura com o aumento da temperatura. Estes resultados mostram, mais uma vez, a influência do pH e da temperatura na atividade enzimática.

Relativamente à pasta 2 (Tabela 11), revela um comportamento idêntico ao da pasta 1 em relação à variação de brancuras apesar das diferenças no grau de brancura atingida (Figura 27): observa-se uma diminuição da variação da brancura com o aumento do pH à temperatura de 70°C.

Tabela 11. Ganho de Brancura das pastas XDE em relação ao controlo para as pastas 1 e 2 com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

T (°C)	pH	Pasta 1	Pasta 2
		ΔBrancura	ΔBrancura
60	8,5	2,2	1,4
	7,0	3,6	4,2
70	8,0	2,1	-
	8,5	1,8	1,9
75	8,0	1,5	-
	8,5	0,8	-
80	8,0	1,1	-
	8,5	0,0	-

Como referido anteriormente, os primeiros estágios de branqueamento são considerados estágios de deslenhificação, pois promovem a remoção de grande parte da lenhina residual (Sixta et al., 2006). Para avaliar a evolução do teor de lenhina com o aumento do pH e da temperatura no estágio enzimático, determinou-se o IK. Como se pode observar na Tabela 12, em todos os ensaios efetuados, o IK das pastas tratadas com enzima é inferior ao respetivo controlo. Tal como na brancura, a diferença entre o IK das pastas tratadas com enzima e o controlo, é maior em condições mais suaves, sendo a diferença mais expressiva de aproximadamente 1 unidade de IK, a 70 °C e pH 7, em ambas as pastas. É de salientar que o erro associado a esta determinação foi inferior a 0,5 unidades de IK.

Tabela 12. IK das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

	T (°C)	pH	Pasta 1		Pasta 2	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta crua	-	-	12,7		14,9	
Pasta DE	-	-	4,5		6,1	
Pasta XDE	60	8,5	4,0	4,6	5,2	5,3
		7	3,6	4,6	4,4	5,5
	70	8	4,3	4,8	-	-
		8,5	4,4	4,6	4,5	5,0
	75	8	4,3	4,8	-	-
		8,5	4,3	4,5	-	-
	80	8	4,4	4,5	-	-
		8,5	4,4	4,3	-	-

Estes resultados apontam para a ação da xilanase na remoção, de forma indireta, de lenhina através da clivagem das xilanas ligadas covalentemente à lenhina (LCC), e/ou pela remoção das xilanas precipitadas na superfície das fibras, o que abre caminho à passagem dos reagentes de branqueamento que oxidam e extraem a lenhina (Beg et al., 2001; Bajpai, 2014). De facto, alguns trabalhos indicam que o tratamento com xilanases provoca algum efeito na morfologia das fibras causando o aparecimento de rachaduras, flocos, filamentos e descamação da parede celular, o que permite um maior contacto entre os reagentes de branqueamento e o substrato (Roncero et al., 2000; Roncero et al., 2005; Kuhad & Singh, 2007). Além disso, a remoção de xilanas com elevado teor de ácidos hexenurónicos, faz diminuir o IK, uma vez que, conforme explicado na secção 4.1, estes ácidos consomem permanganato de potássio (Li & Gellerstedt, 1997).

O dióxido de cloro reage com os ácidos hexenurónicos diminuindo o seu valor após este estágio (Bajpai, 2012). Segundo os resultados apresentados na Tabela 13, a pasta crua original

contém um teor de HexA que contribui com 40% para o IK da pasta. Após a sequência DE a pasta apresenta um teor em HexA 52% menor que a pasta crua original, contribuindo com 56% para o IK da pasta DE. Em linguagem simples é habitual denominar esta contribuição como “lenhina falsa”. Comparando na Tabela 13, os resultados obtidos na pasta após a sequência DE com as pastas de controlo das sequências XDE, não se verificam diferenças significativas (entre 26,9 e 27,6 mmol/kg), uma vez que o erro experimental associado a esta determinação foi de ~3 mmol/kg. Comparando agora os resultados da pasta tratada com enzima com as pastas de controlo, o efeito da xilanase provoca uma redução entre 5 e 23% no teor de HexA, sendo o valor mais elevado obtido nas condições em que a xilanase mostrou ter maior atividade (pH 7, temperatura 70°C). Esta redução é justificada pela remoção dos ácidos hexenurónicos ligados às frações solubilizadas dos xilooligossacarídeos. Segundo alguns estudos, as xilanases parecem ter uma ligeira preferência em hidrolisar xilanas altamente substituídas com ácidos hexenurónicos, pelo que tem sido observada uma forte correlação entre o efeito de *bleach boosting* causado pela xilanase e o perfil de ácidos hexenurónicos, sendo estes apontados como um dos principais fatores a afetar a eficiência do branqueamento com xilanases (Wedin et al., 2007; Shatalov & Pereira, 2009). Contudo, como se pode comprovar pela utilização da Eq. 1, a contribuição da redução de HexA de 6,3 mmol/kg (como no ensaio a pH 7 e 70°C) implica uma contribuição para a redução de IK de apenas ~0,6 unidades, quando a variação real é de 1 unidade entre a pasta XDE e a pasta de controlo. Por isso, o efeito da xilanase não pode ser explicado exclusivamente com base na redução destes ácidos.

Tabela 13. Ácidos hexenurónicos após aplicação de sequências DE e XDE na pasta 1 e com a xilanase X1.

	Dosagem (mL/tAD)	T (°C)	pH	HexA (mmol/kg)	IK	IK(HexA)*
Pasta crua	-	-	-	56,9	12,7	5,1
Pasta DE	-	-	-	27,5	4,5	2,5
Pasta XDE	Enzima	200	60	8,5	24,4	4,0
	Controlo	-	60	8,5	26,9	4,6
	Enzima	200	70	8,5	25,9	4,4
	Controlo	-	70	8,5	27,4	4,6
	Enzima	200	70	7	21,3	3,6
	Controlo	-	70	7	27,6	4,6

$$*IK(HexA) = 0,09*HexA$$

A extensão da degradação dos polissacarídeos deve ser controlada, uma vez que afeta as propriedades mecânicas do papel. Após um estágio X tem sido observado em diversos estudos um aumento da viscosidade na pasta devido à remoção parcial da xilana, que apresenta um menor grau

de polimerização do que a celulose. Isto faz com que, em média, o grau de polimerização na pasta aumente (Paice et al., 1988; Shatalov & Pereira, 2008; Valls et al., 2011). Contudo, os reagentes utilizados nas sequências de branqueamento, apesar de mais seletivos que os reagentes de cozimento, degradam a celulose. Em comparação com o dióxido de cloro, o peróxido de hidrogénio degrada em maior extensão a celulose, devido à formação de radicais não seletivos (Loureiro et al., 2011). Por outro lado, estudos demonstram que as xilanas atuam como um polímero protetor contra o ataque dos reagentes de branqueamento à celulose, pelo que a sua remoção deixa a celulose mais suscetível à degradação, diminuindo a viscosidade (Wedin et al., 2007; Pedrazzi et al., 2011). Portanto, a variação da viscosidade após um estágio XDE é o resultado de um balanço entre a degradação da celulose e degradação das xilanas. Concluindo, a variação da viscosidade após uma sequência XDE, como a usada no presente trabalho, será o resultado de um balanço entre a degradação da celulose (que faz diminuir a viscosidade) e a remoção da xilana (que faz aumentar a viscosidade). Fica de parte uma possível degradação da celulose por atividade celulolítica da solução enzimática como indicado por alguns trabalhos (Jeffries, 1992) visto que, segundo o fornecedor, a xilanase X1 não apresenta contaminação com celulases.

Na maioria dos ensaios apresentados na Tabela 14, as diferenças entre a viscosidade da pasta tratada com enzima e a do respetivo controlo não ultrapassa a margem de erro (50 pontos), indicando a preservação do grau de polimerização, como resultado do balanço entre a degradação/solubilização da celulose e a degradação/solubilização das xilanas.

Tabela 14. Viscosidade das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO_2 de 2,2 % como Cl_2 ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

	T (°C)	pH	Pasta 1		Pasta 2	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta crua	-	-	1333		1213	
Pasta DE	-	-	1086		1110	
Pasta XDE	60	8,5	1026	1071	1088	1060
		7	1042	1045	1142	1122
	70	8	1033	1006	-	-
		8,5	1058	1045	1102	1093
	75	8	1057	1049	-	-
		8,5	996	998	-	-
	80	8	1060	1024	-	-
		8,5	1049	1077	-	-

O tipo de sequência de branqueamento e especialmente o estágio final tem grande influência na estabilidade da brancura de pastas brancas (Eiras et al., 2008). Apesar de neste estudo a pasta

final ser semi-branqueada, determinou-se a reversão da brancura, a partir do *PC number*. O efeito do tratamento enzimático faz-se notar na maioria dos ensaios (Tabela 15), sendo o *PC number* inferior em comparação com o controlo, o que sugere a remoção de material que posteriormente afeta a reversão da brancura. A remoção de HexA através da degradação da xilanas, considerados por alguns autores responsáveis pela reversão da brancura, podem justificar parcialmente estes resultados (Cadena et al., 2010). Por outro lado, a remoção das estruturas LCC pela ação das xilanas, que são consideradas uma das principais fontes de cromóforos na pasta, contribuindo para a sua instabilidade, também poderá justificar os resultados obtidos (Watanabe, 1995). Mais uma vez, a maior diferença entre a enzima e o controlo é no ensaio efetuado a 70 °C e pH 7, em ambas as pastas, dando indicações de ser as condições para o desempenho ótimo da enzima.

Tabela 15. *PC number* das pastas 1 e 2 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

	T (°C)	pH	Pasta 1		Pasta 2	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta DE	-	-	1,6		2,3	
	60	8,5	1,2	1,5	1,6	1,8
	70	7	1,1	1,6	1,7	2,1
	70	8	1,4	1,7	-	-
Pasta XDE	70	8,5	1,6	1,7	1,4	1,6
	75	8	1,5	1,7	-	-
	75	8,5	1,5	1,4	-	-
	80	8	1,3	1,4	-	-
	80	8,5	1,7	1,6	-	-

- Pastas 2, 3 e 4 - Carga de ClO₂ de 2,5 % (como Cl₂ ativo)

A Figura 27 representa as brancuras obtidas com sequências XDE e respetivos controlos, para as pastas 2, 3 e 4 com diferentes condições de temperatura e pH no estágio X. Em ambas as pastas foi utilizada a mesma dose enzimática no estágio X (200 mL/t), a mesma carga de ClO₂ no estágio D₀ (2,5 % como Cl₂ ativo) (Tabela 6).

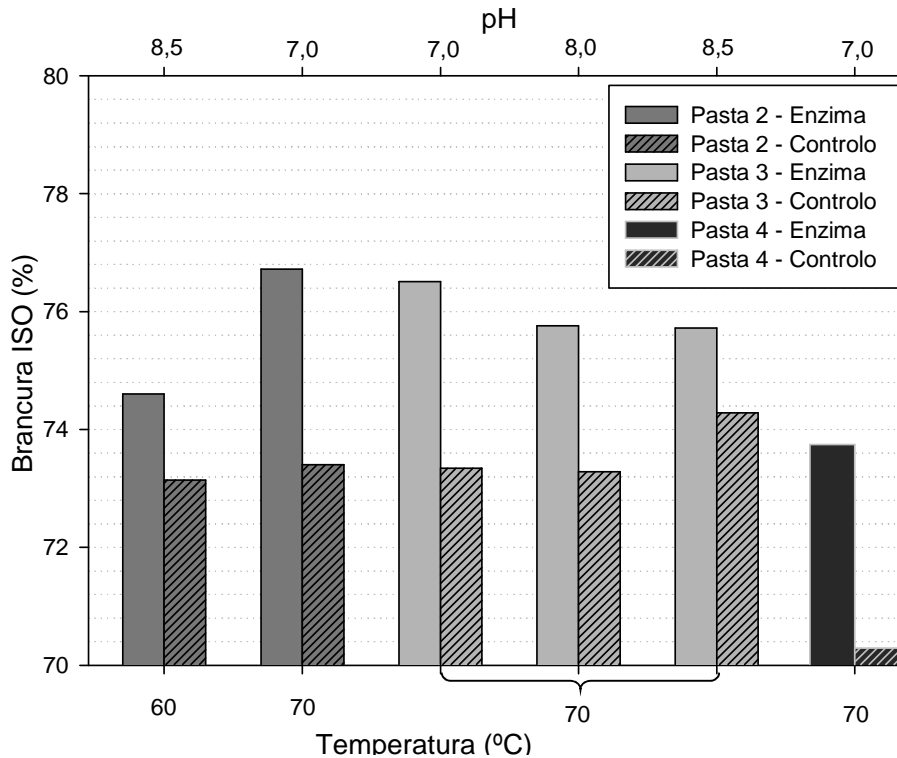


Figura 27. Brancura ISO das pastas 1, 2 e 3 com seqüências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO_2 de 2,5 % como Cl_2 ativo.

Por comparação entre a Figura 27 e a Figura 26, as alterações de temperatura e pH no estágio X causam efeitos semelhantes na pasta 2, independentemente da carga de ClO_2 aplicada (2,2 e 2,5 %). No entanto, o grau de brancura no segundo caso é superior devido à maior carga aplicada, o que permite remover maior quantidade de lenhina e compostos cromóforos. Na pasta 3, para uma temperatura constante de 70°C , é visível a diminuição da brancura da pasta tratada com enzima com o aumento do pH no estágio X, assim como o aumento da brancura do controlo nas mesmas condições (Figura 27), provocando uma redução do ganho de brancura exclusivamente devido à ação da xilanase.

A atividade das xilanases é influenciada pelas características do substrato. No entanto, independentemente da sua origem (pastas cruas com IK ~15-16), o ganho de brancura em relação ao controlo está dentro de uma gama estreita, 3,2 a 3,4 % ISO (Tabela 16), para as mesmas condições operatórias de 70°C , pH 7, mostrando que o efeito da xilanase é semelhante apesar das diferenças iniciais entre as pastas. Comparando os resultados da pasta 4, após XDE com os resultados após apenas X a 70°C e pH 7 (Tabela 10), o efeito *bleach boosting* da xilanase na brancura é notável. O aumento de brancura em relação ao controlo no primeiro caso é de 3,4% ISO, enquanto no segundo caso é de apenas 1,5% ISO, comprovando que a aplicação de xilanases antes do branqueamento amplifica os efeitos dos reagentes de branqueamento nos estágios subsequentes.

Tabela 16. Ganho de brancura das pastas XDE em relação ao controlo para as pastas 2, 3 e 4 com carga de ClO_2 de 2,5 % como Cl_2 ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

T (°C)	pH	Pasta 2	Pasta 3	Pasta 4
		Δ Brancura	Δ Brancura	Δ Brancura
60	8,5	1,5	-	-
	7,0	3,3	3,2	3,4
70	8,0	-	2,5	-
	8,5	-	1,4	-

O efeito da carga de ClO_2 usada no estágio D no IK das pastas obtidas pode ser visualizado comparando os resultados da Tabela 12 (2,2% Cl_2 ativo) com os da Tabela 17 (2,5 % Cl_2 ativo). Verifica-se uma diminuição do IK com o aumento da carga de ClO_2 , o que é esperado, uma vez que a remoção de lenhina e HexA será maior. De modo correspondente, mas inverso à brancura, o IK da pasta tratada com enzima é inferior ao respetivo controlo em todos os ensaios, mostrando a ação exclusiva da xilanase, sendo as reduções no IK de 0,5-0,8 pontos a 70°C e pH 7.

Tabela 17. IK das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO_2 de 2,5 % como Cl_2 ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

	T (°C)	pH	Pasta 2		Pasta 3		Pasta 4	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta crua	-	-	14,9		14,6		16,4	
Pasta DE	-	-	5,8		4,9		6,2	
Pasta XDE	60	8,5	4,3	4,6	-	-	-	-
		7,0	3,8	4,5	3,5	4,05	4,67	5,50
	70	8,0	-	-	3,6	4,04	-	-
		8,5	-	-	3,71	3,97	-	-

Tal como no caso do uso de uma carga de 2,2% (como Cl_2 ativo) no estágio D, também para a carga 2,5%, a viscosidade das pastas tratadas com enzima (XDE) não se altera de forma significativa, em relação ao controlo (Tabela 18), enquanto se verifica uma diminuição do PC number nas pastas tratadas com enzima, em relação ao controlo (Tabela 19).

Tabela 18. Viscosidade das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO_2 de 2,5 % como Cl_2 ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

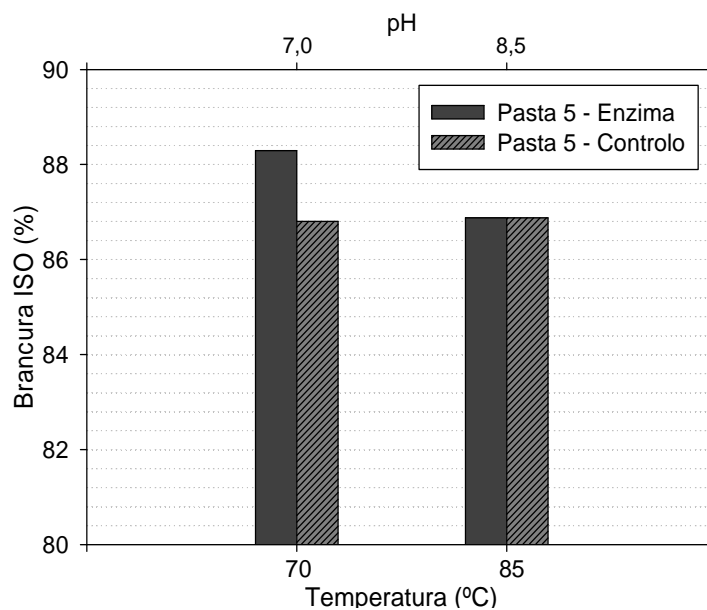
	T (°C)	pH	Pasta 2		Pasta 3		Pasta 4	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta crua	-	-	1213		1203		1339	
Pasta DE	-	-	1119		1067		1116	
Pasta XDE	60	8,5	1105	1081	-	-	-	-
		7,0	1128	1121	1119	1087	1092	1095
	70	8,0	-	-	1050	1057	-	-
		8,5	-	-	1071	1079	-	-

Tabela 19. *PC number* das pastas 2, 3 e 4 após sequências XDE e respetivo controlo, com carga de ClO₂ de 2,5 % como Cl₂ ativo (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

	T (°C)	pH	Pasta 2		Pasta 3		Pasta 4	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta DE	-	-	2,0		2,0		2,0	
	60	8,5	1,6	1,7	-	-	-	-
Pasta XDE		7,0	1,5	1,7	1,8	1,9	1,7	2,1
	70	8,0	-	-	1,6	1,8	-	-
		8,5	-	-	1,4	1,7	-	-

Pasta 5 - Carga de ClO₂ de 1,8 % (como Cl₂ ativo)

Na Figura 28 estão apresentadas as brancuras obtidas com sequências XDE e respetivos controlos, para a pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio) em diferentes condições de temperatura e pH no estágio X. Foi utilizada uma carga de ClO₂ no estágio D₀ de 1,8 % como Cl₂ ativo e as condições dos restantes estágios estão apresentadas na Tabela 6.

**Figura 28.** Brancura ISO da pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio) após a sequência XDE e respetivo controlo, usando uma carga de ClO₂ de 1,8 % como Cl₂ ativo no estágio D.

Como se pode observar, o pré-tratamento enzimático a 70°C e pH 7 aumenta em 1,5 % ISO, a brancura da pasta tratada com enzima em relação ao controlo. Em comparação com as pastas analisadas anteriormente, este ganho de brancura nas condições ótimas da enzima é inferior, o que se deve, em parte, à degradação das xilanas no estágio de deslenhificação com oxigénio, diminuindo assim a concentração de substrato (Pedrazzi et al., 2011). Pelos resultados

apresentados é também possível confirmar a inatividade da enzima em condições agressivas (85°C e pH 8,5).

Relativamente à caracterização da pasta após uma sequência de branqueamento XDE (Tabela 20), verifica-se um comportamento semelhante aos casos anteriores, devido à ação da atividade enzimática, quando se compara com a pasta de controlo: o IK diminui devido à remoção de lenhina residual e/ou de HexA; a viscosidade aumenta ligeiramente, que pode ser fruto da dissolução parcial de xilanas; o *PC number* diminui ligeiramente.

Tabela 20. IK e viscosidade e *PC number* da pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio), obtidos após branqueamento com sequência XDE, com carga de ClO₂ de 1,8 % como Cl₂ ativo e dosagem de X1: 200 mL/tAD.

	T (°C)	pH	IK		Viscosidade (mL/g)		<i>PC number</i>	
			Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta original	-	-	9,2		1027		2,3	
Pasta DE	-	-	3,9		876		1,4	
Pasta XDE	70	7,0	3,4	4,1	839	825	0,9	1,0
	85	8,0	3,8	3,9	845	837	0,9	1,7

Resumindo os resultados obtidos para as diferentes pastas tratadas com a xilanase X1 e branqueadas com a sequência DE (pastas XDE), é possível afirmar que as condições ótimas para a sua atuação, tal como indicadas pelo fornecedor, são efetivamente 70 °C e pH 7, permitindo um ganho adicional de brancura e uma redução adicional de IK e *PC number* quando se compara com a pasta DE. O tratamento enzimático causa, por isso, a diminuição da reversão da brancura, sendo este efeito mais ou menos pronunciado em função da atividade enzimática. A sua utilização a temperaturas superiores a 80°C reduz significativamente a atividade enzimática e, se conjugada com pH igual ou superior a 8,5, a xilanase torna-se inativa, independentemente das características da pasta. A redução no IK deve-se a uma diminuição do teor de lenhina e de HexA. A extensão de degradação da celulose requer uma análise complexa que necessita de ser estudada em maior detalhe para esclarecer os resultados (composição em açúcares e pesos moleculares), sendo possível afirmar que o balanço final traduz-se em alterações pouco significativas na viscosidade.

6.4.2. XILANASE X2

Pasta 1 - Carga de ClO₂ de 2,2 % (como Cl₂ ativo)

Na Figura 29 estão apresentadas as brancuras obtidas com sequências XDE e respetivos controlos, para a pasta 1 usando as suspensões enzimáticas X1 e X2. A dose enzimática de 1530

mL/t de X2 foi indicada pelo fornecedor como contendo idêntico teor de proteína com ação xilanolítica que a dose de 200 mL/t de X1. Para a suspensão enzimática X2 a dose de 900 mL/t é recomendada para ensaios laboratoriais. Contudo, o aumento da dose enzimática de 900 para 1530 mL/t (a 75°C e pH 8,5), não provocou um aumento significativo da brancura (79,9 e 80,1 % ISO, respetivamente). Este resultado poderá ser devido a restrições de acessibilidade ao substrato pela ação da xilanase (Kulkarni & Rao, 1996), e que faz com que o aumento da dose enzimática a partir de um determinado ponto não aumente significativamente a extensão do branqueamento, tal como verificado noutros estudos (Esteves, 2013). Este é um dos motivos pelo qual se deve otimizar a dose enzimática, de modo a minimizar os custos com a utilização das xilanases.

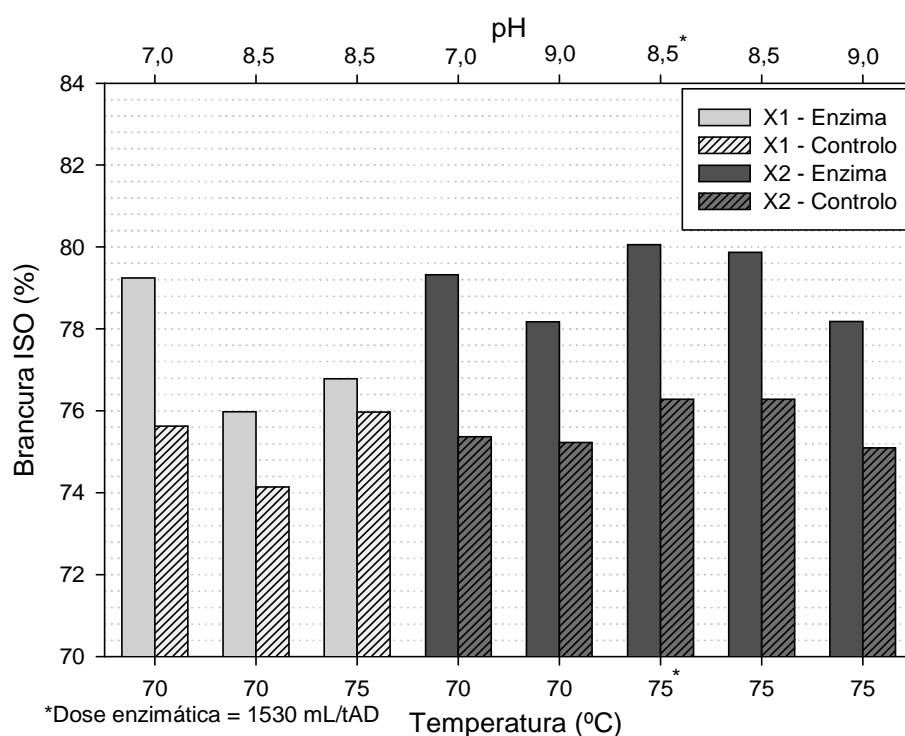


Figura 29. Brancura ISO da pasta 1 tratada com as xilanases X1 e X2 em sequências XDE e respetivos controlos, com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo (dosagem de X1:200 mL/tAD; dosagem de X2: 900 mL/tAD exceto ensaio assinalado).

Usando uma dosagem de 900 mL/tAD de X2, a 70°C e pH 7, a brancura atingida (79,3 % ISO) é semelhante à pasta tratada com a xilanase X1 (79,2 % ISO) X2. Dado que o teor de proteína de X2 é menor, este resultado mostra a superioridade desta enzima. Além disso, a 75°C e pH 8,5, a brancura atingida com a xilanase X2 é muito mais elevada que com a xilanase X1. Em comparação com o controlo, os ganhos de brancura foram 3,8 e 0,8% ISO, respetivamente (Tabela 21), o que demonstra a maior atividade enzimática da xilanase X2 a temperaturas e pH mais elevados. Este facto é evidenciado com o aumento do pH para 9 quer a 70°C quer a 75°C, onde os

ganhos de brancura em relação ao controlo atingiram 2,9 e 3,1 %, respetivamente. Nestas condições, a xilanase X1 não apresenta atividade. Estes resultados mostram a robustez da xilanase X2 a temperaturas elevadas e maior tolerância a pH alcalino. Isto significa que é mais fácil aplicar a xilanase nas torres industriais de armazenamento de pasta sem grandes modificações processuais.

Tabela 21. Ganho de Brancura das pastas XDE em relação ao controlo para a pasta 1 com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo, usando a xilanase X2 e X1.

Xilanase	T (°C)	pH	Dosagem (mL/tAD)	Pasta 1
				ΔBrancura
X2	70	7	900	3,9
		9	900	2,9
	75	8,5	1530	3,8
		8,5	900	3,6
		9	900	3,1
		9	900	3,1
X1	70	7	200	3,6
		8,5	200	1,8
	75	8,5	200	0,8

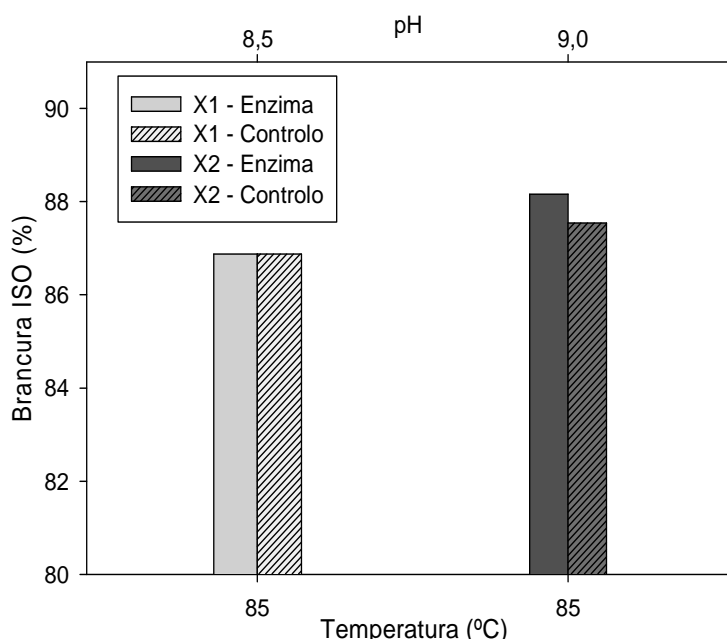
A ação da xilanase X2 leva a uma diminuição de cerca de 1 unidade no IK da pasta tratada em relação aos respetivos controlos (Tabela 22), independentemente das condições testadas (70 a 75°C; pH 7 a 9), enquanto a xilanase X1 provoca uma diminuição de 1 unidade no IK, nas condições de pH 7, 70°C, sendo praticamente nulo o efeito sobre o IK a pH e temperatura mais elevados (75°C, pH 8,5). Em paralelo, verifica-se uma tendência para a xilanase X2 aumentar a viscosidade da pasta provavelmente como resultado da remoção parcial de xilanas, cujo grau de polimerização é mais baixo. A ação da xilanase X2 faz-se ainda notar na redução significativa do *PC number* numa gama mais alargada de condições operatórias no estágio X que a xilanase X1, removendo compostos potenciais produtores de cromóforos após o envelhecimento das pastas.

Tabela 22. IK, viscosidade e *PC number* da pasta 1, obtidos após branqueamento com sequência XDE, com carga de ClO₂ de 2,2 % como Cl₂ ativo.

	T(°C)	pH	Dosagem (mL/tAD)	IK		<i>PC number</i>		Viscosidade (mL/g)	
				Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta crua					12,7		-		1333
Pasta DE					4,5		1,6		1086
Xilanase X2	70	7	900	3,3	4,3	1,2	1,7	1077	1069
	70	9	900	3,6	4,3	1,1	1,6	1075	1036
	75	8,5	1530	3,0	4,1	1,0	2,1	1097	1072
	75	8,5	900	3,1	4,1	1,0	2,1	1086	1072
	75	9	900	3,5	4,3	1,8	1,6	1082	1080
Xilanase X1	70	7	200	3,6	4,6	1,1	1,6	1042	1045
	70	8,5	200	4,4	4,6	1,6	1,7	1058	1045
	75	8,5	200	4,3	4,5	1,5	1,4	996	998

Pasta 5 - Carga de ClO₂ de 1,8 % (como Cl₂ ativo)

A xilanase X2 foi também usada na pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio) em condições de temperatura e pH elevados: 85°C e pH 9, com uma dose enzimática de 900 mL/tAD. No estágio D₀, foi usada uma carga de 1,8 % de ClO₂ (como Cl₂ ativo) -Tabela 6. Como nestas condições a xilanase X1 não apresentava atividade, serão também apresentados na Figura 30 os resultados obtidos com a xilanase X1 nas condições operatórias mais próximas destas.

**Figura 30.** Brancura ISO da pasta 5 tratada com as xilanases X1 e X2 em sequências XDE e respetivos controlos, com carga de ClO₂ de 1,8 % como Cl₂ ativo.

Apesar da pasta ser pré-deslenhificada com oxigénio, é notável a brancura atingida pelo controlo quando o pH aumentou de 8,5 para 9, pelo que esta “lavagem” a temperatura e pH elevados é capaz de remover alguns compostos cromóforos. A estabilidade térmica e alcalina da xilanase X2 é evidente neste ensaio, onde o ganho de brancura em relação ao controlo é de 0,6 % ISO, enquanto a xilanase X1 no teste realizado a 85°C e pH 8,5 não demonstra qualquer atividade. Além disso, em relação à pasta de controlo verifica-se uma redução significativa do *PC number* (Tabela 23), apesar das condições operatórias agressivas no tratamento da pasta com X2. Nestas condições, o efeito da sua ação no IK é ligeiro. Adicionalmente, a xilanase X2 provoca um pequeno aumento na viscosidade da pasta, que se deve provavelmente à remoção de xilanas de baixo peso molecular.

Tabela 23. IK e viscosidade e *PC number* da pasta 5, obtidos após branqueamento com sequência XDE, carga de ClO₂ de 1,8 % como Cl₂ ativo.

	T (°C)	pH	Dosagem mL/tAD	IK		Viscosidade (mL/g)		PC number	
				Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
Pasta original	-	-	-	9,2		1027		2,3	
Pasta DE	-	-	-	3,9		876		1,4	
Xilanase X2	85	9,0	900	3,6	3,8	905	864	0,7	1,0
Xilanase X1	85	8,0	200	3,8	3,9	845	837	0,9	1,7

Comparando o desempenho das xilanas X1 e X2, conclui-se que a xilanase X2 exibe uma estabilidade à temperatura e ao pH substancialmente superior, mantendo atividade numa gama de condições bastante alargada, sendo mais promissora para a aplicação à escala industrial. Estes resultados demonstram a importância da seleção da xilanase mais indicada às condições fabris, de forma a maximizar o efeito de *bleach boosting*, com custos mínimos.

A engenharia genética tem desenvolvido um papel importante na produção de xilanas comerciais com melhor estabilidade a temperatura e pH extremos (Haki & Rakshit, 2003). A estabilidade térmica e ao pH das xilanas está relacionada com a sua estrutura proteica, o que afeta a atividade catalítica (Haki & Rakshit, 2003; Bai et al., 2010). Este assunto não é aqui analisado em maior detalhe, uma vez que não faz parte dos objetivos deste estudo.

Com base na sequência dos aminoácidos, é comum estabelecer um sistema de classificação, no qual a maioria das xilanas pertence à família GH (*glycoside hydrolases*) 10, que apresentam elevado peso molecular e GH 11, que apresentam baixo peso molecular (Dominguez et al., 1995). As xilanas que pertencem à família GH 11 são as que apresentam melhor desempenho no

branqueamento, uma vez que o tamanho das enzimas influencia os resultados em função da porosidade das fibras, volume de poros e o tamanho de partículas o que pode dificultar o acesso às xilanas (Esteghlalian et al., 2008; Yang et al., 2013). No entanto as xilanases da família GH 10 são mais termoestáveis (Fontes et al., 1995). A família a que pertencem as xilanases X1 e X2 não foi facultada pelo fornecedor.

A presença de diversas formas de xilanase com diferentes especificidades na solução enzimática, que atuam sinergicamente para hidrolisar a xilana, também influenciam fortemente os resultados obtidos, sendo os sistemas hétero xilanases uma estratégia para a hidrólise efetiva da xilana e obtenção de bons resultados (Beg et al., 2001). Um exemplo disso mesmo é o sinergismo entre a ação da endo- β -1,4-xilanase, que atua na cadeia principal da xilana, e a α -L-arabinofuranosidase, a acetilxilana esterase e a α -glucuronidase, que atuam nas cadeias laterais. A ação sinérgica entre a acetilxilana esterase e a endo- β -1,4-xilanase resulta na degradação eficiente das xilanases acetiladas, a libertação de ácido acético aumenta a acessibilidade à cadeia principal pela endo- β -1,4-xilanase e a endo- β -1,4-xilanase cria cadeias acetiladas mais curtas, que são os substratos preferidos da acetilxilana esterase (Biely et al., 1986). Assim, tal como este exemplo, outras combinações entre diferentes tipos de xilanases poderá ter influência no efeito de *bleach boosting* das pastas. A composição das xilanases X1 e X2 não foi facultada pelo fornecedor.

6.4.3. RENDIMENTO

O tratamento enzimático tem como desvantagem a perda de rendimento em pasta, o qual é dependente do tipo de xilanase utilizada, da carga enzimática aplicada e do teor de xilanas na pasta (Bajpai & Bajpai, 1997). Deve-se à clivagem parcial das xilanas, cujos xilooligossacarídeos são posteriormente dissolvidos. Uma perda de rendimento muito elevada pode inviabilizar economicamente a aplicação de xilanases à escala industrial, apesar de diminuir a carga de reagentes químicos dispendiosos (Gangwar et al., 2014). Este fator pode ser minimizado com a otimização da dose enzimática aplicada, que conduza a um efeito de *bleach boosting* máximo e uma perda de rendimento mínima (Borges et al., 2010).

Para avaliar a perda de rendimento foram efetuados ensaios nas condições ótimas da xilanase X1 (70°C, pH 7) e em condições alcalinas mais próximas dos valores fabris encontrados nas torres de armazenamento onde a xilanase X1 apresenta ainda alguma atividade (75°C, pH 8,5). Estudou-se o efeito direto do tratamento enzimático no rendimento através de um estágio X, que, como se pode observar na Tabela 24, conduz, nas condições ótimas (70°C, pH7) a uma perda de rendimento de 0,53 % em relação ao controlo. Nas condições mais agressivas, a 75°C e pH 8,5, obteve-se uma

perda de rendimento menor, 0,24 %, o que é esperado, uma vez que no segundo caso a atividade enzimática é inferior e portanto há menor remoção de xilanas. Quando comparada com o ensaio de controle, a perda de rendimento após a sequência usada, XDE, é ligeiramente superior aos valores anteriores para o ensaio X: 0,58 % para 70°C, pH 7, e 0,34 % para 75°C, pH 8,5. Esta perda de rendimento encontra-se dentro dos parâmetros aceitáveis para aplicação à escala industrial.

Tabela 24. Rendimento após aplicação de sequências X e XDE na pasta 1 com a xilanase X1.

		T(°C)	pH	Dosagem (mL/tAD)	Rendimento (%)	Perda de Rendimento (%) *
X	Enzima	70	7	200	98,99	0,53
	Controlo	70	7	-	99,52	
	Enzima	75	8,5	200	99,53	0,24
	Controlo	75	8,5	-	99,77	
XDE	Enzima	70	7	200	98,04	0,58
	Controlo	70	7	-	98,62	
	Enzima	75	8,5	200	98,61	0,34
	Controlo	75	8,5	-	98,95	

*em relação ao controlo

6.5. POUPANÇA DE REAGENTES

A poupança de dióxido de cloro foi determinada graficamente a partir das figuras apresentadas no Anexo II.3.2. Para melhor compreensão, apresenta-se um exemplo ilustrativo na Figura 31 e descreve-se o significado de cada uma das curvas traçadas:

- Curva de branqueamento – Evolução da brancura da pasta com uma sequência DE usando diferentes cargas de dióxido de cloro no estágio D. As condições utilizadas nos estágios D e E estão apresentadas na Tabela 6;
- Target – Linha horizontal correspondente à brancura da pasta após uma sequência XDE, com um estágio enzimático a determinada temperatura e pH, e utilizando as condições indicadas na Tabela 6 para os estágios DE;
- Controlo – Evolução da brancura da pasta nas mesmas condições que numa sequência XDE, porém, sem a adição de xilanase no estágio enzimático. A curva traçada é uma estimativa da evolução da brancura, tendo em conta não só a evolução da curva de branqueamento mas também dois pontos reais sendo o primeiro obtido com uma carga de dióxido de cloro baixo denominado Controlo 1 e o segundo denominado Controlo 2 com uma carga de dióxido de cloro estimada por forma a atingir o mesmo grau de brancura que a pasta tratada com enzima numa sequência XDE (*target*).

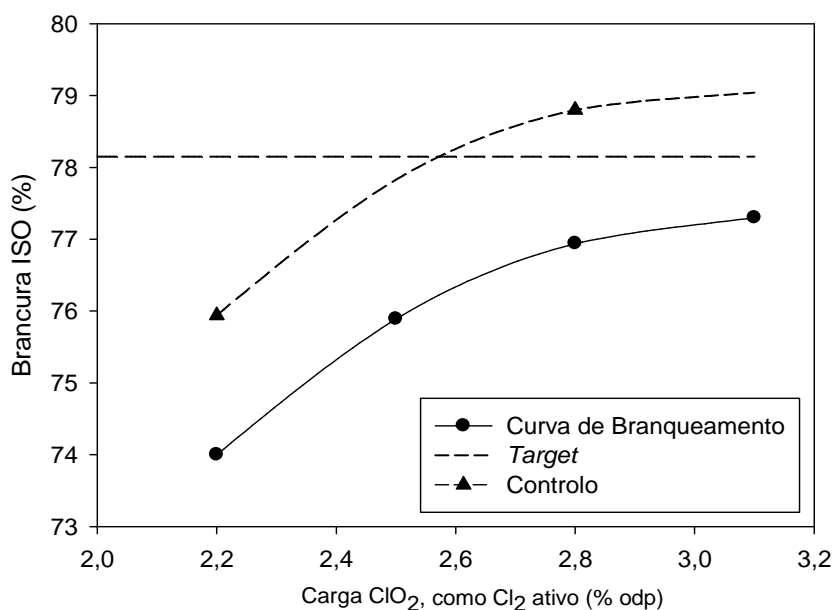


Figura 31. Método utilizado para a determinação das poupanças de dióxido de cloro. Exemplo ilustrativo para o ensaio efetuado com a xilanase X1, na pasta 1. Condições no estágio X: 60°C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. Target com 2,2% Cl₂ ativo.

O cálculo da poupança de ClO₂ foi efetuado tal como indicado na Eq. 23.

$$\text{Poupança ClO}_2 (\%) = \frac{\text{Carga ClO}_2 \text{ Controlo 2} - \text{Carga ClO}_2 \text{ Controlo 1}}{\text{Carga ClO}_2 \text{ Controlo 1}} \times 100 \quad (23)$$

Para o ensaio representado na Figura 31, a poupança de ClO₂ é calculada da seguinte forma:

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,57 - 2,20}{2,20} = 16,8 \%$$

As poupanças determinadas em todos os ensaios efetuados com a xilanase X1 encontram-se resumidos na Tabela 25.

Tabela 25. Poupanças de dióxido de cloro obtidas a partir de pastas tratadas com a xilanase X1 (dosagem de X1: 200 mL/tAD).

T (°C)	pH	Poupanças de Dióxido de Cloro (%)					
		Pasta 1*	Pasta 2*	Pasta 2**	Pasta 3**	Pasta 4**	Pasta 5***
60	8,5	16,8	-	14,8	-	-	-
	7	36,4	52,7	27,6	26,0	28,0	27,8
70	8	18,2	-	-	20,0	-	-
	8,5	13,6	22,7	-	-	-	-
75	8	10,9	-	-	-	-	-
80	8	6,8	-	-	-	-	-

Target com * 2,2% Cl₂ ativo; ** 2,5% Cl₂ ativo; *** 1,8% Cl₂ ativo.

Analisando os resultados para a pasta 1, para pH 8, o aumento da temperatura (70, 75 e 80°C) traduz-se numa diminuição sucessiva da poupança de ClO₂, confirmando a redução de

atividade com o aumento da temperatura: a carga de ClO_2 requerida na sequência DE seria 18, 11 e 7% superior, respetivamente, para atingir a mesma brancura que a pasta tratada com enzima na sequência XDE (*target*).

Avaliando agora o efeito do pH para a temperatura de 70°C , o efeito de *bleach boosting* da enzima que conduz a poupanças no estágio D diminui com o aumento do pH (7, 8 e 8,5), sendo que seria necessário aplicar uma carga de ClO_2 na sequência DE cerca de 36, 18 e 14% superior, respetivamente, para se atingir o mesmo grau de brancura que a pasta tratada com enzima (*target*) na sequência XDE. Tal como observado anteriormente, o efeito do aumento do pH de 8 para 8,5 é compensado pela diminuição da temperatura de 70 para 60°C , sendo necessária uma carga de ClO_2 17% superior na sequência DE para atingir a mesma brancura que a pasta tratada com enzima na sequência XDE.

Relativamente às pastas 2, 3 e 4, os resultados apresentam o mesmo padrão que a pasta 1, onde o aumento do pH resulta na diminuição das poupanças de ClO_2 . Contudo, comparando as poupanças de ClO_2 nas pastas 1 e 2, as poupanças na pasta 2 são superiores, possivelmente devido ao maior IK da pasta original.

Por outro lado, comparando agora os resultados para o tratamento enzimático a 70°C e pH 7 (condições ótimas) com carga de ClO_2 de 2,5% como Cl_2 ativo, observa-se poupanças de ClO_2 relativamente semelhantes (28, 26 e 28%, respetivamente) para as pastas 2, 3 e 4, as quais apresentam um IK inicial relativamente próximo (14,9, 14,6 e 16,4, respetivamente).

Com a pasta 5 (pré-deslenhificada com oxigénio), tratada com enzima (70°C , pH 7 no estágio X) consegue-se uma poupança de ClO_2 de 28% em comparação com a pasta de referência para atingir a mesma brancura.

Em resumo, a xilanase X1 é extremamente sensível a condições de alcalinidade e temperatura elevadas, diminuindo significativamente a sua atividade para condições afastadas do seu ótimo (70°C e pH 7). O efeito de *bleach boosting*, traduzido na poupança de ClO_2 , diminui com o aumento da temperatura a pH constante, e diminui também com o aumento do pH a temperatura constante. O efeito da redução da atividade a pH elevado pode ser compensado pela utilização de temperaturas mais suaves. O seu efeito é semelhante em todas as pastas estudadas, havendo algumas variações naturais devido às diferentes propriedades químicas e estruturais das pastas. Desta forma, a xilanase X1 demonstra ser bastante ativa nas condições ótimas, não sendo, no entanto, aconselhável a sua aplicação à escala industrial em condições muito afastadas do ótimo. Para um parecer melhor fundamentado seria necessário efetuar uma avaliação económica,

onde fatores como o custo da xilanase, a poupanças de dióxido de cloro e o prejuízo devido à perda de rendimento devem ser equacionados.

Na Tabela 26, estão apresentados as poupanças em dióxido de cloro determinadas a partir do uso da xilanase X2. Contrariamente ao comportamento da xilanase X1, o aumento da temperatura de 70 para 75°C a um pH 9 não resulta numa diminuição na poupança de ClO₂, o que demonstra o potencial da utilização da xilanase X2 em condições mais agressivas. Para a pasta pré-deslenhificada com oxigénio, tratada com X2 a 85°C e pH 9 ainda se consegue 10% de poupança na carga de ClO₂ para atingir a mesma brancura quando se usa uma sequência XDE em vez de DE.

Tabela 26. Poupanças de dióxido de cloro obtidas a partir de pastas tratadas com a xilanase X2.

T (°C)	pH	Dosagem (mL/tAD)	Poupanças de Dióxido de Cloro (%)	
			Pasta 1*	Pasta 5**
70	7	900	36,4	-
	9	900	27,3	-
75	8,5	1530	36,4	-
	8,5	900	36,4	-
	9	900	31,8	-
85	9	900	-	10,0

*Target com * 2,2% Cl₂ ativo; ** 1,8% Cl₂ ativo.*

Assim, comparando no geral as xilanases X1 e X2 observa-se um comportamento semelhante das duas enzimas nas condições ótimas da xilanase X1 (70°C e pH 7). Contudo a xilanase X2 apresenta uma termoestabilidade e estabilidade alcalina muito mais elevada, apresentado atividade e temperaturas superiores a 80°C e pH superior a 8,5, ao contrário da X1.

7. CONCLUSÕES

A hemicelulose predominante em pastas *kraft* crua de Eucalipto é a xilana, a qual contém ligações covalentes à lenhina residual e a ácidos hexenurónicos (formados durante o cozimento *kraft*) contribuindo para a coloração da pasta, para o aumento do consumo de reagentes de branqueamento (nomeadamente de dióxido de cloro, D, em sequências ECF) e para a reversão da brancura. Assim, a hidrólise das xilanas em pastas não branqueadas, num estágio prévio ao branqueamento, através da acção de xilanases é vantajosa e a avaliação do potencial da aplicação de xilanases em pastas *kraft* não branqueadas de *E. globulus* foi a motivação para este estudo. O efeito deste pré-tratamento enzimático (X) foi analisado em pastas XDE e comparado com os resultados obtidos em pastas DE. O efeito da variabilidade das pastas no desempenho do estágio enzimático foi também avaliado por recolha de pastas cruas em diferentes fábricas nacionais (pastas 1 a 4) que utilizam condições operatórias ou equipamentos distintos, conferindo características químicas específicas às pastas. Foi também recolhida uma pasta pré-deslenhificada com oxigénio (pasta 5) e dispunha-se de duas suspensões líquidas de xilanases, X1 e X2, sendo a primeira comercial e a segunda experimental.

O branqueamento das pastas fabris recolhidas com a sequência DE revelou que as diferenças específicas do processo *kraft* em cada unidade industrial conferem às pastas diferentes branqueabilidades. As pastas cruas com IK~15 foram aquelas que apresentaram maior ganho de brancura face à carga de dióxido de cloro aplicada.

Ensaio preliminares envolvendo o tratamento enzimático da pasta 1, permitiu concluir que a xilanase X1 apresenta maior atividade em condições mais suaves, temperatura de 70°C e pH 7. Nestas condições, verifica-se também que o estágio X tem um efeito direto no aumento da brancura até 1,9 % ISO, promovendo uma ligeira redução do índice kappa e da reversão da brancura.

A aplicação da xilanase X1, seguido de uma sequência DE (obtendo-se pastas XDE) provocou o efeito de *bleach boosting* nos reagentes de branqueamento permitindo atingir ganhos de brancura de ~3 a 4 % ISO nas condições mais suaves (pH 7, 70°C), para todas as pastas cruas (1 a 4), o que demonstra a independência da origem da pasta no efeito da xilanase. O efeito de *bleach boosting* para a pasta pré-deslenhificada com oxigénio (pasta 5) após branqueamento com uma sequência XDE é menos significativo, obtendo-se ganhos de brancura de 1,5 % ISO, possivelmente devido à degradação das xilanas no estágio de deslenhificação com oxigénio, diminuindo assim a concentração de substrato. Por comparação com as pastas branqueadas com sequências DE, a aplicação do tratamento enzimático permite poupanças em ClO₂ que rondam os 36%, com algumas diferenças entre pastas devido à sua composição química e estrutural (26 a 53%). Estas poupanças diminuem com o afastamento das condições referidas (pH 7, 70°C). Por

exemplo, na pasta 1, a pH 8 e 80°C a poupança diminui para 7%. Por outro lado, a aplicação da xilanase X1 pode provocar perdas de rendimento em pasta que rondam os 0,5% nas condições de maior actividade (pH 7, 70°C).

A aplicação da xilanase X2 em sequências XDE demonstrou maior robustez a temperaturas elevadas e maior tolerância a pH alcalino, indicando atividade a 85°C e pH 9, enquanto a xilanase X1 tornou-se inativa a temperaturas superiores a 80°C e pH 8,5, permitindo concluir sobre a importância da seleção da xilanase mais adequada às condições fabris. A xilanase X2 permite atingir poupanças em ClO₂ que podem atingir 36% nas condições mais suaves (pH 7, 70°C) aplicadas à pasta X1, sendo possível a 75°C e pH 9 obter-se poupanças de 32% para a mesma pasta e a 85°C e pH 9 obter poupanças até 10% nas pasta pré-deslenhificada.

O tratamento enzimático com as xilanases X1 e X2 em pastas XDE causa ainda a redução do índice kappa (~1 unidade), a diminuição da reversão da brancura (de 1,6 para 1,1 como *PC number*) e alterações pouco significativas na viscosidade, independentemente da pasta utilizada, sendo este efeito tanto maior quanto maior a atividade enzimática. A redução do índice kappa deveu-se a uma diminuição do teor de ácidos hexenurónicos e de lenhina residual, possivelmente ligada às xilana (*lignin-carbohydrate complexes*, LCC), como resultado da quebra de ligações na xilana e consequente dissolução de fragmentos que os contêm.

Sugestões para trabalho futuro:

Neste trabalho, devido ao elevado número de pastas a ensaiar para o tempo disponível, o tempo e a dose enzimática foram mantidos fixos. Por isso, estes aspectos deveriam ser estudados para uma melhor avaliação do desempenho das xilanases X1 e X2 e para a otimização das condições operatórias. Além disso, por falta de tempo, a xilanase X2 não foi testada em todas as pastas e nas condições mais próximas das condições fabris da torre de armazenamento de pasta. Em adição à caracterização efetuada de índice kappa e ácidos hexenurónicos, seria indicado fazer uma análise química mais completa das pastas tratadas e não tratadas com enzima, não só no que respeita à composição em açúcares (para comprovar a remoção de xilana da pasta), mas também ao tipo de cromóforos removidos, usando as metodologias apresentadas por Loureiro (2012). A avaliação da qualidade papelreira da pasta, em condições otimizadas, seria também de considerar, uma vez que as xilanas intervêm na capacidade de refinação das pastas e no estabelecimento de ligações interfibras aquando da formação do papel, podendo afetar deste modo as suas propriedades de resistência.

BIBLIOGRAFIA

Ahmed, S., Riaz, S. & Jamil, A., 2009. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 19-35.

Azevedo, M. A. B., 2011. *Diferentes processos de branqueamento da celulose e seus efeitos nas propriedades físicas e cristalinidade*. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Minas Gerais.

Bai, Y.; Wang, J.; Zhang, Z.; Yang, P.; Shi, P.; Luo, H.; Meng, K.; Huang, H.; Yao, B., 2010. A new xylanase from thermoacidophilic Alicyclobacillus sp. A4 with broad-range pH activity and pH stability. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 187-194.

Bajpai, P., 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, 141-194.

Bajpai, P., 2009. Xylanases . Em: M. Schaechter, ed. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press, 600-612.

Bajpai, P., 2012. *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*. New York: Springer.

Bajpai, P., 2012. *Environmentally Benign Approaches for Pulp Bleaching*. 2^a ed. Waltham/Oxford /Amsterdam: Elsevier.

Bajpai, P., 2014. *Xylanolytic Enzymes*. Oxford: Academic Press.

Bajpai, P. & Bajpai, P. K., 1997. Realities and Trends in Enzymatic Prebleaching of Kraft Pulp. Em: T. Scheper, ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Volume 56*. Berlin: Springer-Verlag, 1-32.

Baptista, C., 2006. *Influência das condições de cozimento sobre a estrutura da lenhina e a branqueabilidade da pasta kraft de pinus pinaster*. Tese de Doutorado: Universidade da Beira Interior.

Barroca, M. J. M. C., Marques, P. J. T. S., Seco, I. M. & Castro, J. A. A. M., 2001. Selectivity studies of oxygen and chlorine dioxide in the pre-delignification stages of a hardwood pulp bleaching plant. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40(24), 5680–5685.

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 326–338.

Biely, P., Mackenzie, C. R., Puls, J. & Schneider, H., 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Biotechnology*, 4, 731-733.

Biermann, J., 1996. *Handbook of pulping and papermaking*. 2^a ed. San Diego, California: Academic Press.

Bolton, T. S., 2008. *Hardwood Cell Wall Modifications by Acid Hydrolysis and Their Effects on Alkaline Delignification*. Tese Doutorado : Universidade de New York..

Borges, M. T.; Silva, C. M.; Colodette, J. L.; Alves, L. B.; Rodrigues, G. R.; Lana, L. C.; Tesser, F., 2010. Effect of Eucalyptus Kraft Pulp Enzyme Bleaching on Effluent Quality and Bio-Treatability. *Pulp & Paper Canada*, 111(4), 23-26.

Boudet, A., Lapierre, C. & Grima-Pettenati, J., 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytologist*, 129, 203-236.

Bruce, A. & Palfreyman, J., 1998. *Forest Products Biotechnology*. London: Taylor & Francis .

Buchert, J.; Teleman, A.; Harjunpää, V.; Tenkanen, M.; Viikari, L.; Vuourinen, T., 1995. Effect of cooking and bleaching on the structure of xylan in convention pine kraft pulp. *Tappi J.*, 78(11), 125-130.

Cadena, E., Vidal, M. T. & Torres, A. L., 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Biores. Technol.*, 101, 3554-3560.

Carreira, H., 2009. *Redução de grupos cromóforos responsáveis pela cor da pasta kraft*. Tese de Mestrado: Universidade de Aveiro.

Carvalho, M. G. V., 1999. *Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pastas kraft de Eucalyptus globulus*. Tese de Doutorado: Universidade de Coimbra.

Carvalho, M. G. V., Martins, A. A. & Figueiredo, M. M. L., 2003. Kraft pulping of Portuguese Eucalyptus globulus: Effect of process conditions on yield and pulp properties. *Appita J.*, 56(4), 267-274.

Celpa, 2012. *Boletim estatístico*, Lisboa: Indústria Papeleira Portuguesa.

Colodette, J. L.; Gomide, J. L.; Argyropoulos, D. S.; Robles, Y. A. M.; Almeida, J. M.; Mehlman, S. K.; Brito, A. G. H., 1999. Effect of pulping processes on bleachability with ECF, Z-ECF and TCF bleaching. *Appita J.*, 52(5), 268-374.

Daniel, A. I. D., 2003. *Influência da composição e estrutura dos componentes da pasta kraft na sua branqueabilidade*. Tese de doutoramento: Universidade de Aveiro.

Daniel, A. I. D., Neto, C. P., Evtuguin, D. V. & Silvestre, A. J. D., 2003. Hexenuronic acid contents of Eucalyptus globulus kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi J.*, 2(5), 3-8.

Dence, C. W. & Reeve, D. W., 1996. *Pulp Bleaching: Principles and Practice*. Atlanta, Georgia: TAPPI press.

Dhiman, S. S., Sharma, J. & Battan, B., 2008. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioRes.*, 3(4), 1377-1402 .

Dominguez, R.; Souchon, H.; Spinelli, S.; Dauter, Z.; Wilson, K. S.; Chauvaux S, Béguin, P.; Alzari, P. M., 1995. A common protein fold and similar active site in two distinct families of beta glycanases. *Nat. Struct. Biol.*, 2(7), 569-576.

Ehara, K., Tsutsumi, Y. & Nishida, T., 1998. Structural changes of residual lignin in softwood kraft pulp treated with manganese peroxidase. *J. Wood Sci.*, 44, 327-331.

Eiras, K., Colodette, J., Silva, V. & Barbosa, L., 2008. New insights on brightness stability of eucalyptus kraft pulp. *Nord. Pulp Paper Res. J.*, 23(1), 102-107.

Ek, M., Gellerstedt, G. & Henriksson, G., 2009 . *Pulping Chemistry and Technology*. 2 ed. Weinheim: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.

Ek, M., Gellerstedt, G. & Henriksson, G., 2009. *Pulp and Paper Chemistry and Technology, Wood Chemistry and Biotechnology, Volume 1*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG.

El-Sakhawy, M., 2005. Effect of bleaching sequence on paper ageing. *Polym. Degrad. Stab.*, 87(3), 419-423.

Esteghlalian, A. R.; Kazaoka, M. M.; Lowery, B. A.; Varvak, A.; Hancock, B.; Woodward, T.; Turner, J. O.; Blum, D. L.; Weiner, D.; Hazlewood, G. P., 2008. Prebleaching of softwood and hardwood pulps by a high performance xylanase belonging to a novel clade of glycosyl hydrolase family 11. *Enzyme Microb. Technol.*, 42, 395-403.

Esteves, C. G., 2013. *Efeito da aplicação de xilanases na redução do consumo de reagentes no branqueamento de pastas kraft de eucalipto*. Tese de Mestrado: Universidade de Coimbra.

Evtuguin, D. V., Tomas, J. L., Silva, A. M. S. & Neto, C. P., 2003. Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. *Carbohydr. Res.*, 338(7), 597-604.

Farrell, R., Viikari, L. & Senior, D., 1996. Enzyme treatments of Pulp. Em: C. W. Dence & D. Reeve, edits. *Pulp Bleaching – Principles and Practice*. Atlanta: TAPPI PRESS, 365-377.

Fengel, D. & Wegener, G., 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter.

Ferreira, P. J. T., 2000. *Estudos de pastas Kraft de Eucalyptus globulus características estruturais e aptidão papeleira*, Tese de Doutorado: Universidade de Coimbra.

Fontes, C.; Hazlewood, G. P.; Morag, E.; Hall, J.; Hirst, B. H.; Gilbert, H.J., 1995. Evidence for a general role for non-catalytic thermostabilizing domains in xylanases from thermophilic bacteria. *Biochem. J.*, 307, 151-158.

Gangwar, A. K., Prakash, N. T. & Prakash, R., 2014. Applicability of microbial xylanases in paper pulp bleaching: a review. *BioRes.*, 9(2), 3733-3754.

Garg, G.; Dhiman, S. S.; Mahajan, R.; Kaur, A.; Sharma, A., 2011. Bleach-boosting effect of crude xylanase from *Bacillus stearothermophilus* SDX on wheat straw pulp. *New Biotechnol.*, 28(1), 58-64.

Gellerstedt, G., 2007. *The chemistry of bleaching and post-color formation in kraft pulps*. 3rd ICEP - International Colloquium on Eucalyptus Pulp, CD Proceedings, Belo Horizonte, Brazil.

Gellerstedt, G. & Gustafsson, K., 1987. Structural Changes in Lignin During Kraft Cooking Part 5. Analysis of Dissolved Lignin by Oxidative Degradation. *J. Wood Chem. Technol.*, 7(1), 65-80.

Gellerstedt, G. & Lindfors, E., 1984. Structural Changes in Kraft Pulping (4). Phenolic Hydroxyl Groups in Wood and Kraft Pulps. *Svensk Papperstidning*, 87(15), R115-R118.

Gellerstedt, G. & Lindfors, E., 1984. Structural changes in lignin during kraft pulping. *Holzforschung*, 38, 151-158.

Gierer, J., 1970. The reactions of lignin during pulping. *Svensk Papperstidning*, 73(18), 571-596.

Gierer, J., 1985. Chemistry of Delignification, Part 1: General Concept and Reactions during Pulping. *Wood Sci. Technol.*, 19(4), 289-312.

Gierer, J., 1986. Chemistry of delignification. Part 2: Reactions of lignins during bleaching. *Wood Sci. Technol.*, 20, 1-33.

Grace, T. M., Leopold, B., Malcolm, E. W. & Kocurek, M., 1989. 'Alkaline Pulping', in *Pulp and Paper Manufacture*. 3 ed. Atlanta: 5, TAPPI/CPA.

Guimarães, N. C. A.; Sorgatto, M.; Nogueira, S. C. Betini, J. H. A.; Zanoelo, F. F.; Marques, M. R.; Polizeli, M. T. M.; Giannesi, G. C., 2013. Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. *SpringerPlus*, 2, 1-7.

Gunnarsson, P.-I. & Ljunggren, S., 1996. Formation of chlorinated organic material and chlorate during chlorine dioxide prebleaching of kraft pulp: Effects of sodium chloride, charge of chlorine dioxide and pH. *J. Pulp Pap. Sci.*, 22(12), J457-J463.

Gustafson, R. R., Sleicher, C. A., McKean, W. T. & Finlayson, B. A., 1983. Theoretical model of kraft pulping process. *Ind. Eng. Chem. Process. Des. Dev.* , 22, 87-96.

Gustavsson, C. A. S. & Al-Dajani, W. W., 2000. The Influence of Cooking Conditions on the Degradation of Hexenuronic Acid, Xylan, Glucomannan and Cellulose during Kraft Pulping of Softwood. *Nord. Pulp Paper Res. J.*, 15(2), 160-167.

Haki, G. D. & Rakshit, S. K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores. Technol.*, 89, 17-34.

Hon, D. N.-S. & Shiraishi, N., 1991. *Wood and Cellulosic Chemistry*. New York: Marcel Dekker.

ICNF, 2013. *IFN6 – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares*, Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.

Jeffries, T. W., 1992. Enzymatic treatments of pulps . Em: R. Rowell, T. P. Schultz & R. Narayan, edits. *Emerging technologies for materials and chemicals from biomass. ACS Symposium Series 476*. Washington D.C.: Amer. Chem. Society, 313-329.

Jiang, Z.-H., Lierop, B. & Berry, R., 2000. Hexenuronic Acid Groups in Pulping and Bleaching Chemistry. *Tappi J.*, 83(1), 167-175.

Kantelinen, A.; Hortling, B.; Sundquist, J.; Linko, M.; Viikari, L., 1993. Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung*, 47(4), 318-324.

Katagiri, N., Tsutsumi, Y. & Nishida, T., 1995. Katagiri, N.; Tsutsumi, Y.; Nishida, T. Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 617-622.

Khan, M. R., 2011. *Advances in Clean Hydrocarbon Fuel Processing: Science and Technology*. Philadelphia, USA: Woodhead Publishing.

Kibblewhite, R. P., Bawden, A. D. & Hughes, M., 1991. Hardwood market kraft fibre and pulp qualities. *Appita J.*, 44(5), 325-332.

Kirk, O., Borchert, T. V. & Fuglsang, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnol.*, 13(4), 345-351.

Kirk, R. E., Othmer, D. F. & Mark, H. F., 2005. *Encyclopedia of Chemical Technology Vol. 10*. 5 ed. New Jorsey: John Wiley and Sons.

Knob, A., Terrasan, C. & Carmona, E., 2010. β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 389-407.

Kolar, J., Lindgren, B. & Pettersson, B., 1983. Chemical reactions in chlorine dioxide stages of pulp bleaching. *Wood. Sci. Technol.*, 17(2), 117-128.

Kuhad, C. & Sigh, A., 2007. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects..* Mumbai, India: I.K. International.

Kulkarni, N. & Rao, M., 1996. Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *J. Biotechnol.*, 51, 167-173.

Lachenal, D.; Chirat, C.; Benattar, N.; Hamzeh, Y.; Marlin, N.; Mateo, C.; Brochier, B., 2005. Influence of pulp colour on bleachability. Ways to improve the bleaching response of alkaline pulp. *ATIP*, 59(6), 6-11.

Lachenal, D., Fernandes, J. & Froment, P., 1995. Behavior of residual lignin in kraft pulp during bleaching. *J. Pulp Paper Sci.*, 21(5), J173-J177.

Laine, C., 2005. *Structures of Hemicelluloses and Pectins in Wood and Pulp*. Dissertation for the degree of Doctor : Helsinki University of Technology.

Lawoko, M.; Berggren, R.; Berthold, F.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G., 2004. Changes in the lignincarbohydrate complex in softwood kraft pulp during kraft and oxygen delignification. *Holzforschung*, 58(6), 603-610.

Lawoko, M., Henriksson, G. & Gellerstedt, G., 2003. New Method for Quantitative Preparation of Lignin-Carbohydrate Complex from Unbleached Softwood Kraft Pulp: Lignin-Polysaccharide Networks I. *Holzforschung*, 57, 69-74.

Lawoko, M., Henriksson, G. & Gellerstedt, G., 2005. Structural differences between the lignincarbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps. *Biomacromol.*, 6(6), 3467-3473.

Lehtimaa, T.; Tarvo, V.; Kuitunen, S.; Jääskeläinen, A-S.; Vuorinen, T., 2010. The Effect of Process Variables in Chlorine Dioxide Prebleaching of Birch Kraft Pulp. Part 1. Inorganic Chlorine Compounds, Kappa Number, Lignin, and Hexenuronic Acid Content. *J. Wood Chem. Technol.*, 30(1), 1-18.

Lemeune, S., Jameel, H., Chang, H.-M. & Kadla, J. F., 2004. Effects of Ozone and Chlorine Dioxide on the Chemical Properties of Cellulose Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93, 1219-1223.

Liittä, T. & Tamminen, T., 2007. *How to evaluate the kraft pulp brightness stability?*. Belo Horizonte, Brazil., 3rd International Colloquium on Eucalyptus Pulp .

Li, J., 2011. *Isolation of lignin from wood*. Bachelor's Thesis: Saimaa University of Applied Sciences.

Li, J. B. & Gellerstedt, G., 1997. The contribution to kappa number from hexeneuronic acid groups in pulp xylan. *Carbohydr. Res.*, 302, 213-218.

Lin, X-Q.; Han, S-Y.; Zhang, N.; Hu, H.; Zheng, S-P.; Ye, Y-R.; Lin, Y., 2013. Bleach boosting effect of xylanase A from *Bacillus halodurans* C-125 in ECF bleaching of wheat straw pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, 52, 91– 98.

Loureiro, P., 2012. *On the role of xylan in the final bleaching of Eucalyptus globulus kraft pulps*. Tese de Mestrado: Universidade de Coimbra.

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. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 381–390.

Loureiro, P. E. G., Fernandes, A. J. S., Carvalho, M. G. V. S. & Evtuguin, D. V., 2010. The assessment of chromophores in bleached cellulosic pulps employing UV-Raman spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 345(10), 1442-1451.

Loureiro, P., Fernandes, A., Furtado, F. & Carvalho, M. E. D., 2011. UV-resonance Raman micro-spectroscopy to assess residual chromophores in cellulosic pulps. *J. Raman Spectrosc.*, 42(5), 1039-1045.

Lundgren, K. R.; Bergkvist, L.; Hogman, S.; Joves, H.; Ericksson, G.; Bartfai, T.; Laan, J.; Rosenberg, E.; Shoham, Y., 1994. TCF mill trial on softwood pulp with korsnas thermostable and alkaline stable xylanase T6. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 365-368.

Maltha, R. A. C., Barbosa, L. C. A., Azevedo, M. A. B. & Colodette, J. L., 2011. Behavior of Eucalyptus Kraft Pulp Extractives Components across ECF Bleaching and Their Impact on Brightness Reversion. *J. Wood Chem. Technol.*, 31, 103-120.

Moss, G. P., 2014. *Enzyme Nomenclature*. Acedido em 25 Julho 2014. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.

NCASI, 2013. *Effects of decreased release of chlorinated compounds on energy use. Energy efficiency of different bleaching sequences*. National Council for Air and Stream Improvement.

Neto, C. P., Evtuguin, D. V., Furtado, F. P. & Sousa, A. P. M., 2002. Influence of wood pulping conditions and unbleached pulp composition and structure on the ECF bleachability of hardwood kraft pulps. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41, 6200-6206.

Nguyena, D.; Zhanga, X.; Jianga, Z-H.; Audet, A.; Paicea, M. G.; Renauda, S.; Tsangb, A., 2008. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Accessory enzymes degrade hexenuronic acids. *Enzyme Microb. Technol.*, 43, 130-136.

Niemelä, K., 1989a. GLC-MS studies on pine kraft black liquors part V. Identification of catechol compounds. *Holzforschung*, 43(2), 99-103.

Novozymes®, 2010. *Novozymes. All Rights Reserved - Enzymes at work*. Acedido em 02 Junho 2014 . Disponível em: http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/documents/enzymes_at_work.pdf.

Paice, M. G., Bernier, R. & Jurasek, L., 1988. Viscosity enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioengineer.*, 32, 235-239.

Parham, R., 1983. *Pulp and paper manufacture - properties of fibrous raw materials and their preparation for pulping*. Montréal: In The Joint Textbook Committee of the Paper Industry TAPPI / CPPA.

Pedrazzi, C.; Colodette, J. L.; Gomide, J. L.; Oliveira, R.C.; Muguet, M. C. S., 2011. Influência do processo de polpação e do conteúdo de xilanas da polpa na branqueabilidade. *O papel*, 72(5), 37-55.

Pedroso, A. I. & Carvalho, M. G., 2003. Alkaline pulping of Portuguese Eucalyptus globulus: Effect on hexenuronic acid content. *J. Pulp Pap. Sci.*, 29(5), 150-154.

- Pettersen, R., 1984. The Chemistry of Solid Wood. *Amer. Chem. Society*, 207, 57–126.
- Pettersson, E. A. K., Ragnar, M. & Lindstrom, M. E., 2002. Kraft cooking characteristics and hexenuronic acid concentration of pulps from Eucalypt and other hardwood species. *Nord. Pulp Paper Res. J.*, 17(3), 222-227.
- Pinto, P., 2005. *Influência da estrutura química dos componentes da madeira no seu desempenho nos processos de produção de pastas celulósicas. Estudo comparativo entre Eucalyptus globulus e outras folhosas..* Tese de Doutorado: Universidade de Aveiro.
- Pinto, P. C., Evtuguin, D. V. & Neto, C. P., 2005. Effect of structural features of wood biopolymers on hardwood pulping and bleaching performance. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44(26), 9777-9784.
- Pinto, P. C., Evtuguin, D. V. & Neto, C. P., 2005. Structure of hardwood glucuronoxylans: modifications and impact on pulp retention during wood kraft pulping. *Carbohydr. Polym.*, 60(4), 489-497.
- Pinto, P., Evtuguin, D. V., Neto, C. P. & Silvestre, A. J. D., 2002. Behavior Of Eucalyptus Globulus Lignin During Kraft Pulping. I. Analysis By Chemical Degradation Methods. *J. Wood Chem. Technol.*, 22(2-3), 93-108.
- Potthast, A., 2006. Chemistry of kraft pulping. Volume 1. Em: H. Sixta, ed. *Handbook of Pulp*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 164-185.
- Purich, D. L. & Allison, R. D., 2000. *Handbook of biochemical kinetics*. London: Academic Press .
- Ragauskas, A. J., 2007. *Basics of Kraft Pulping*. Institute of Paper Science and Technology: Georgia Institute of Technology..
- 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. *Biores. Technol.*, 96(1), 21-30.
- Roncero, M., Torres, A., Colom, J. & Vidal, T., 2000. Effects of xylanase treatment on fibre morphology in totally chlorine free bleaching (TCF) of Eucalyptus pulp. *Process Biochem.*, 36, 45-50.
- Rosenau, T.; Potthast, A.; Kosma, P.; Suess, H. U.; Nimmerfroh, N., 2007. Isolation and identification of residual chromophores from aged bleached pulp samples. *Holzforschung*, 61(6), 656-661.

Rosli, W., Law, K., Zainuddin, Z. & Asro, R., 2004. Effect of pulping variables on the characteristics of oil-palm frond-fiber. *Biores. Technol.*, 93, 233-240.

Rowell, R., 2012. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. 2^a ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Rydholm, S., 1985. *Pulping Processes*. New York, : John Wiley & Sons.

Saake, B., Clark, T. & Puls, J., 1995. Investigations on the reaction mechanism of xilanases and mannanases on sprucewood chemical pulps. *Holzforschung*, 49(1), 60-68.

Schwanninger, M., 2006. Chemistry of Chlorine Dioxide Treatment. Em: H. Sixta, ed. *Handbook of Pulp. Volume 2*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 745-770.

Sêco, I. M. C. L., 2006. *Reversão da brancura em pastas kraft de Eucalyptus globulus*. Tese de Mestrado: Universidade de Aveiro.

Sêco, I. M. C. L., Neto, C. P. & Silvestre, A. J. D., 2008. Strategies to reduce the brightness reversion of industrial ECF bleached Eucalyptus globulus kraft pulp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83, 218-226.

Sharalov, A. & Pereira, H., 2009. Impact of hexenuronic acids on xylanase-aided bio-bleaching of chemical pulps. *Biores. Technol.*, 100, 3069-3075.

Shatalov, A. & Pereira, H., 2008. Effect of xylanases on peroxide bleachability of eucalypt. *Biochem. Engineer. J.*, 40, 19-26.

Shobhit, M., Satish, K. & Rao, N. J., 2005. *Action of xylanase prebleaching on wheat straw and oxygen delignified wheat straw soda pulps – Probable mechanisms 59th Appita Annual Conference and Exhibition: Incorporating the 13th ISWFPC*. Auckland, New Zealand, 631-638.

Silveira, M. L. & Milagres, A. F., 2009. *Obtenção e caracterização de lignina de madeiras*. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.

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. *Nord. Pulp Paper Res. J.*, 22(2), 172-176.

Sixta, H.; Süß, H-U.; Potthast, A.; Schwanninger, M.; Krotscheck, A. W., 2006. Pulp bleaching. Em: H. Sixta, ed. *Handbook of Pulp. Volume 2*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH &Co. KGaA, 609-932.

- Sjöström, E., 1989. The origin of charge on cellulosic fibers 4(2) 90-93. *Nord. Pulp Paper Res. J.*, 4(2), 90-93.
- Sjöström, E., 1993. *Wood chemistry: Fundamentals and Applications*. 2^a ed. San Diego, California: Academic Press.
- Sjöström, E. & Alén, R., 1999. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Skals, P. B., Krabek, A., Nielsen, P. H. & Wenzel, H., 2008. Environmental assessment of enzyme assisted processing in pulp and paper industry. *Int. J. LCA*, 13(2), 124-132.
- Sousa, J. I. T., 2012. *Avaliação de um tratamento redutor e enzimático no branqueamento final de pastas kraft de eucalipto*. Dissertação de Mestrado: Universidade de Coimbra.
- Suess, H. U., 2010. *Pulp Bleaching Today*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Svenson, D. R., Jameel, H. & Chang, H.-M. K. J. F., 2006. Inorganic Reactions in Chlorine Dioxide Bleaching of Softwood Kraft Pulp. *J. Wood Chem. Technol.*, 26, 201-213.
- Svenson, D. R., Kadla, J. F., Chang, H.-M. & Jameel, H., 2002. Effect of pH on the inorganic species involved in a chlorine dioxide reaction system. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 41(24), 5927–5933.
- Tolan, J. S. & Guenette, M., 1997. Using Enzymes in Pulp Bleaching: Mill Applications. Em: K. L. Eriksson, ed. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology. Volume 57*. New York: Springer, 289-310.
- Tripathi, G., 2010. *Cellular and Biochemical Sciences*. New Delhi: I K International Publishing House .
- Valente, A. C., Sousa, A. P. M., Furtado & Carvalho, A. P., 1992. Improvement Program for Eucalyptus globulus at Portucel: Technological component. *Appita J.*, 45, 403-407.
- Valenzuela, S. V.; Valls, C.; Roncero, M. B.; Vidal, T.; Diaz, P.; Pastor, J., 2013. Effectiveness of novel xylanases belonging to different GH families on lignin and hexenuronic acids removal from specialty sisal fibres. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 89, 401-406.
- 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 Sci. Technol.*, 45(3), 433-448.
- Valls, C., Vidal, T. & Roncero, M. B., 2010. Boosting the effect of a laccase–mediator system by using a xylanase stage in pulp bleaching. *J. Hazard. Mater.*, 177, 586-592.

Vidal, G. & Diez, M., 2003. Influence of feedstock and bleaching technologies on methanogenic toxicity of kraft mill wastewater. *Water Sci. Technol.*, 48(6), 149-155.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. & Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13,335-350.

Walker, J., 2006. *Primary Wood Processing: Principles and Practice*. 2^a ed. Netherlands: Sringer.

Watanabe, T., 1995. Important properties of lignin-carbohydrates complexes (LCCS) in environmentally safe paper making. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 7(33), 57-68.

Watanabe, T., 2003. Analysis of native bonds between lignin and carbohydrate by specific chemical reactions. Em: T. Koshijima & T. Watanabe, edits. *Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues, Springer Series in Wood Science*. Heidelberg: Springer-Verlag, 91-130.

Wedin, H., Ragnar, M. & Lindström, M. E., 2007. *On the role of xylan in oxygen delignification*. 3rd International Colloquium on Eucalyptus Pulp (ICEP), Belo Horizonte, Brazil, KTH, School of Chemical Science and Engineering (CHE), Fibre and Polymer Technology, Wood Chemistry and Pulp Technology.

Woolridge, E. M., 2014. Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. *Catalysts*, 4, 1-35.

Yang, S.-T., El-Enshasy, H. A. & Thongchul, N., 2013. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc..

Young, R. A. & Akhtar, M., 1998. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley & Sons.

ANEXOS

ANEXO I. DIAGRAMA DE PROCESSO

A Figura I representa um esquema típico da zona de lavagem de pasta após o cozimento, onde se localiza a torre de armazenamento de pasta crua a alta consistência (HC – *High Consistency*) que poderá ser utilizada como estágio enzimático no caso da implementação de xilanases à escala industrial. Caso a fábrica utilize estágio de oxigênio na sequência de branqueamento, o estágio enzimático é posicionado na torre de armazenamento de pasta após o estágio de oxigênio. Na Figura I estão também apresentadas as condições típicas das torres de armazenamento de pasta crua (1) e pré-deslenhificada com oxigênio (2).

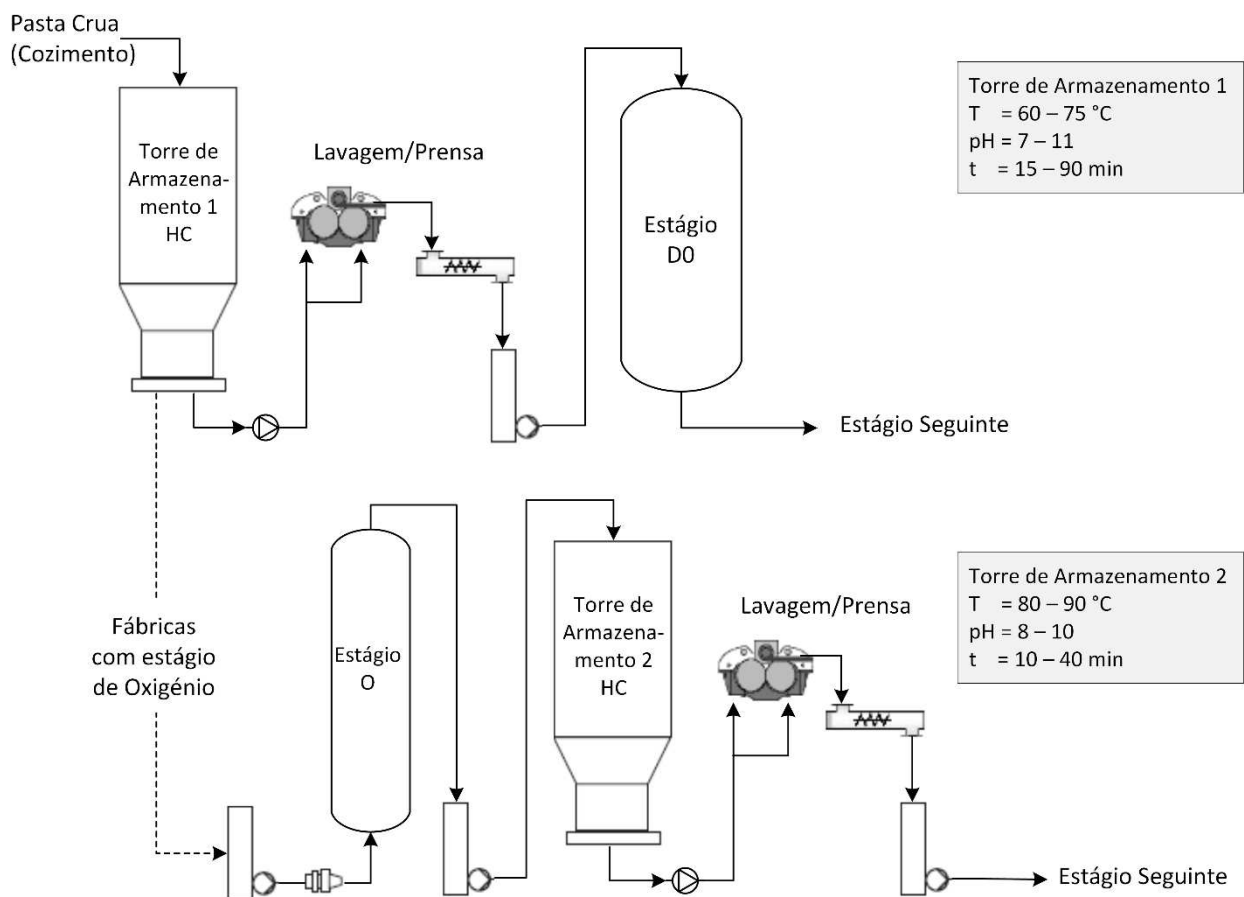


Figura I. Esquema típico da zona de lavagem de pasta após o cozimento.

ANEXO II. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

II.1. PREPARAÇÃO DOS ENSAIOS

No reator (saco de plástico) são introduzidos os reagentes correspondentes ao estágio de branqueamento que se pretende efetuar – solução enzimática ou Dióxido de Cloro (ClO₂) ou Peróxido de Hidrogénio e Hidróxido de Sódio (H₂O₂ e NaOH) e a pasta. É necessário ter em conta o conceito de consistência e de carga para conhecer as quantidades de reagentes a adicionar:

$$\text{Consistência (\%)} = \frac{\text{massa pasta seca (g)}}{\text{massa suspensão (g)}} \times 100 \quad (\text{I})$$

$$\text{Carga (\%)} = \frac{\text{massa de reagente (g)}}{\text{massa pasta seca (g)}} \times 100 \quad (\text{II})$$

II.1.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SECURA E DA QUANTIDADE DE PASTA HÚMIDA

Pesar 3 g de pasta húmida numa caixa. Colocar a caixa destapada e a tampa na estufa a 105 °C ± 1 °C durante um período mínimo de 4 e um máximo de 24 horas. Colocar a caixa, agora tapada, num exsiccador durante 20 a 30 minutos, à temperatura ambiente. Após arrefecimento, pesar a caixa com a amostra da pasta, tarar a balança, retirar a pasta e pesar novamente a caixa vazia.

O teor de secura é dado pela razão entre a massa de pasta seca e a massa de pasta húmida. O procedimento é efetuado em duplicado e determina-se a média dos valores obtidos.

$$\text{teor de secura} = \frac{m_{\text{pasta seca}} \text{ (g)}}{m_{\text{pasta húmida}} \text{ (g)}} \quad (\text{III})$$

Todos os ensaios foram efetuados com 20 g de pasta seca. A pasta armazenada contém alguma água, pelo que é necessário calcular a massa de pasta húmida a pesar, tendo em conta a definição de teor de secura (III).

II.1.2. CÁLCULO DA QUANTIDADE DE REAGENTES

Solução Enzimática

A dose enzimática utilizada, em mL de solução enzimática (tal qual como é fornecida) por tonelada de pasta “*air dry*” (correspondente a uma pasta com teor de humidade de 10%), deve ser transposta para as condições laboratoriais, onde se utilizam 20 g de pasta seca por ensaio. Assim,

para calcular o volume de solução enzimática a usar, tal qual como é fornecida, aplica-se a Equação IV:

$$V_{enzima}(\text{mL}_{enzima}) = \frac{\text{dose enzimática}(\text{mL}_{enzima}) \times 20(\text{g}_{\text{pasta seca}})}{0,9 \times 10^6(\text{g}_{\text{pasta seca}})} \quad (\text{IV})$$

A utilização de enzimas para branqueamento à escala laboratorial é efetuada em pequenas quantidades, o que faz com que seja necessário fazer uma diluição da enzima para diminuir os erros associados às medições. Procedeu-se a uma diluição da enzima de 1:1000. O volume de solução enzimática a medir deve ter em conta esta diluição:

$$V_{\text{solução enzimática}} = V_{enzima} \times 1000 \quad (\text{V})$$

Para se conhecer a massa de solução enzimática, para posterior substituição na Equação IX, pesa-se o volume de solução enzimática calculado.

ClO₂ ou H₂O₂ e NaOH

Para calcular a massa de reagente, é necessário definir a carga alcalina a utilizar:

$$m_{\text{reagente}}(\text{g}) = \frac{m_{\text{ps}}(\text{g}) \times \text{carga alcalina}}{100} \quad (\text{VI})$$

Uma vez que os reagentes são usados em pequenas quantidades é necessário preparar uma solução com uma concentração perfeitamente conhecida. Assim,

$$m_{\text{solução reagente}}(\text{g}) = \frac{m_{\text{reagente}} \times \rho_{\text{solução reagente}}}{[\text{reagente}]} \quad (\text{VII})$$

A massa volúmica da solução de reagente, $\rho_{\text{solução reagente}}$ (g/L) determina-se pesando a massa correspondente a 10 mL de solução.

Água/Tampão a Adicionar

Os ensaios foram efetuados a 10% de consistência, em que 20 g de pasta seca por ensaio são suficientes para posterior análise. Sendo,

$$m_{\text{suspensão}} = \frac{m_{\text{pasta seca}}}{\text{consistência}(\%)} \times 100 \quad (\text{VIII})$$

a massa de suspensão será 200 g.

Nos branqueamentos com enzimas foi adicionada solução tampão em substituição da água para manter o pH estável. Nos restantes estágios de branqueamentos foi adicionada água destilada. A massa de água/tampão a adicionar será:

$$m_{\text{água/tampão adic.}} = m_{\text{suspensão}} - \sum m_{\text{solução enzimática/reagente}} - m_{\text{pasta húmida}} \quad (\text{IX})$$

II.1.3. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO

O estágio de branqueamento com enzimas exige um controlo apertado do pH da suspensão. Desta forma, para se assegurar um pH da suspensão ao longo do estágio enzimático foi preparado um tampão Britton-Robinson (Tampão B-R).

- O tampão Britton-Robinson pode ser preparado para uma gama de pH de 4 a 11,6;
- Misturar a Parte A e a Parte B segundo as razões indicadas na Tabela VIII;
- Ajustar o pH da solução preparada para o valor desejado adicionando algumas gotas de NaOH 1N ou 5N ou usar um dos ácidos na mistura se se pretender diminuir o pH.

Pesar as quantidades apresentadas na Tabela VII e perfazer o volume de 1 L para cada uma das partes com água destilada:

Tabela I. Massa de cada composto para preparar 1 L de tampão B-R.

			M (g/mol)	Massa (g)	Pureza (%)
Parte A	0,04 M H ₃ PO ₄	Ácido Orto-fosfórico	98,00	4,61	85
	0,04 M CH ₃ COOH	Ácido Acético	60,05	2,40	100
	0,04 M H ₃ BO ₃	Ácido Orto-bórico	61,83	2,47	100
Parte B	0,2 M NaOH	Hidróxido de Sódio	40,00	8,00	100

Misturar cada uma das partes nas razões indicadas na Tabela VIII:

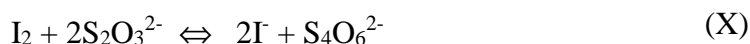
Tabela II. Quantidade de cada parte (A ou B) para preparar o tampão B-R com determinado pH.

pH	Parte A (L)	Parte B (L)
7	0,656	0,344
8	0,624	0,376
9	0,596	0,406

Para ajustar o pH final adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio 1M, no caso de se pretender aumentar o pH, ou algum dos ácidos da parte A para diminuir o pH.

II.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO CONCENTRADO

A determinação da concentração de ClO₂ é efetuada 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 reação 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 | - Agitador magnético/magnetes |
| - Medidor de pH | - Pipetas Pasteur |
| - Pipeta de 5,0 mL | - Provetas de 25 e 50 mL |
| - Copos de 250 mL | - Pompete |

Procedimento Experimental

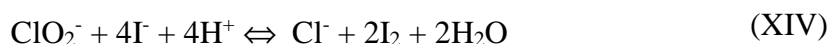
- Medir 25 mL de iodeto de potássio a 10% e cerca de 50 mL de água destilada e introduzir os dois volumes num copo de 250 mL. Juntar à solução anterior uma quantidade de tampão de borato (pH 8,3) que se verifique apropriada para a reação ocorrer em meio neutro ou ligeiramente alcalino (~3x pipetas Pasteur). Adicionar 5,0 ml (no caso do residual, adicionar 25 ml) de solução de dióxido de cloro a titular (esta operação deve ser efetuada 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 0,0001g, 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 reações:





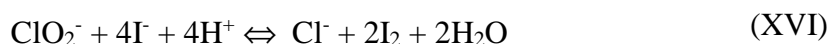
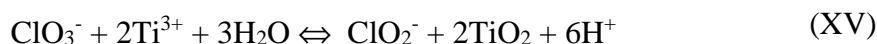
- O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio adicionando-se 1 ml de cozimento de amido como indicador após a solução ficar amarelo claro. O volume de tiosulfato gasto quando a solução muda de violeta para incolor é designado por V_1 . (levar a contagem de volume de titulante a zero.)

- Adiciona-se em seguida ácido clorídrico para o pH da solução ficar abaixo de 2, ocorrendo a seguinte reação:



- A solução fica novamente violeta, e o iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio. O volume gasto nesta segunda titulação é designado por V_2 . (levar a contagem de volume de titulante a zero.)

- Adiciona-se novamente ácido clorídrico para descer o pH da solução até à gama de 0,7-1,0. De seguida adiciona-se excesso de solução de cloreto de titânio a 1,5% (~3 mL). A solução fica novamente violeta porque ocorrem as seguintes reações:



- O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio, e o volume gasto na titulação é designado por V_3 .

Cálculos

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

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

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:

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

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

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:

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

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

Nos dois casos (a) e (b), a concentração de clorato (ClO_3^-) pode ser calculada a partir da expressão:

$$C_{\text{ClO}_3^-} = 1000 \cdot M \cdot \frac{V_3}{4 \cdot V_a} \cdot 83,5 \quad (\text{mg/l}) \quad (\text{XXII})$$

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;

V_1, V_2, V_3 = 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).

No branqueamento, a carga de dióxido de cloro é regularmente designada como ‘cloro ativo’, pois permite a utilização de uma única expressão para descrever a adição combinada de cloro e dióxido de cloro. Apesar do cloro não ser mais utilizado nos dias que correm, a expressão é ainda amplamente utilizada. O estado de oxidação do átomo de cloro na molécula de ClO_2 é +4, podendo aceitar um total de cinco elétrons para a sua redução a íon cloreto. Com base na sua massa molecular de 67,45 g/mol, a sua massa equivalente é 13,49 g/mol (67,45/5). A massa molecular do cloro é 70,91 g/mol, sendo a sua massa equivalente 35,46 g/mol (70,91/2). Assim, a carga de dióxido de cloro pode ser expressa como cloro ativo através da multiplicação da massa de dióxido de cloro por um fator de 2,63 (35,46/13,49) (Suess, 2010; Sixta et al., 2006).

II.1.5. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NaOH

Reagentes

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

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 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 eletrodo 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 eletrodo com o cuidado de submergir a cabeça do eletrodo 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;
- Registrar o valor do ponto de equivalência obtido (volume de titulante gasto em mL e o pH), presente no visor do TRITINO;
- Lavar os elétrodos com água destilada e limpá-los;
- Efetuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5ml de volume de titulante).

Cálculos

Cálculo da concentração de NaOH na solução original:

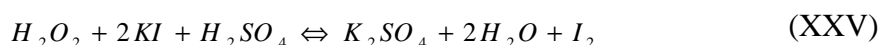
$$[NaOH] = \frac{V_{HCl} \times [HCl]}{V_{toma}} \times \text{factor de diluição} \times 40 \quad \left(\frac{g}{L} \right) \quad (XXIII)$$

em que $[HCl] = 0,01 \text{ mol/L}$ e V_{HCl} é o volume gasto de titulante, em mL; o fator de diluição é $(500/20 = 25)$; $V_{toma} = 25 \text{ mL}$; a massa molar $M(\text{NaOH}) = 40 \text{ g/mol}$ permite expressar a concentração em g/L. Numa forma condensada, tem-se:

$$[NaOH] = V_{HCl} \times 0,4 \quad \left(\frac{g}{L} \right) \quad (XXIV)$$

II.1.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO CONCENTRADO

Dado que o peróxido de hidrogénio se decompõe muito facilmente, após a preparação deste composto é necessário determinar o valor real da sua concentração inicial, de modo calcular a quantidade de solução a utilizar no estágio de peróxido, face às condições operatórias previamente definidas. Esta determinação é feita por iodometria, em que se utiliza molibdato de amónio que atua como catalisador, acelerando a reação de formação de iodo livre:



Reagentes

- H_2SO_4 , 2 M (4 N)
- $Na_2S_2O_3$, 0.1 M (0,1 N)
- KI, 1 M
- H_2O_2 ($\cong 20 \text{ g/L}$)
- Solução de Molibdato de Amónio (5%)

Material

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

Procedimento experimental

- Colocar no TITRINO a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M);
- 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);

NOTA: preparação de uma solução de H_2O_2 , caso se parta de uma solução de H_2O_2 30% (w/w): medir 66,7 mL da solução para um balão volumétrico de 1 L.

- Introduzir num copo de 150 mL, 40 mL de ácido sulfúrico, 3 gotas de molibdato de amónio e um magnete;
- Adicionar 10 mL da solução diluída de peróxido de hidrogénio preparada no ponto 2 e 15 mL de iodeto de potássio;
- Colocar o copo no TRITINO (a utilizar em modo DOS), mergulhando a ponta doseadora;
- Após ligar a agitação, iniciar a titulação do premindo DOS (antentar no controlo do caudal de titulante);
- 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;
- Continuar o doseamento até ocorrer a mudança de cor azul/violeta-incolor: ponto de equivalência atingido;
- Registrar o volume gasto de titulante;
- Lavar a ponta doseadora com água destilada.
- Fazer duplicado e obter o valor médio.

Cálculos

A concentração inicial de peróxido de hidrogénio é dada por:

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

em que $[Na_2S_2O_3] = 0,1 \text{ mol/L}$ e $V_{Na_2S_2O_3}$ é o volume gasto de titulante, em mL; o factor de diluição é $(500/25 = 20)$; $V_{\text{toma}} = 10 \text{ mL}$; 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 reação de titulação: $n(H_2O_2):n(Na_2S_2O_3) = 1:2$. Numa forma condensada tem-se:

$$[H_2O_2] = V(Na_2S_2O_3) \times 3,4 \left(\frac{g}{L} \right) \quad (\text{XXVIII})$$

II.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL DE BRANQUEAMENTO

Material

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| - Balança analítica | - Rede metálica |
| - Copos para pesagem e mistura | - Frasco com tampa |
| - Sacos de plástico | - Placa de aquecimento |
| - Banho termostático | - Recipiente para aquecimento da água |
| - Pesos | - Etiquetas |
| - Cronómetro | - Termómetro |
| - Recipiente de plástico com gelo | - Vareta de vidro |

Reagentes

- Estágio X: solução enzimática e tampão B-R no estágio X
- Estágio D: dióxido de cloro e água destilada
- Estágio Ep: hidróxido de sódio, peróxido de hidrogénio e água destilada

Procedimento Experimental

O procedimento experimental é semelhante para cada um dos três estágios de branqueamentos efetuados (X, D e Ep), diferenciando-se apenas os reagentes a introduzir e a forma de preparação, tal como indicado:

- Ligar o banho termostático na temperatura e agitação pretendida.
- Pesar a pasta húmida correspondente às 20 g de massa de pasta seca (tendo em conta o teor de secura) diretamente no saco.
- Estágio X: em primeiro lugar, determinar a massa correspondente ao volume de enzima (previamente diluída) que é necessário para o branqueamento, tendo em conta a carga escolhida (medir o respetivo volume, com a pipeta automática, para um copo previamente tarado e registar o valor). Depois de se determinada a massa de enzima a adicionar, determinar a massa de tampão

necessário ao branqueamento (Equação IX) e pesar esse valor num gobelé. Colocar a solução enzimática e o tampão num frasco de vidro com tampa, agitar, e colocar no banho a aquecer durante 20 minutos. Após os vinte minutos colocar a pasta no banho a aquecer durante 5 minutos.

- Estágio D e EP: Pesar os reagentes necessários ao branqueamento num gobelé, deixando o H_2O_2 (caso seja utilizado) para último. Registrar os valores exatos. (As massas dos reagentes são determinadas como explicado em cima) Misturar os reagentes e adicioná-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, e misturar bem a pasta com a solução de reagentes com as mãos depois de o saco estar fechado.

- Colocar o saco com a pasta no interior de outro e com o auxílio de um disco, submergir o saco com a mistura no banho e começar a contagem do tempo.

- Passado o tempo definido para o branqueamento retirar o saco do banho e colocá-lo num banho de gelo durante aproximadamente 15 minutos.

- Depois de arrefecer no gelo, abrir o saco e filtrar bem a pasta com auxílio de uma rede metálica. Guardar o filtrado num frasco tapado em gelo para medição do pH.

- Lavar a pasta com 3 litros de água destilada, a uma temperatura de 35°C, repartidos em 3 partes iguais de forma a realizar 3 lavagens.

- Guardar a pasta num saco de plástico, após ter sido espremida à mão e esfarelada, e colocá-la no frigorífico devidamente identificada ou inicial o procedimento de branqueamento novamente caso se pretenda prosseguir na sequência de branqueamento.

II.3. FILTRADO

II.3.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CLORO RESIDUAL

O procedimento de determinação da concentração de Dióxido de Cloro Residual é idêntico ao descrito no Anexo III.2.4.

II.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH RESIDUAL

Para a determinação da quantidade de OH^- residual é necessário efetuar-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~100mL;
- 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 reação dos componentes da pasta com o Peróxido de Hidrogénio e o NaOH;

NOTA: Caso não haja residual suficiente proceder de acordo com a Tabela IX:

Tabela III. Volume de cloreto de bário a utilizar em função do volume de filtrado disponível.

Volume de filtrado, V_f (mL)	Volume de cloreto de bário, V_{BaCl_2} (mL)	Volume total, V_t (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 elétrico 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 elétrico com o cuidado de submergir a cabeça do elétrico 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 selecionado faz automaticamente esta avaliação);
- Efetuar duas réplicas concordantes (diferença menor que 0.5 mL de volume de titulante).

Cálculos

Cálculo da concentração de OH⁻ no licor residual.

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

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

II.3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÉNIO RESIDUAL

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

Reagentes

- | | |
|--|---|
| - H ₂ SO ₄ , 2 M (4 N) | - Na ₂ S ₂ O ₃ , 0.1 M (0,1 N) |
| - KI, 1 M | - Cozimento de amido. |
| - Solução de Molibdato de Amónio (5%) | |

Material

- | | |
|---|---------------------|
| - Titrino | - Proveta de 100 mL |
| - Balão Volumétrico de 25, 1000 e 2000 mL | - Magnetes |
| - Copo de 150 mL | - Pompette |

- Frascos com Kipp de 15 e 20 mL
- Pipeta volumétrica de 10 mL
- Pipeta de Pasteur
- 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:

- Colocar no TITRINO a solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M);
- Introduzir num copo de 100 mL, 40 mL de ácido sulfúrico, 3 gotas de molibdato de amónio e um magnete;
- Adicionar 10 mL do efluente do estágio de peróxido de hidrogénio e 15 mL de iodeto de potássio;
- Colocar o copo no TRITINO (a utilizar em modo DOS), mergulhando a ponta doseadora;
- Após ligar a agitação, iniciar a titulação do preminho DOS (atentar no controlo do caudal de titulante);
- 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;
- Continuar o doseamento até ocorrer a mudança de cor azul/violeta-incolor: ponto de equivalência atingido;
- Registrar o volume gasto de titulante;
- Lavar a ponta doseadora com água destilada.

Cálculos

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

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

em que $[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3] = 0,1 \text{ mol/L}$ 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 fator $\frac{1}{2}$ respeita a estequiometria da reação de titulação: $n(\text{H}_2\text{O}_2):n(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 1:2$. Numa forma condensada tem-se:

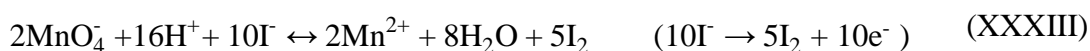
$$[\text{H}_2\text{O}_2] = 0,17 \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \quad \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \quad (\text{XXXI})$$

II.4. CARATERIZAÇÃO DAS PASTAS

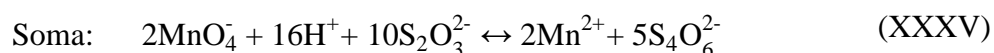
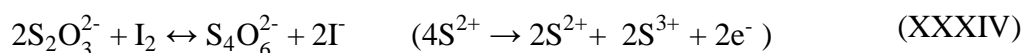
II.4.1. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE KAPPA (IK)

A lenhina é suscetível de sofrer oxidação (em particular nos seus anéis aromáticos) por vários oxidantes, como por exemplo o permanganato de potássio em condições acídicas. Assim, e consume de permanganato necessário para oxidar uma pasta fornece uma ideia do teor de lenhina residual. Este consumo depende porém do tempo e da temperatura de reação, bem como das

quantidades e concentrações de permanganato inicial e remanescente no final da reação e das restantes condições do ensaio, pelo que as condições experimentais devem ser sempre especificadas. O procedimento descrito na norma NP 3186 e índice kappa da pasta é determinado a partir do número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio 0,1 N consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas, sendo o resultado corrigido para um consumo de 50% (isto porque se deve utilizar uma quantidade de permanganato tal que leve a um consumo próximo de 50% do adicionado). O permanganato não consumido ao fim de exatamente 10 minutos de reação com a suspensão de pasta, é determinado por iodometria: à suspensão é adicionada iodeto de potássio, em excesso, que vai reagir com o permanganato não consumido segundo a reação XXXIII:



O iodo formado é titulado de imediato com uma solução aferida de tiosulfato de sódio (Vt mL), através da reação:



(por cada mol de MnO_4^- consome-se 5 moles de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ i.e. $5\text{e}^-/\text{mol}$)

No ensaio ‘branco’, efetuado com o mesmo procedimento mas sem adição de pasta, e permanganato inicialmente adicionado deve reagir, em princípio na sua totalidade, com o iodeto para formar iode, exceto se a água utilizada não estiver isenta de substâncias que se oxidam. O iodo formado é titulado de imediato com uma solução aferida de tiosulfato de sódio (VB mL). O índice kappa, baseado na norma citada, é dado por:

$$\text{IK} = \text{C} \cdot \text{d} / \text{W} \quad (\text{XXXVI})$$

No procedimento seguido no DEQ, denominado “Micro-kappa”, são usados menos quantidade de reagentes e de menor concentração em relação ao referido na norma NP3186, onde **d** é o fator de correção para um consumo de 50% de permanganato (ver Tabela X), o qual depende do valor de $\text{C} = 0,5 \cdot (\text{VB} - \text{Vt}) \cdot [\text{Na}_2\text{SO}_3] / (5 \cdot [\text{KMnO}_4])$;

este procedimento “Micro-kappa” deve ser aplicado para a determinação do grau de deslenhificação de pastas após um ou dois estágios de branqueamento (usando Oxigénio, Peroxido de Hidrogénio ou Dióxido de Cloro) onde o índice kappa poderá ser inferior a 5. Contudo, este método tem sido usado no DEQ, com sucesso, no caso de pastas cruas com índice kappa até 16.

Em geral, é usada a seguinte relação aproximada entre a lenhina total (LT) e o índice kappa (IK):

$$LT \text{ (em \%)} = 0,15 * IK \quad (\text{XXXVII})$$

embora esta proporcionalidade seja influenciada pela espécie de madeira e tipo de cozimento. Para *E. globulus* nacional obteve-se a seguinte relação:

$$LT \text{ (\%)} = 0,187 * IK - 0,75 \quad (R^2=0,9900) \quad (\text{XXXVIII})$$

É de salientar todavia que, para além da lenhina, outras estruturas podem consumir permanganato, contribuindo para o valor do índice kappa das pastas *kraft*, em particular das não-branqueadas. De facto, embora nos 10 minutos estabelecidos na norma se complete a oxidação degradativa dos anéis aromáticos da lenhina, sendo a oxidação dos grupos terminais redutores dos hidratos de carbono pequena (logo desprezável para o IK), a presença de ligações duplas, como as existentes nos ácidos hexenurónicos (formados durante o cozimento alcalino das xilanas) aumenta substancialmente o consumo de permanganato.

Reagentes:

- Solução de ácido sulfúrico, 2 mol/L (= 4N);
- Solução de iodeto de potássio, 1 mol/L;
- Solução de permanganato de potássio, 0,01 mol/L (= 0,05 N);
- Solução de tiosulfato de sódio, 0,05 mol/L (= 0,05 N);
- Indicador de amido, 2 g/L.

Material:

- Agitador Heidolph (ou equivalente) com haste de agitação em vidro;
- Aparelho para desintegração em húmido (varinha mágica, caso a amostra se encontre seca);
- Banho termostático (25,0 ± 0,2 °C);
- Cronómetro.

Procedimento Experimental

Preparação da solução de H₂SO₄ 2M (=4 N):

- Diluir 408,64 g de ácido concentrado (pureza: 96%, densidade: 1,84 kg/L, peso molecular: 98,08 g/mol) num balão volumétrico de 2000 mL em água destilada.

ATENCAO: MISTURA ALTAMENTE EXOTÉRMICA! Colocar primeiro ~1000 mL de água gelada, adicionar o ácido com cuidado, agitando e arrefecendo o balão com água corrente e, depois de atingir a temperatura ambiente, perfazer o volume de 2000 mL.

Preparação da solução do KI 1M:

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

Preparação da solução de Na₂S₂O₃ 0,05N:

- Introduzir o conteúdo de uma ampola de Tiosulfato de Sódio 0,1 M (=0,1 N) num balão volumétrico de 2000 mL e perfazer com água destilada.
- Transferir a solução para um frasco disponível no titulador automático.

Metodologia:

- Pesa-se com a precisão de 0,1 mg, uma quantidade da pasta que consuma cerca de 50% (ponderal) da solução de permanganato de potássio do ensaio em branco (sem pasta).

(pesar 2 0,7 g do pasta seca para IK~7,5 ou ~0,35 g do pasta seca para IK~15; como, normalmente, as amostras de pasta húmida têm um teor de secura ~0,3 g fibra/g pasta, dever-se-á pesar ~2,3 g de pasta húmida ou ~1,1 g, respetivamente).

- Introduzir a pasta previamente pesada num copo de 400 mL e adicionar 150 mL de água destilada;

- Colocar o copo com o seu conteúdo num banho termostático regulado para a temperatura de 25°C, segurando-o lateralmente com uma pinça; desintegrar com o agitador (10 a 15 min) regulando a velocidade de rotação (posição 1 do agitador Heidolph);

- Pipetar para um copo de 100 mL, 20 mL de permanganato de potássio (0,01 mol/L) e 20 mL de ácido sulfúrico (2 mol/L);

- Aquecer a mistura anterior até à temperatura do 25°C e adicionar à suspensão de pasta desintegrada, ligando simultaneamente o cronómetro. Lavar o copo com 10 mL de água e adicionar esta água a suspensão. O volume final da suspensão no copo que contém a pasta deve ser de 200 mL;

- Interromper a reação ao fim de 10 minutos, contados a partir da adição do permanganato de potássio, juntando 10 mL de iodeto do potássio (1 mol/L);

- Titular o iodo libertado com tiosulfato de sódio utilizando o cozimento de amido, como indicador, o qual é adicionado perto do fim da titulação, quando esta apresentar uma cor amarela clarinha; o amido vira do azul-escuro para branco/ incolor (Nota: se a massa do pasta for a adequada deve-se gastar ~10 mL, que é cerca de metade do volume gasto no ensaio Branco; caso contrário, corrigir a massa de pasta para que isso aconteça; A repetibilidade é inferior a 0,5 unidades de IK.

Nota: Dada a volatilidade do iodo o tempo decorrido entre a adição da solução de iodeto de potássio e o ponto final da titulação deve ser o mais curto possível.

- Realizar o ensaio “Branco” procedendo de modo idêntico ao descrito, mas sem pasta. A solução de iodeto de potássio pode-se juntar imediatamente após a adição da solução de permanganato de potássio e do ácido sulfúrico. Gasta-se ~20 mL.

Tabela IV. Fator d. Equação equivalente: $d = (0,89301 + 0,021456 \cdot C)$

C (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	0,958	0,960	0,962	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
4	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
5	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
6	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
7	1,044									

II.4.2. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE INTRÍNSECA

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, aumentando com ela. Por isso, a viscosidade deve ser determinada em condições tais que a interação 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:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{\text{rel}} - 1}{C} \right) \quad (\text{mL/g}) \quad (\text{XXXIX})$$

onde $\eta_{\text{rel}} = \eta/\eta_0$, sendo η e η_0 a viscosidade da solução e do solvente, respetivamente. Esta definição ilustra a razão pela qual normalmente se exprime a viscosidade em unidades de $(\text{concentração})^{-1}$. 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:

$$\eta_{\text{rel}} - 1 = [\eta]C e^{k'[\eta]C} \quad (\text{XL})$$

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 mL/g, 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 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 efetuadas na mesma amostra) é inferior a 25 mL/g.

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

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 V.

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

Índice de viscosidade limite ou viscosidade intrínseca (dm³/kg)	Concentração de pasta (mg/mL)	Gramas de pasta calculadas numa base seca (mg/50 mL)
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.

Metodologia:

- 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 $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (~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. Efetuar 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. Usar a Tabela VI para obter o valor do produto $c[\eta]$ e calcular a viscosidade da solução da amostra de pasta ensaiada.

- Efetuar 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 $3 \pm 0,1$.

Tabela VI. Produto $c[\eta]$ correspondente a diferentes rácios de viscosidade ($\eta_{\text{rácio}}$).

$\eta_{\text{rácio}}$	0,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
6,0	2,422	2,425	2,427	2,430	2,433	2,436	2,439	2,441	2,444	2,447
6,1	2,450	2,452	2,455	2,458	2,461	2,463	2,466	2,469	2,472	2,475
6,2	2,477	2,480	2,483	2,485	2,488	2,491	2,494	2,496	2,499	2,502
6,3	2,504	2,507	2,510	2,512	2,515	2,518	2,521	2,523	2,526	2,529
6,4	2,531	2,534	2,537	2,539	2,542	2,545	2,547	2,550	2,552	2,555
6,5	2,558	2,560	2,563	2,566	2,568	2,571	2,573	2,576	2,579	2,581
6,6	2,584	2,587	2,589	2,592	2,594	2,597	2,599	2,602	2,605	2,607
6,7	2,610	2,612	2,615	2,617	2,620	2,623	2,625	2,628	2,630	2,633
6,8	2,635	2,638	2,640	2,643	2,645	2,648	2,651	2,653	2,656	2,659
6,9	2,661	2,663	2,666	2,668	2,671	2,673	2,676	2,678	2,681	2,683

II.4.3. PREPARAÇÃO DE FOLHAS PARA MEDIÇÃO DE BRANCURA ISO

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

Procedimento:

- Pesar 4 gramas de pasta seca, de forma a produzir duas folhas de ensaio com gramagem de 200g/m^2 ;

- Num copo de vidro de 2L juntar a pasta pesada, 1L de água destilada e 2mL de EDTA, 5g/L (1mL por folha) e deixar desintegrar, com auxílio de um agitador, durante cerca de 30 minutos;

- Com a ajuda de um medidor de pH (com leitura a 0,1 unidades), verificar se o pH da suspensão obtida é aproximadamente 5 (4,9-5). Caso não esteja, ajustar 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 eletrodo;

- Depois de acertado o pH, agitar bem a suspensão (pode agitar-se cuidadosamente com o eletrodo) e dividir em duas porções idênticas (2 x 500mL), 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.

II.4.4. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS HEXENURÓNICOS

Reagentes

- Solução de cloreto de mercúrio (22 mmol/L ou 0.6 % (w/w)) / acetato de sódio (0.7% (w/w), para manter o pH entre 6 e 7)

- Água ultrapura

Material

- Tubos de centrífuga

- Frascos de vidro escuro
- Proveta de 50 mL
- Pipetas de Pasteur
- Banho termostático a 70°C com agitação mecânica (e com o suporte para colocar os frascos)
- Espectrofotômetro UV
- Células com percussor ótico de quartzo
- Agitador Vortex
- Centrifugadora

Preparação da solução de cloreto de mercúrio/acetato de sódio

- Para cada 2 litros de solução, pesar 11.9456g de cloreto de mercúrio (HgCl_2) num copo de 100 mL e 14g de acetato de sódio (CH_3COONa) para outro copo de 100 mL.
- Adicionar alguma água ultrapura para os copos e transferir para o balão de diluição de 2000 mL e perfazer até à marca com água ultrapura.
- Introduzir um agitador magnético no balão e colocar num agitador até perfeita dissolução.
- Envolver o balão de diluição com folha de papel alumínio, uma vez que esta solução não deve estar exposta à luz. Não utilizar se apresentar alguma precipitação.

Metodologia

- Pesar 0.2g de pasta seca (pasta crua) ou ~0.6 g de pasta branca) para os frascos de vidro escuro. Para cada amostra devem ser feitas 2 réplicas.
- Colocar em cada frasco 40 mL da solução cloreto de mercúrio/acetato de sódio.
- Agitar num vortex durante 2 minutos.
- Colocar todos os frascos num banho térmico a 70°C com agitação de 38-40 rpm durante 70 min.
- Retirar as amostras do banho e colocá-las em água muito fria durante 10 min.
- Transferir a quantidade dos frascos de vidro escuro para os tubos da centrífuga.
- Centrifugar a amostra durante 5 minutos a 2700 rpm (deixar repousar durante algum tempo para que se possa distinguir o sobrenadante).
- Pipetar com as pipetas de Pasteur o líquido centrifugado para a célula de quartzo e ler no espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 e 290 nm. O branco é a solução cloreto de mercúrio/acetato de sódio. (Fazer em primeiro lugar todas as leituras para 260 nm e depois para 290 nm).

Nota: Se a absorvância for inferior a 0.2 ou superior a 1.2, convém repetir a experiência aumentando ou diminuindo a massa de amostra.

- Determinar a quantidade de ácidos hexenurónicos através da seguinte correlação:

$$C_{HexA} (mmol / kg) = \frac{0,287 \times (A_{260} - 1.2 \times A_{290}) \times V_{hidrolisado}}{m_{pasta\ seca}} \quad (XLI)$$

onde, m: massa da amostra de pasta absolutamente seca, g; A_{260} : absorvância da amostra a 260 nm; A_{290} : absorvância da amostra a 290 nm; V: volume de hidrolisado, mL (40 mL neste caso).

ANEXO III. CONDIÇÕES E RESULTADOS EXPERIMENTAIS

III.1. TRATAMENTO ENZIMÁTICO PRELIMINAR (ESTÁGIO X)

A leitura da absorvância do filtrado residual da pasta após um estágio enzimático permitiu obter o espectro UV/visível, tal como exemplificado na Figura II. Em função das condições dos ensaios obtiveram-se os resultados da Tabela VII.

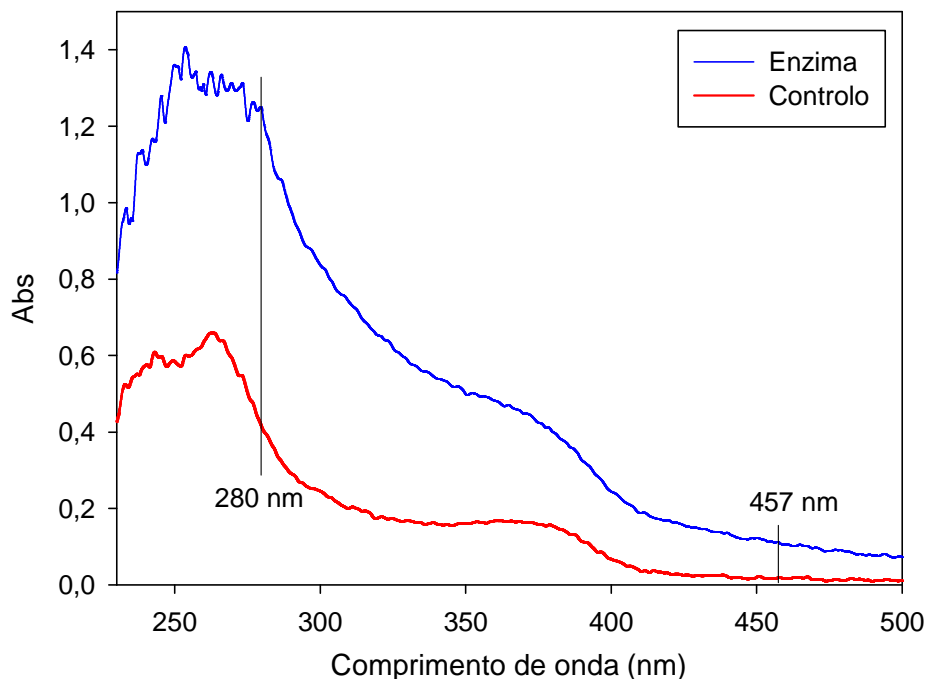


Figura II. Espectro UV/visível obtido a partir do filtrado residual. Ensaio para a pasta 1 com tratamento enzimático com a xilanase X1. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t.

Tabela VII. Condições e resultados obtidos a partir da medição da absorvância a 280 e 457 nm do filtrado residual para a pasta 1, xilanase X1.

T (°C)	pH		Abs 280 nm		Abs 457 nm	
	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo	Enzima	Controlo
80	6,9	6,9	1,295	0,476	0,094	0,032
	7,8	7,8	1,189	0,478	0,103	0,032
	8,4	8,4	1,065	0,613	0,116	0,055
75	6,9	6,9	1,044	0,319	0,108	0,022
	7,9	7,9	1,135	0,465	0,125	0,027
	8,5	8,6	0,948	0,590	0,135	0,069
70	7,0	7,1	1,238	0,374	0,099	0,018
	7,9	8,0	0,942	0,426	0,112	0,034
	8,6	8,6	0,794	0,506	0,121	0,060

Tabela VIII. Condições utilizadas no estágio X para as pastas 4 e 5, xilanase X1 e respectivos resultados obtidos.

Pasta	T (°C)	Dosagem (mL/tAD)	pH	IK		Br ISO (%)		Br ISO (%) após reversão		PC number		Ganho de Br		ΔBr ISO (%)
				Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	
Pasta 4	70	200	7	14,6	15,1	38,9	37,4	40,1	38,6	-	-	3,0	1,5	1,6
Pasta 5	70	200	7	7,3	7,8	67,7	65,8	63,5	60,9	2,8	3,7	2,7	0,8	1,9
	80	200	8	8,1	8,2	67,6	66,5	64,0	62,4	2,3	2,9	2,7	1,6	1,1

III.2. PASTAS DE

Tabela IX. Condições utilizadas na sequência DE e respectivos resultados obtidos.

	Carga ClO ₂ (% odp)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)	PC number	Ganho de Brancura ISO (%)	ΔIK	ΔViscosidade (mL/g)
Pasta 1	2,2	4,5	1086	74,0	70,4	1,6	34,3	8,2	247
	2,5	4,1	1068	75,9	72,6	1,3	36,2	8,5	265
	2,8	4,0	1095	76,9	73,3	1,4	37,2	8,7	238
	3,1	3,8	1117	77,3	74,0	1,3	37,6	8,9	216
Pasta 2	2,2	6,1	1110	69,9	66,0	2,3	34,1	8,5	103
	2,5	5,8	1119	71,3	67,5	2,0	35,5	8,8	94
	3,0	4,6	1097	73,3	69,3	1,9	37,5	10,0	116
	3,4	3,6	1067	75,0	71,6	1,5	39,2	11,0	146
	3,7	3,3	1092	75,9	72,3	1,5	40,1	11,3	121
Pasta 3	2,2	5,6	1086	66,7	63,6	2,1	34,8	9,0	117
	2,5	4,9	1067	69,5	66,3	2,0	37,9	9,7	136
	2,8	4,5	1089	71,4	67,7	1,9	39,4	10,1	114
	3,1	3,9	1108	72,6	68,9	1,9	40,9	10,7	95
	3,4	3,6	1085	73,3	69,7	1,7	41,4	11,0	118
Pasta 4	2,5	6,2	1116	67,9	64,8	2,0	32,0	10,2	223
	2,8	5,7	1129	69,7	66,7	1,8	33,8	10,7	210
	3,1	5,2	1148	71,2	68,0	1,7	35,4	11,2	191
	3,4	4,5	1146	73,1	69,9	1,5	37,2	11,9	193
Pasta 5	1,8	3,9	876	86,0	79,9	1,4	21,1	5,2	151
	2,2	3,3	875	87,3	81,0	1,3	22,3	5,8	152
	2,5	3,3	866	87,8	82,5	1,0	22,8	5,9	161

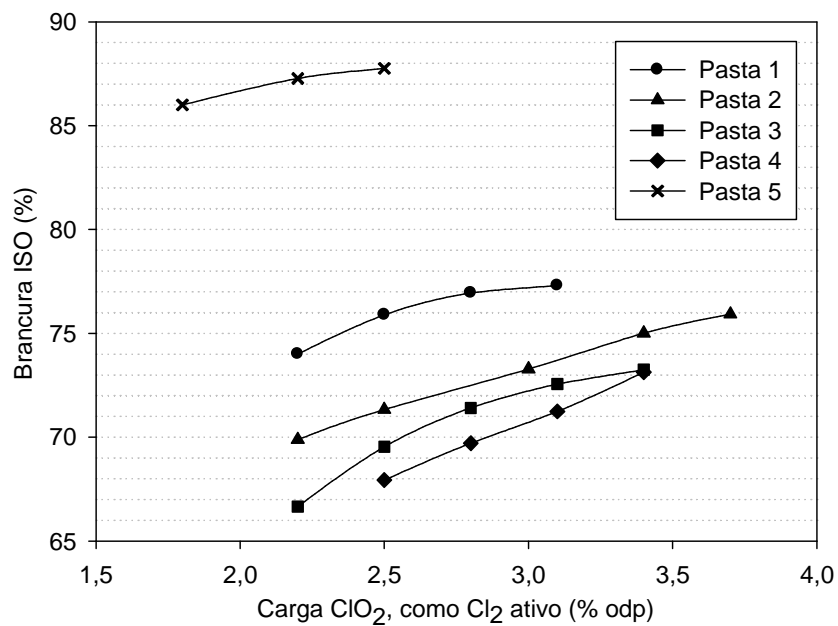


Figura III. Desenvolvimento da brancura em pastas branqueadas com sequências DE, em função da carga de ClO_2 .

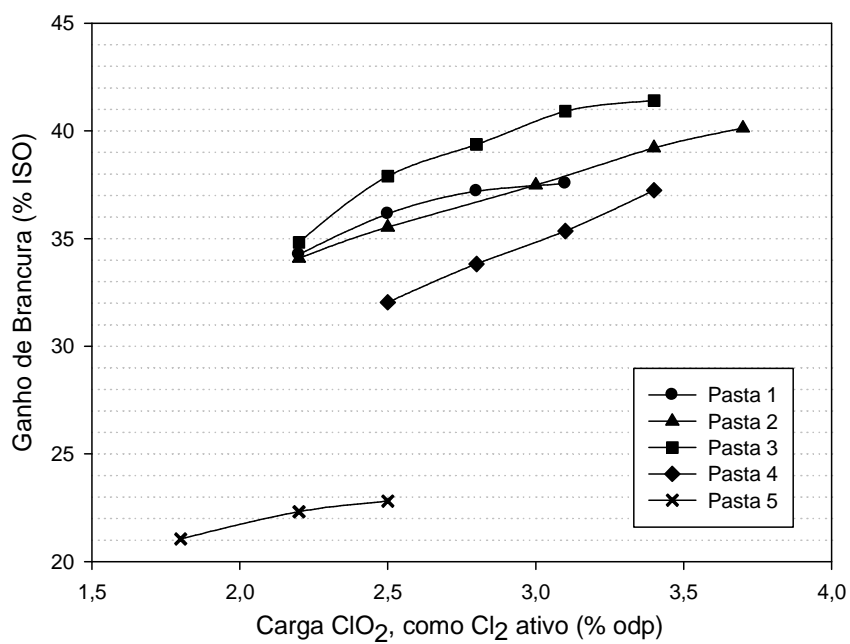


Figura IV. Evolução do ganho de brancura da pasta DE em relação ao original, em função da carga de ClO_2 .

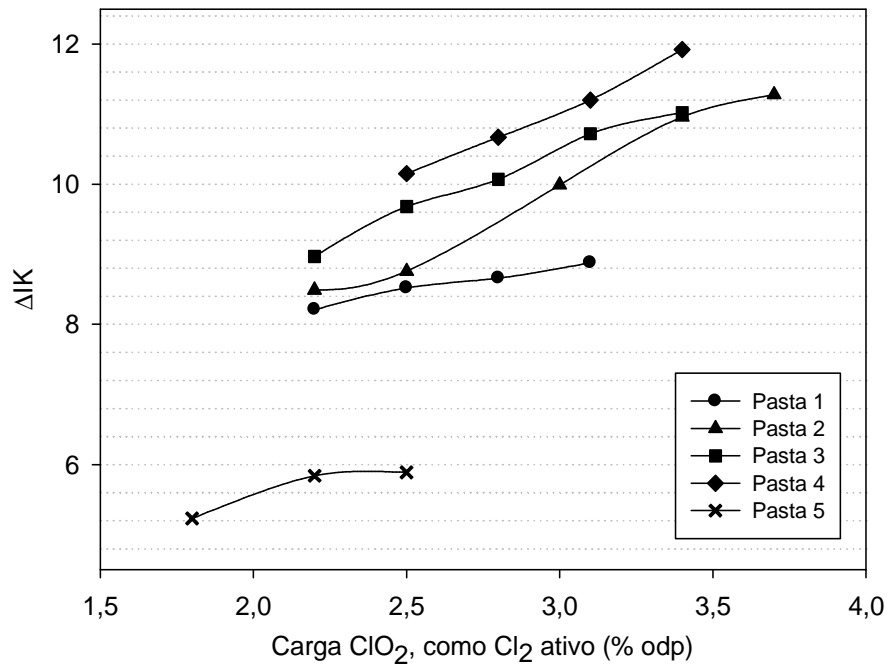


Figura V. Evolução da diferença entre o IK da pasta original e da pasta DE, em função da carga de ClO₂.

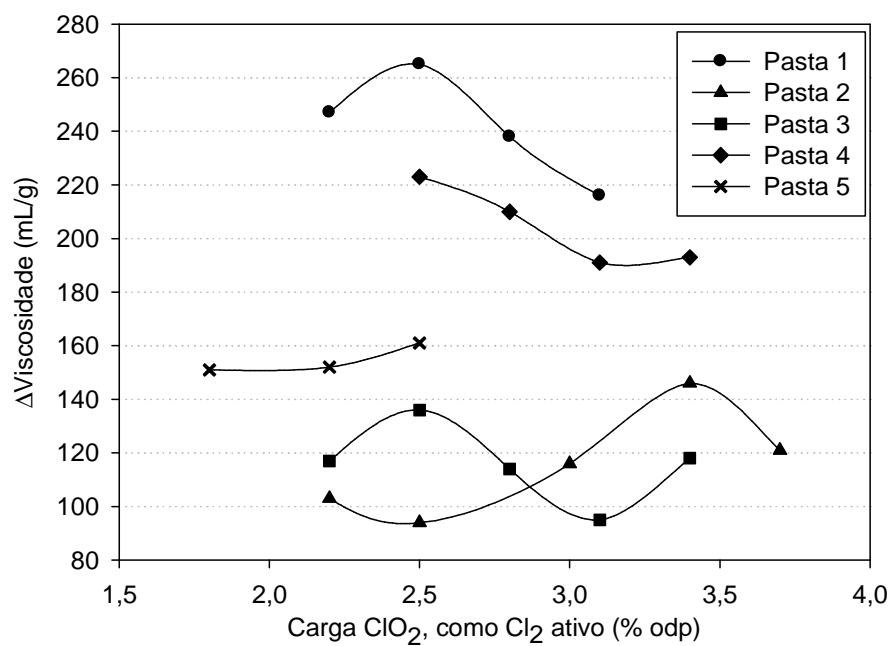


Figura VI. Evolução da diferença entre a viscosidade da pasta original e da pasta DE, em função da carga de ClO₂.

III.3. PASTAS XDE

Na Tabela X apresentam-se as condições e resultados para as pastas XDE.

Tabela X. Condições utilizadas na sequência XDE e respectivos resultados obtidos.

Pasta	Xilanase	T (°C)	Dosagem (mL/tAD)	pH	ClO ₂ (%)	NaOH (%)	H ₂ O ₂ (%)	IK		Viscosidade (mL/g)		Brancura ISO (%)		Brancura ISO (%) após reversão		PC number		Ganho de brancura		ΔBrancura ISO (%)		
								Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont	Enz	Cont		Enz	Cont
Pasta 1	X1	60	200	8,5	2,2	1,4	0,3	4,0	4,6	1026	1071	78,2	75,9	74,7	72,2	1,2	1,5	38,4	36,2	2,2		
		70	200	7,0	2,2	1,4	0,3	3,6	4,6	1042	1045	79,2	75,6	76,0	71,9	1,1	1,6	39,5	35,9	3,6		
		70	200	8,0	2,2	1,4	0,3	4,3	4,8	1033	1006	77,2	75,1	73,5	71,2	1,4	1,7	37,5	35,4	2,1		
		70	200	8,5	2,2	1,4	0,3	4,4	4,6	1058	1045	76,0	74,1	72,2	70,4	1,6	1,7	36,2	34,4	1,8		
		75	200	8,0	2,2	1,4	0,3	4,3	4,8	1057	1049	76,0	74,5	72,3	70,8	1,5	1,7	36,3	34,7	1,5		
		75	200	8,5	2,2	1,4	0,3	4,3	4,5	996	998	76,8	76,0	73,0	72,5	1,5	1,4	37,0	36,2	0,8		
		80	200	8,0	2,2	1,4	0,3	4,4	4,5	1060	1024	76,5	75,4	73,2	71,9	1,3	1,4	36,7	35,6	1,1		
		80	200	8,5	2,2	1,4	0,3	4,4	4,3	1049	1077	76,2	76,2	72,0	72,4	1,7	1,6	36,5	36,5	0,0		
				75	1530	8,5	2,2	1,4	0,3	3,0	4,1	1097	1072	80,1	76,3	76,9	71,3	1,0	2,1	40,3	36,5	3,8
				75	900	8,5	2,2	1,4	0,3	3,1	4,1	1086	1072	79,9	76,3	76,6	71,3	1,0	2,1	40,1	36,5	3,6
	X2	70	900	9,0	2,2	1,4	0,3	3,6	4,3	1075	1036	78,2	75,2	74,9	71,6	1,1	1,6	38,4	35,5	2,9		
		75	900	9,0	2,2	1,4	0,3	3,5	4,3	1082	1080	78,2	75,1	73,3	71,5	1,8	1,6	38,4	35,4	3,1		
		70	900	7,0	2,2	1,4	0,3	3,3	4,3	1077	1069	79,3	75,4	75,8	71,4	1,2	1,7	39,6	35,6	3,9		
Pasta 2	X1	70	200	7,0	2,2	1,2	0,3	4,4	5,5	1142	1122	75,6	71,4	71,5	67,5	1,7	2,1	39,8	35,6	4,2		
		70	200	7,0	2,5	1,2	0,3	3,8	4,5	1128	1121	76,7	73,4	72,9	69,9	1,5	1,7	40,9	37,6	3,3		
		70	200	8,5	2,2	1,2	0,3	4,5	5,0	1102	1093	74,0	72,1	71,0	69,0	1,4	1,6	38,2	36,3	1,9		
		60	200	8,5	2,2	1,2	0,3	5,2	5,3	1088	1060	72,4	71,1	69,2	67,7	1,6	1,8	36,6	35,3	1,4		
		60	200	8,5	2,5	1,2	0,3	4,3	4,6	1105	1081	74,6	73,1	71,1	69,7	1,6	1,7	38,8	37,3	1,5		
Pasta 3	X1	70	200	7,0	2,5	1,2	0,3	3,5	4,1	1119	1087	76,5	73,3	72,2	69,4	1,8	1,9	44,7	41,5	3,2		
		70	200	8,0	2,5	1,2	0,3	3,6	4,0	1050	1057	75,8	73,3	72,0	69,6	1,6	1,8	44,0	41,5	2,5		
		70	200	8,5	2,5	1,2	0,3	3,7	4,0	1071	1079	75,7	74,3	72,3	70,5	1,4	1,7	43,9	42,5	1,4		
Pasta 4	X1	70	200	7,0	2,5	1,2	0,3	4,7	5,5	1092	1095	73,7	70,3	70,1	66,7	1,7	2,1	37,9	34,4	3,4		
Pasta 5	X1	70	200	7,0	1,8	1,2	0,3	3,4	4,1	839	825	88,3	86,8	83,2	82,0	0,9	1,0	23,3	21,9	1,5		
		85	200	8,0	1,8	1,2	0,3	3,8	3,9	845	837	86,9	86,9	82,5	79,4	0,9	1,7	21,9	21,9	0,0		
		X2	85	900	9,0	1,8	1,2	0,3	3,6	3,8	905	864	88,2	87,5	84,1	82,5	0,7	1,0	23,2	22,6	0,6	

III.3.1. ÁCIDOS HEXENURÓNICOS

Tabela XI. Resultados dos ácidos hexenurónicos.

		T (°C)	pH	Pasta OD (g)	Absorvância		HexA (mmol/kg)	Média
					260 nm	290 nm		
Original	-	-	-	0,1411	0,91690	0,18778	56,2	56,9
				0,1357	0,93214	0,20996	57,5	
DE	-	-	-	0,2967	0,97076	0,22057	27,3	27,5
				0,2921	0,97046	0,21977	27,8	
XDE	Enzima	60	8,5	0,3038	0,86742	0,15919	25,6	24,4
				0,2911	0,79952	0,17470	23,3	
	Controlo	60	8,5	0,2828	0,92750	0,21019	27,4	26,9
				0,2875	0,90218	0,20097	26,4	
	Enzima	70	8,5	0,2780	0,87415	0,20929	25,7	25,9
				0,2739	0,86948	0,20512	26,1	
	Controlo	70	8,5	0,2889	0,92214	0,20237	27,0	27,4
				0,2939	0,96433	0,21132	27,8	
	Enzima	70	7	0,2719	0,69356	0,14869	21,8	21,3
				0,2716	0,65503	0,13444	20,9	
	Controlo	70	7	0,2890	0,90948	0,18182	27,5	27,6
				0,2899	0,93214	0,19208	27,8	

III.3.2. POUPANÇA DE DIÓXIDO DE CLORO

Tabela XII. Condições utilizadas e resultados obtidos nos ensaios de controlo.

Pasta	T (°C)	pH	ClO ₂ (%)	NaOH (%)	H ₂ O ₂ (%)	IK	Viscosidade (mL/g)	Brancura ISO (%)	Brancura ISO após reversão (%)	PC number	Ganho de Brancura
Pasta 1	60	8,5	2,8	1,4	0,3	3,5	1092	78,8	74,2	1,6	39,1
	70	7,0	3,0	1,4	0,3	3,9	1055	78,5	74,6	1,4	38,8
	70	8,0	2,6	1,4	0,3	4,0	1009	77,2	73,0	1,6	37,5
	70	8,5	2,5	1,4	0,3	4,0	1030	76,3	72,1	1,7	36,6
	75	8,0	2,5	1,4	0,3	4,1	1066	76,3	72,5	1,5	36,6
	80	8,0	2,4	1,4	0,3	4,9	1061	77,0	71,7	2,1	37,2
Pasta 2	70	7,0	3,1	1,2	0,3	3,8	1146	74,5	70,1	2,0	38,7
	70	7,0	3,4	1,2	0,3	3,3	1143	77,7	74,1	1,3	41,9
	70	8,5	2,6	1,2	0,3	3,5	1153	73,6	69,9	1,8	37,8
	60	8,5	3,4	1,2	0,3	3,6	1101	76,8	72,9	1,5	41,0
Pasta 3	70	7,0	3,4	1,2	0,3	3,2	1083	76,3	72,7	1,5	44,5
	70	8,0	3,4	1,2	0,3	3,3	1072	75,9	72,4	1,4	44,1
Pasta 4	70	7,0	3,4	1,2	0,3	4,0	1156	74,6	70,7	1,8	38,7
Pasta 5	70	7,0	2,5	1,2	0,3	3,4	828	88,6	83,7	0,9	23,6

Xilanase X1

Pasta 1:

Nas Figuras VII a XII usou-se uma carga de 2,2 % de ClO₂, como Cl₂ ativo nos ensaios com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

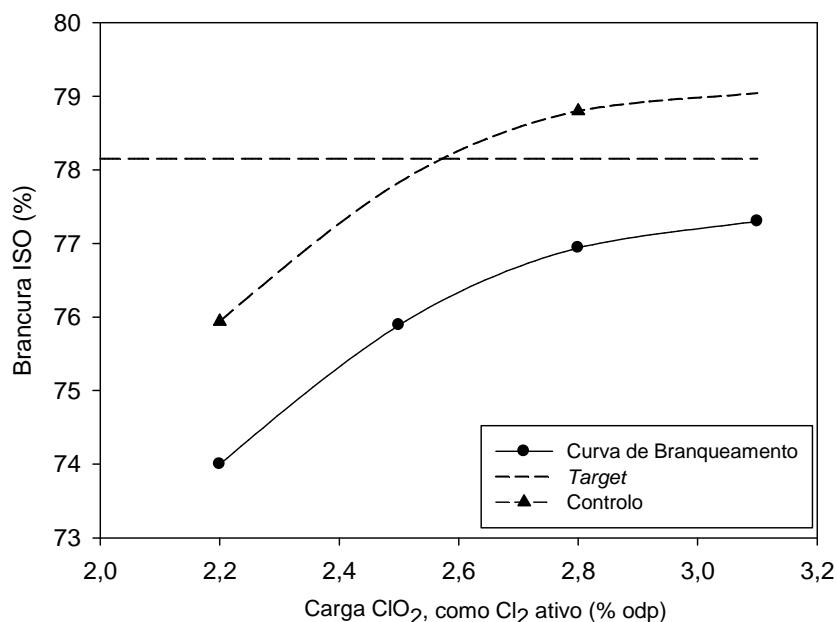


Figura VII. Condições no estágio X: 60 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,57 - 2,20}{2,20} = 16,8 \%$$

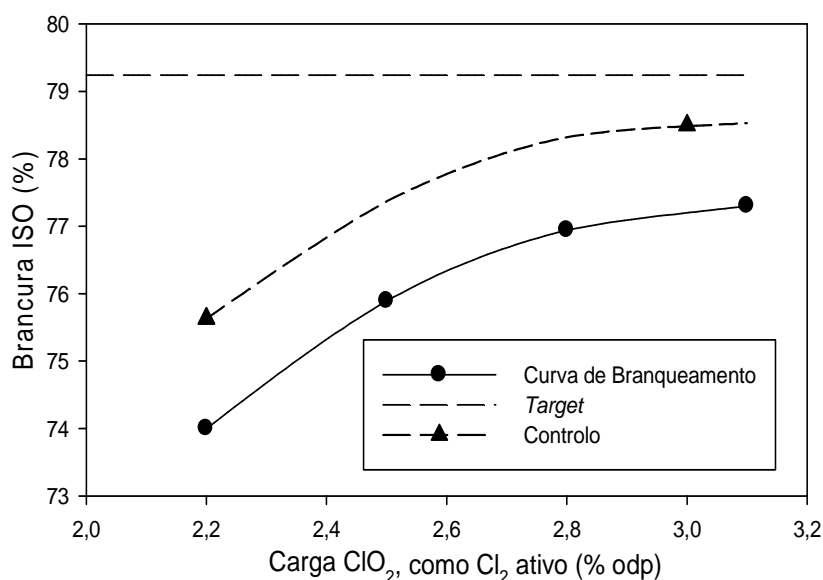


Figura VIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,00 - 2,20}{2,20} = 36,4 \%$$

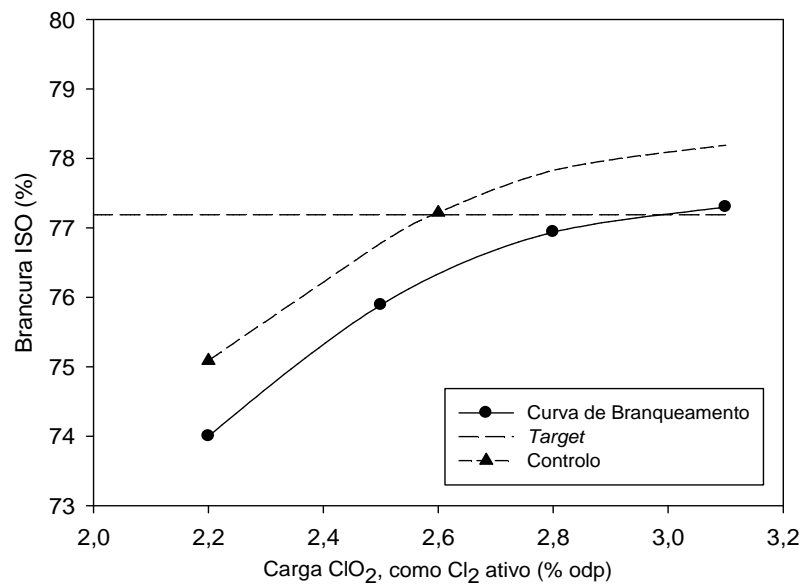


Figura IX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,60 - 2,20}{2,20} = 18,2 \%$$

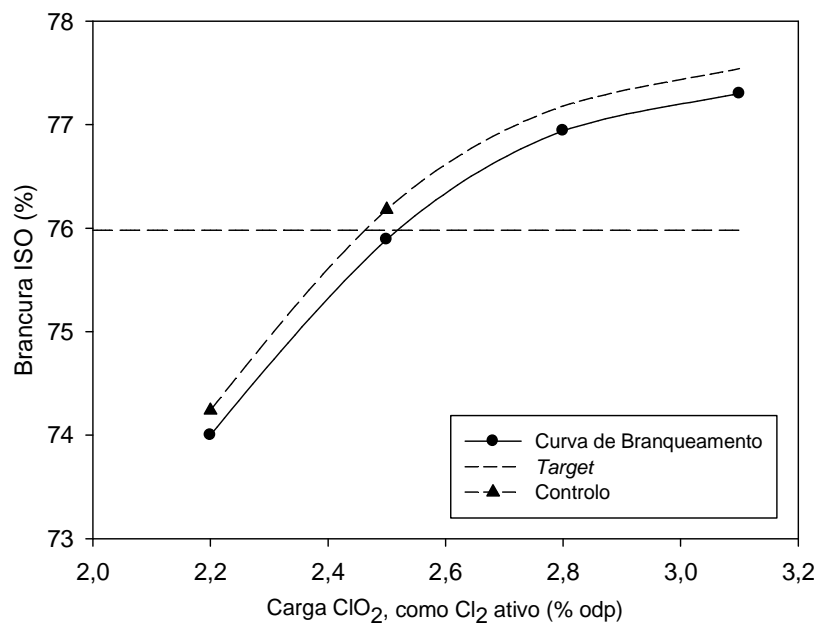


Figura X. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,50 - 2,20}{2,20} = 13,6 \%$$

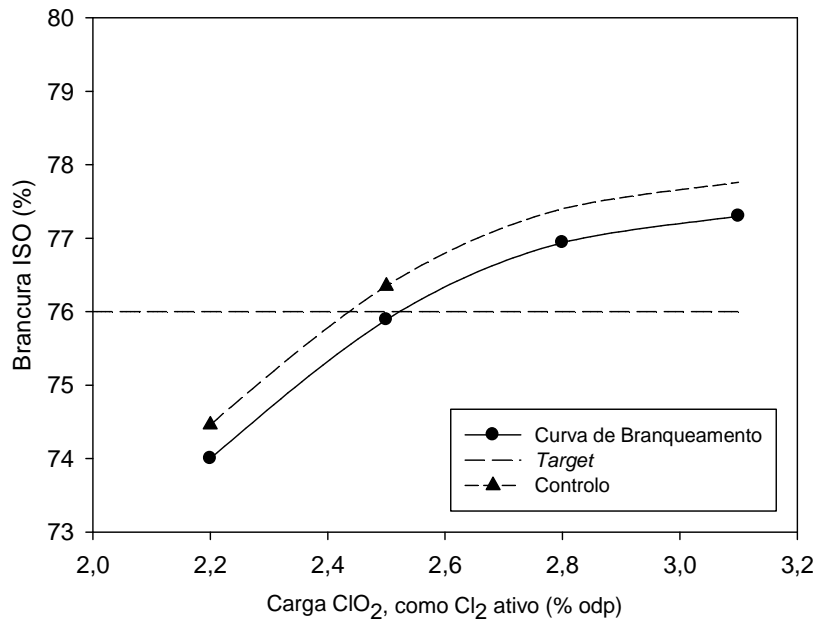


Figura XI. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,44 - 2,20}{2,20} = 10,9 \%$$

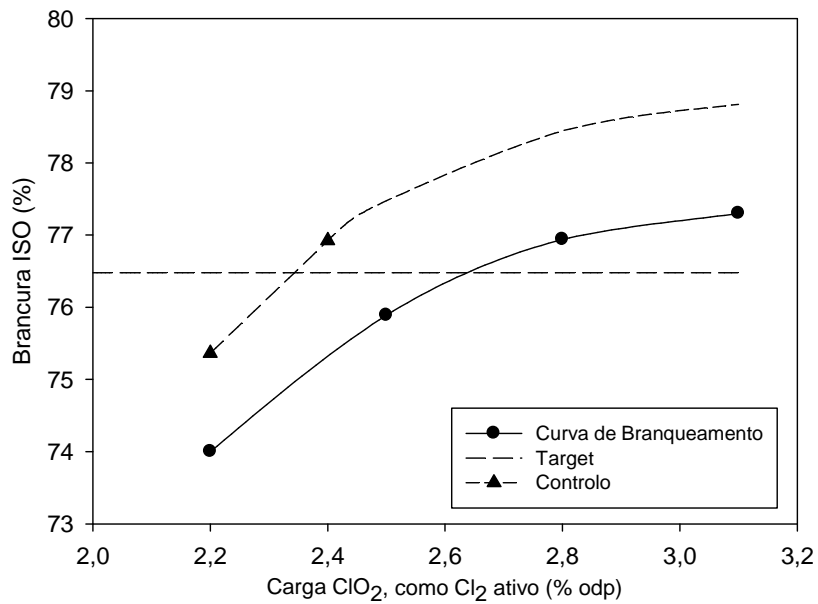


Figura XII. Condições no estágio X: 80 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,35 - 2,20}{2,20} = 6,8 \%$$

Pasta 2:

Nas Figuras XIII e XVI usou-se uma carga de 2,2 % de ClO₂, como Cl₂ ativo nos ensaios com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado) e de 2,5 % de ClO₂, como Cl₂ ativo nas Figuras XI e XII.

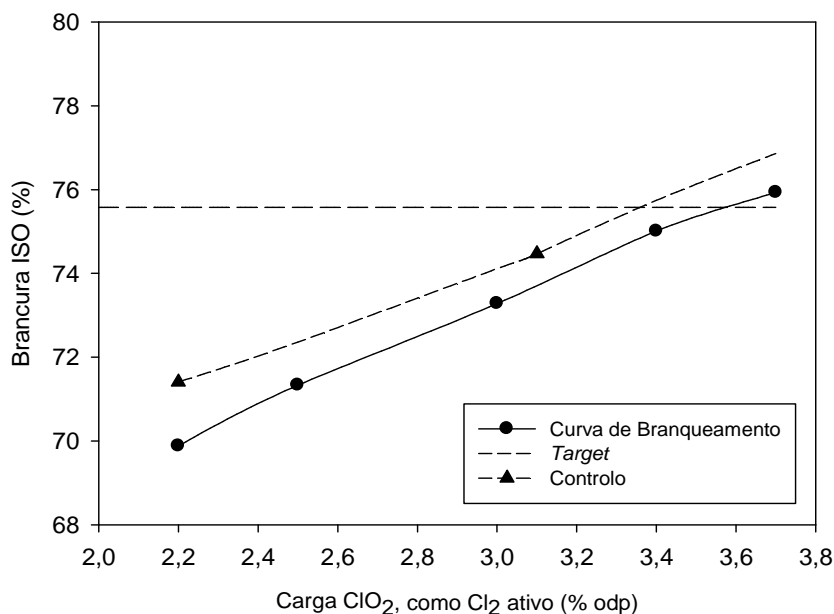


Figura XIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,36 - 2,20}{2,20} = 52,7 \%$$

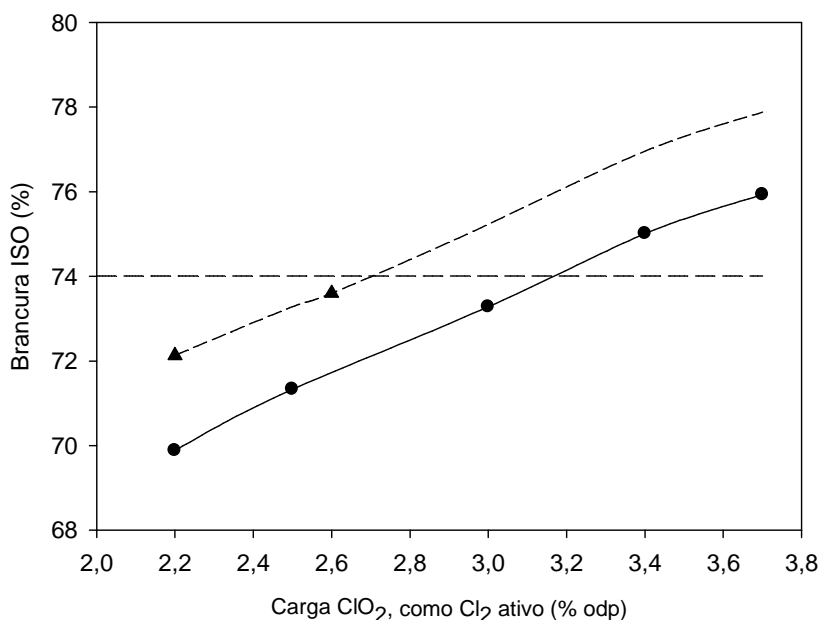


Figura XIV. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,70 - 2,20}{2,20} = 22,7 \%$$

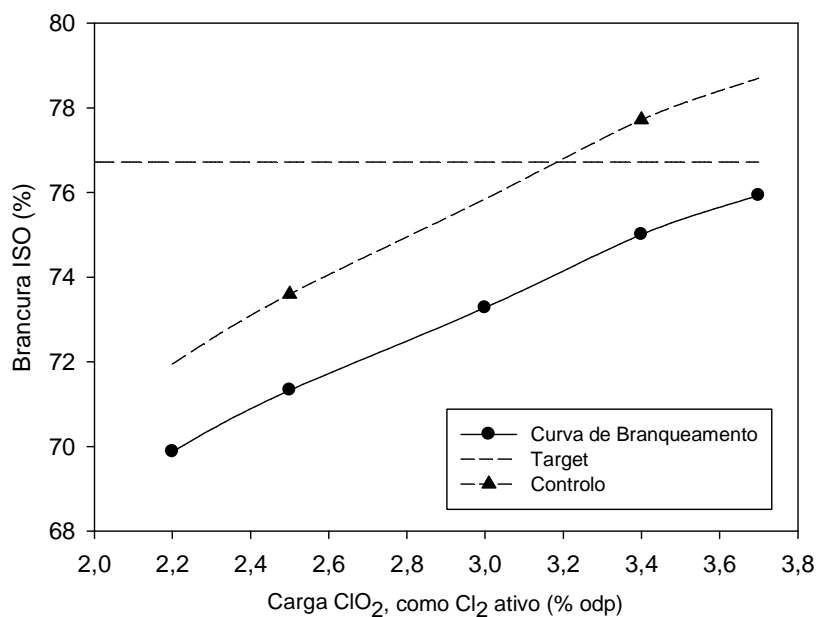


Figura XV. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,5% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,19 - 2,50}{2,50} = 27,6 \%$$

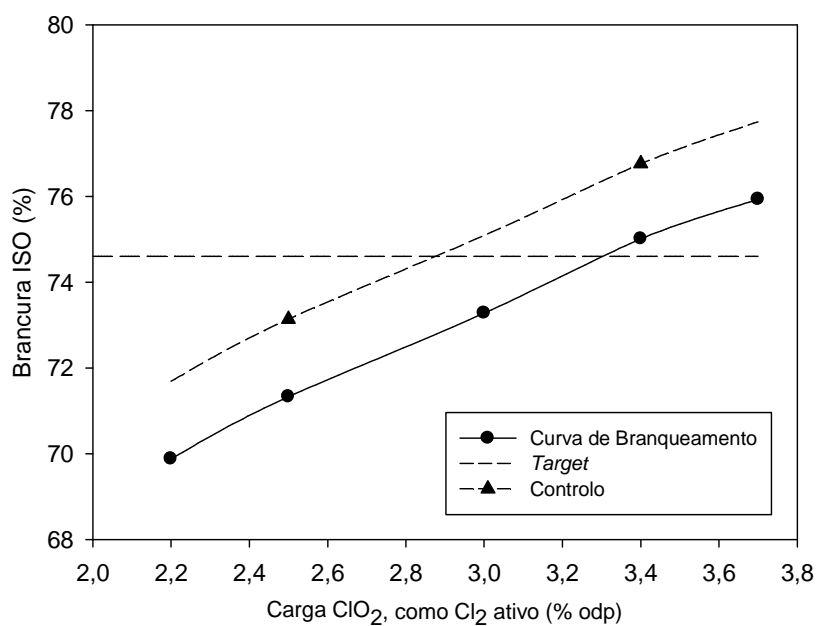


Figura XVI. Condições no estágio X: 60 °C, pH 8,5 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,5% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,87 - 2,50}{2,50} = 14,8 \%$$

Pasta 3:

Nas Figuras XVII e XVIII usou-se uma carga de 2,5 % de ClO₂, como Cl₂ ativo nos ensaios com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

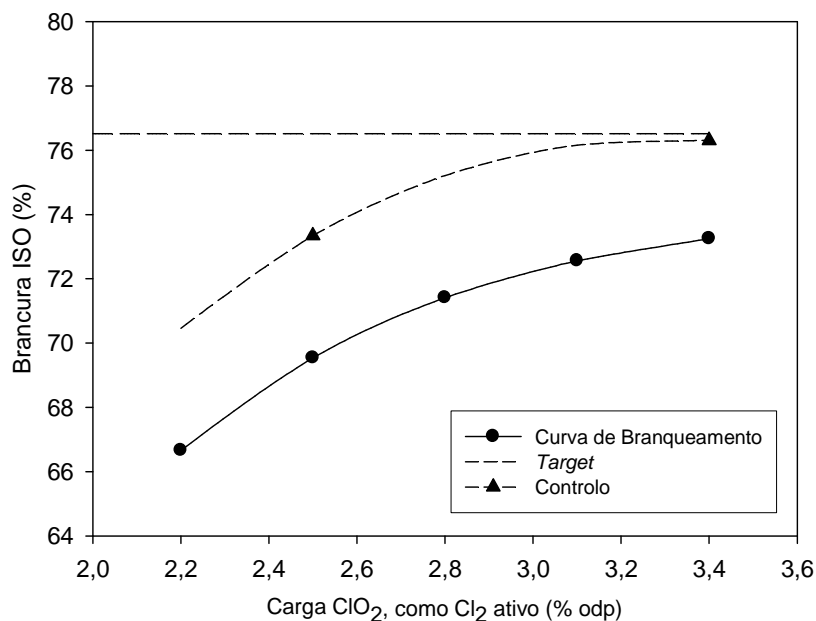


Figura XVII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,5% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,15 - 2,50}{2,50} = 26,0 \%$$

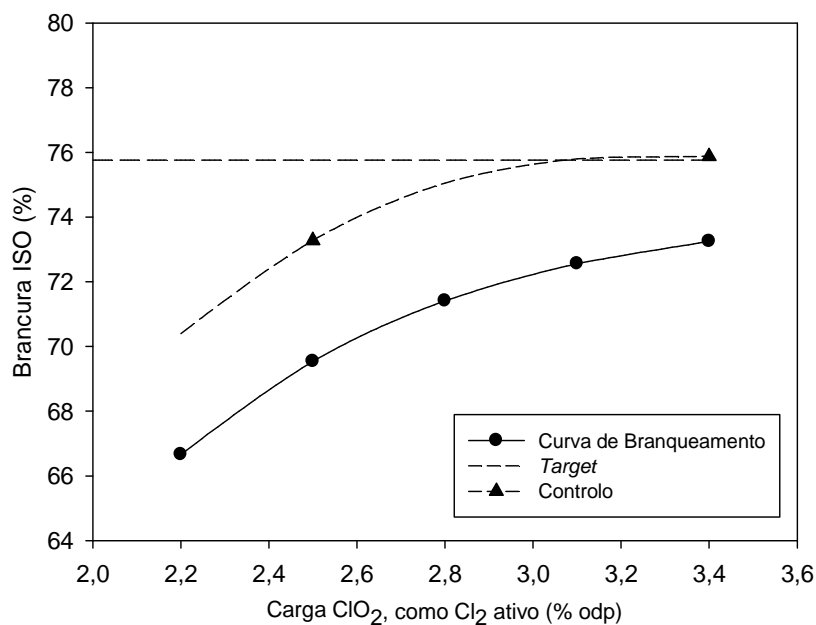


Figura XVIII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 8 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,5% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,00 - 2,50}{2,50} = 20,0 \%$$

Pasta 4:

Na Figura XIX usou-se uma carga de 2,5 % de ClO₂, como Cl₂ ativo no ensaio com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

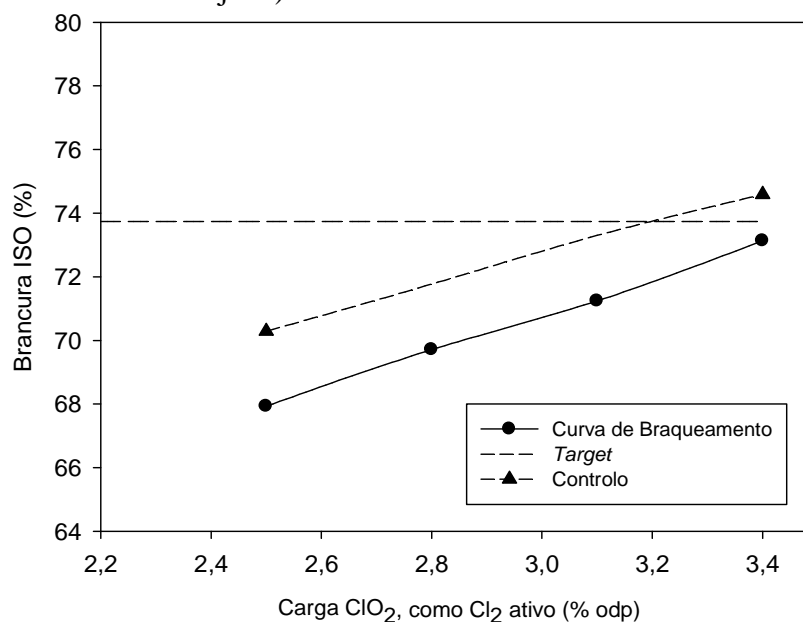


Figura XIX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,5% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,20 - 2,50}{2,50} = 28,0 \%$$

Pasta 5:

Na Figura XX usou-se uma carga de 1,8 % de ClO₂, como Cl₂ ativo no ensaio com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

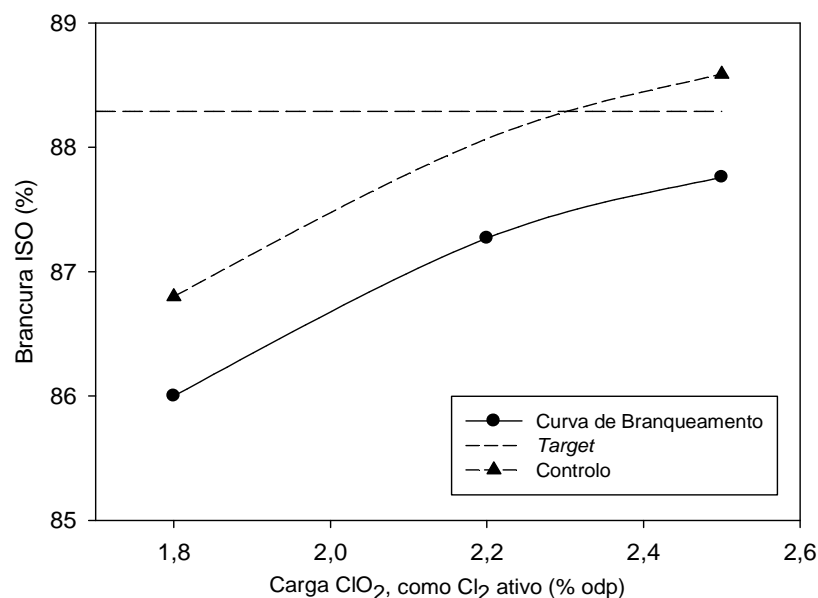


Figura XX. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 200 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 1,8% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,30 - 1,80}{1,80} = 27,8 \%$$

Xilanase X2

Pasta 1:

Nas Figuras XXI a XXV usou-se uma carga de 2,2 % de ClO₂, como Cl₂ ativo nos ensaios com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

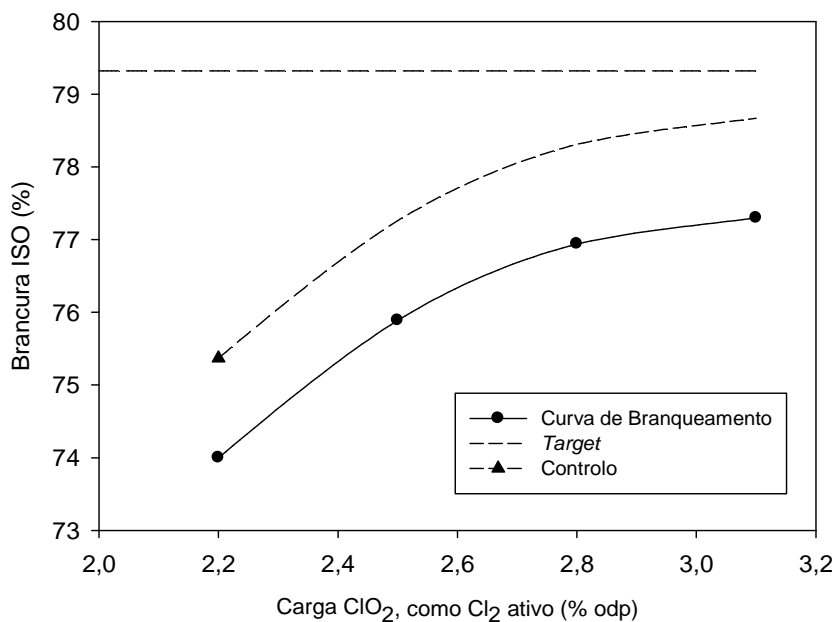


Figura XXI. Condições no estágio X: 70 °C, pH 7 e dose enzimática 900 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,00 - 2,20}{2,20} = 36,4 \%$$

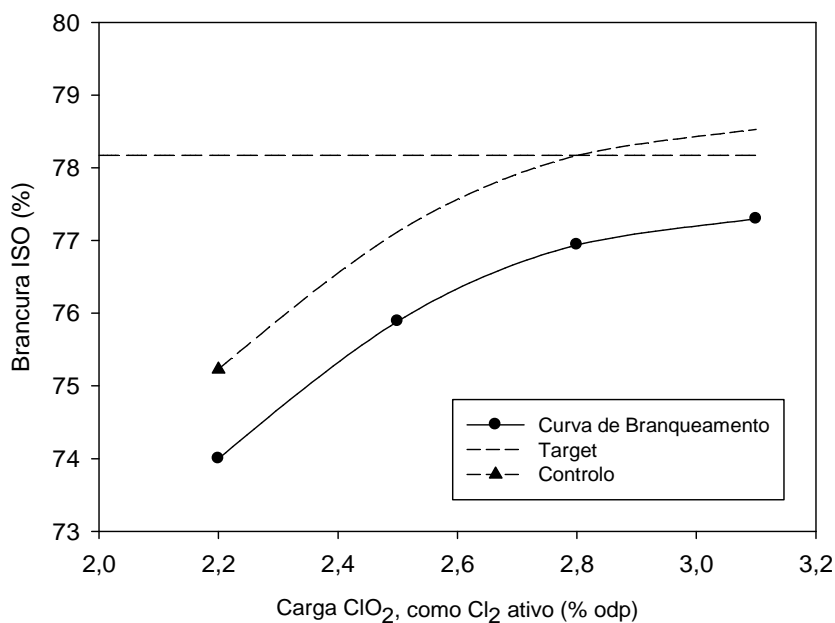


Figura XXII. Condições no estágio X: 70 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,80 - 2,20}{2,20} = 27,3 \%$$

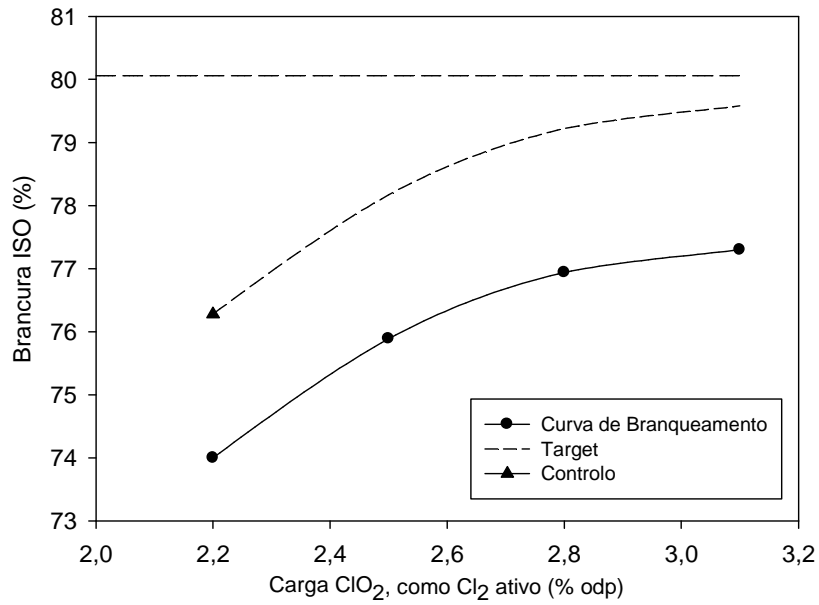


Figura XXIII. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8,5 e dose enzimática 1530 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,00 - 2,20}{2,20} = 36,4 \%$$

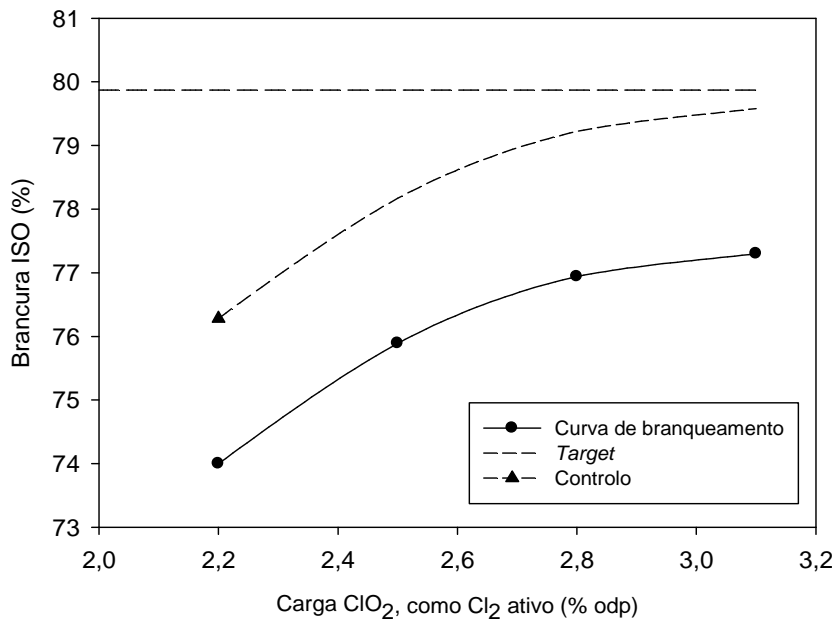


Figura XXIV. Condições no estágio X: 75 °C, pH 8,5 e dose enzimática 900 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{3,00 - 2,20}{2,20} = 36,4 \%$$

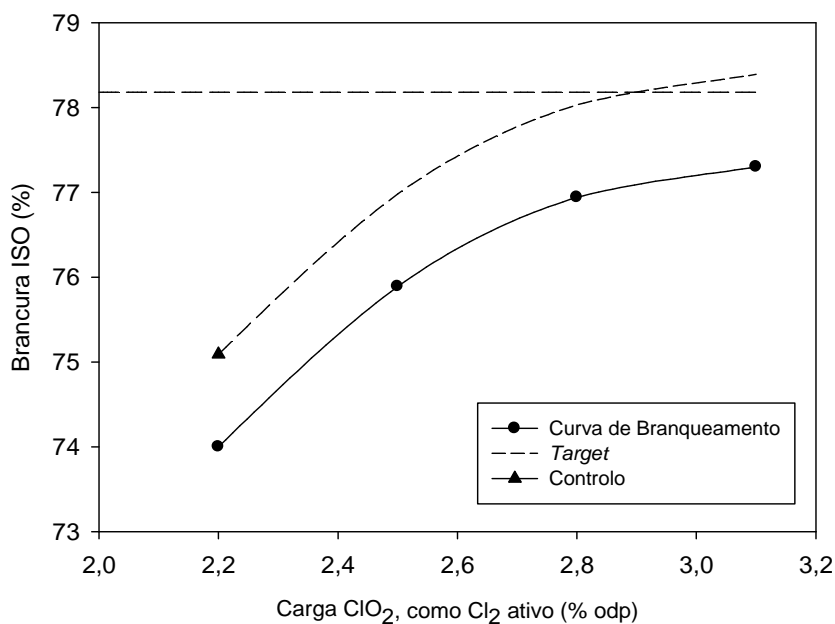


Figura XXV. Condições no estágio X: 75 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 2,2% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{2,87 - 2,20}{2,20} = 30,5 \%$$

Pasta 5:

Na Figura XXVI usou-se uma carga de 1,8 % de ClO₂, como Cl₂ ativo no ensaio com enzima (*Target* – linha horizontal a tracejado).

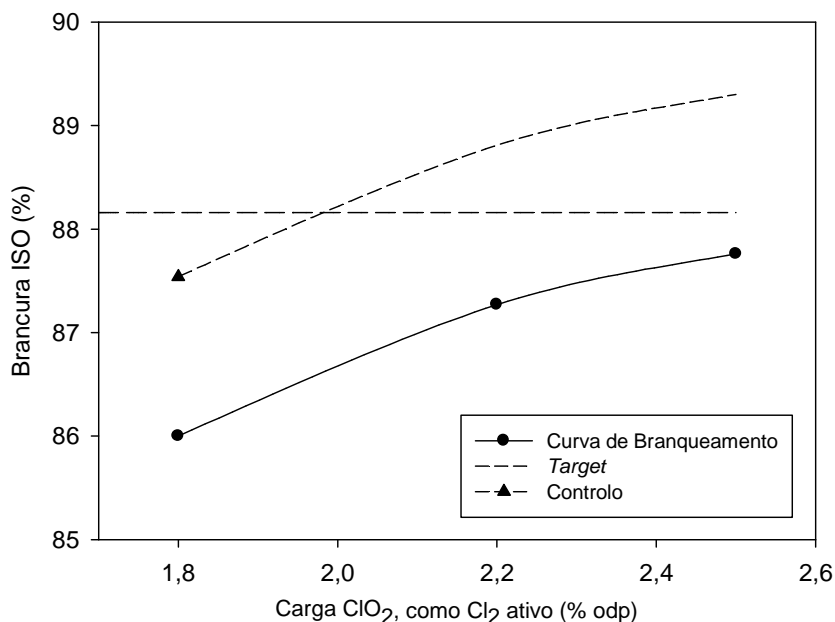


Figura XXVI. Condições no estágio X: 85 °C, pH 9 e dose enzimática 900 mL/t. *Target* com carga de ClO₂ de 1,8% como Cl₂ ativo.

$$\text{Poupança de ClO}_2 = \frac{1,98 - 1,80}{2,20} = 10,0 \%$$